

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-80895  
(P2012-80895A)

(43) 公開日 平成24年4月26日(2012.4.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 7 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 C O 8 6

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 146 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-270228 (P2011-270228)	(71) 出願人	591076811
(22) 出願日	平成23年12月9日 (2011.12.9)		ノバルティス バクシンズ アンド ダイ
(62) 分割の表示	特願2008-187969 (P2008-187969)		アグノスティックス, インコーポレーテッ
原出願日	平成14年7月5日 (2002.7.5)		ド
(31) 優先権主張番号	60/303,192	(71) 出願人	503009225
(32) 優先日	平成13年7月5日 (2001.7.5)		ユニバーシティ オブ ステレンボスク
(33) 優先権主張国	米国 (US)		南アフリカ 7505 タイガーバーグ,
(31) 優先権主張番号	60/316,860		ビー.オー. ボックス 19063
(32) 優先日	平成13年8月31日 (2001.8.31)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/349,871	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成14年1月16日 (2002.1.16)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

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

(57) 【要約】

【課題】 抗原性C型H I Vポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびそれらの使用方法の提供。

【解決手段】 免疫、パッケージング細胞株の産生、およびH I Vポリペプチドの産生を含む適用におけるポリヌクレオチドの使用もまた、記載される。抗原性H I Vポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが記載され、これらのポリヌクレオチドおよびそれら由来のポリペプチド産物の使用（免疫原性組成物の処方およびそれらの使用を含む）も記載される。特定の実施形態において、本発明は、H I Vポリペプチド（Env、Gag、Pol、Prot、RT、Int、Vpr、Vpu、Vif、Nef、Tat、Revならびに/またはそれらの組み合わせおよびフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない）をコードする、単離された野生型のポリヌクレオチドおよび/または発現カセットに関する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

明細書に記載の発明。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(発明の分野)

抗原性HIVポリペプチド(例えば、表Cにおいて示されるペプチド)をコードするポリヌクレオチドが記載される。そして免疫原性組成物中の処方物およびこれらの使用を含む、これらのポリヌクレオチドおよびポリペプチド生成物の使用が、記載される。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

(発明の背景)

後天性免疫不全症候群(AIDS)は、現代の医学が直面している最も大きな健康の脅威の1つとして認識される。現在もなお、この疾患についての療法は存在しない。

## 【0003】

1983年~1984年においては、3つのグループが、AIDSの推測される病因学的な因子を別々に同定した。例えば、Barre-Sinoussiら(1983)、*Science* 220:868-871; Montagnierら、*Human T-Cell Leukemia Viruses* (Gallo, EssexおよびGross編、1984); Vilmerら(1984)、*The Lancet* 1:753; Popovicら(1984)、*Science* 224:497-500; Levyら、(1984)、*Science* 225:840-842を参照のこと。これらの単離物は、リンパ節腫脹症関連ウイルス(LAV)、ヒトT細胞リンパ球向性ウイルスIII型(HTLV-III)、またはAIDS関連レトロウイルス(ARV)と、様々に呼ばれた。これらの単離物の全てが、同じウイルスの株であり、そして後にまとめて、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)と呼ばれた。関連するAIDSを引き起こすウイルスの単離物を用いて、最初にHIVと呼ばれた株が、現在HIV-1と呼ばれており、そして関連するウイルスが、HIV-2と呼ばれている。例えば、Guyaderら(1987)*Nature* 326:622-669; Brun-Vezinetら(1986)*Science* 233:343-346; Clavelら(1986)*Nature* 324:691-695を参照のこと。

20

30

## 【0004】

多くの情報が、HIVウイルスについては蓄積されているが、しかし、有効なワクチンは今日までには同定されていない。HIVによってコードされるenvおよびGag遺伝子産物を含むワクチンの開発のためのいくつかの標的が、試験されている。Gag遺伝子産物として、Gag-ポリメラーゼおよびGag-プロテアーゼが挙げられるが、これらに限定されない。Env遺伝子産物として、単量体のgp120ポリペプチド、オリゴマーの(oligomeric)gp140ポリペプチドおよびgp160ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

40

## 【0005】

Haasら(*Current Biology* 6(3):315-324、1996)は、HIV-1による選択的なコドン使用が、ウイルスのタンパク質合成の実質的にわずかな非効率性を説明するようであることを示唆した。Andreら(*J. Virol.* 72(2):1497-1503、1988)は、改変されたコドン使用を有する合成gp120配列を使用するDNAのワクチン接種によって誘発される、増大された免疫応答を記載した。Schneiderら(*J. Virol.* 71(7):4892-4903、1997)は、Gagコード配列およびGagプロテアーゼコード配列のコード配列内に配置された阻害(または不安定性)エレメント(INS)の不活化を議論している。

## 【0006】

50

H I V - 1 の G a g タンパク質は、ウイルス様の粒子のアセンブリに必要である。H I V - 1 の G a g タンパク質は、アセンブリ、粒子の放出後のビリオンの成熟、およびウイルスの複製における初期の侵入後の工程を含む、ウイルスの生存周期の多くの段階に関連している。H I V - 1 の G a g タンパク質の役割は多数あり、そして複雑である ( F r e e d , E . O . , V i r o l o g y 2 5 1 : 1 - 1 5 , 1 9 9 8 ) 。

【 0 0 0 7 】

W o l f r a , ( 1 9 9 6 年 1 0 月 3 日 に 公 開 さ れ た 、 P C T 国 際 出 願 W O 9 6 / 3 0 5 2 3 ; 1 9 9 1 年 1 0 月 2 日 に 公 開 さ れ た 、 欧 州 特 許 出 願 公 開 番 号 第 0 4 4 9 1 1 6 A 1 号 ) は 、 非 感 染 性 の レ ト ロ ウ イ ル ス 様 の 粒 子 キ ャ リ ア と し て 作 用 す る よ う に 、 特 に 、 免 疫 学 的 に 重 要 な エ ピ ト ー プ の 提 示 の た め に 、 変 更 さ れ た H I V - 1 の p r 5 5 G a g の 使 用 を 記 載 し た 。 W a n g r a ( V i r o l o g y 2 0 0 : 5 2 4 - 5 3 4 , 1 9 9 4 ) は 、 ビ リ オ ン へ の H I V G a g - - ガ ラ ク ト シ ダ ー ゼ 融 合 タ ン パ ク 質 の ア セ ン ブ リ を 研 究 す る た め の 系 を 記 載 し て い る 。 彼 ら は 、 H I V G a g - - ガ ラ ク ト シ ダ ー ゼ 融 合 タ ン パ ク 質 を コ ー ド す る 配 列 の 構 築 、 H I V G a g タ ン パ ク 質 の 存 在 下 で の こ の よ う な 配 列 の 発 現 、 お よ び ウ イ ル ス 粒 子 へ の こ れ ら の タ ン パ ク 質 の ア セ ン ブ リ を 記 載 す る 。

10

【 0 0 0 8 】

S h i v e r r a ( 1 9 9 8 年 8 月 1 3 日 に 公 開 さ れ た P C T 国 際 出 願 W O 9 8 / 3 4 6 4 0 号 ) は 、 H I V G a g を コ ー ド す る 合 成 D N A 分 子 、 お よ び H I V G a g の 改 変 を 産 生 す る た め の 、 H I V - 1 ( C A M 1 ) G a g コ ー ド 配 列 の 変 更 を 記 載 し た 。 合 成 分 子 の コ ド ン は 、 計 画 さ れ た 宿 主 細 胞 に よ っ て 好 ま れ る コ ド ン で あ っ た 。

20

【 0 0 0 9 】

最近、免疫原性の組成物中でのH I V E n v ポリペプチドの使用が記載されている。(異なるH I V e n v 改変体をそれぞれ発現する少なくとも4つの異なる組換えウイルスの混合物を含む免疫原性の組成物を記載している、1998年12月8日に発行されたH u r w i t z r a の 米 国 特 許 第 5 , 8 4 6 , 5 4 6 号 ; お よ び 、 H I V - 1 g p 1 2 0 タ ン パ ク 質 の エ ピ ト ー プ に 対 応 す る ペ プ チ ド を 記 載 し て い る 、 1 9 9 8 年 1 1 月 2 4 日 に 発 行 さ れ た 、 V a h l n e r a の 米 国 特 許 第 5 , 8 4 0 , 3 1 3 号 を 参 照 の こ と ) 。 さ ら に 、 1 9 9 9 年 3 月 2 日 に 発 行 さ れ た 、 S i a r a の 米 国 特 許 第 5 , 8 7 6 , 7 3 1 号 は 、 配 列 G P G R を 含 有 し て い る H I V - 1 単 離 物 の V 3 ル ー プ タ ン パ ク 質 の B 細 胞 エ ピ ト ー プ の ア ミ ノ 酸 配 列 に 対 し て 直 接 連 結 さ れ た G a g の T 細 胞 エ ピ ト ー プ の ア ミ ノ 酸 配 列 を 含 有 し て い る H I V に 対 す る 候 補 の ワ ク チ ン を 記 載 し て い る 。

30

【 発 明 の 概 要 】

【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

【 0 0 1 0 】

( 発 明 の 要 旨 )

本明細書中に記載されるものは、新規のH I V 配列、これらの新規配列によってコードされるポリペプチド、ならびにこれらおよび他のH I V 配列から生成される合成発現カセットである。1つの局面において、本発明は、改良されたH I V 発現カセットに関する。第2の局面において、本発明は、本発明の発現カセットを用いた被験体における免疫応答の発生に関する。さらなる局面において、本発明は、本発明の発現カセットおよび本発明の発現カセットによってコードされるポリペプチドを用いた被験体における免疫応答の発生に関する。別の局面において、本発明は、被験体におけるH I V に対する抗体および/または細胞性免疫応答を強力な中和を誘導するための増強されたワクチン技術に関する。

40

【 0 0 1 1 】

特定の実施形態において、本発明は、H I V ポリペプチド ( E n v , G a g , P o l , P r o t , R T , I n t , V p r , V p u , V i f , N e f , T a t , R e v な ら び に / またはそれらの組み合わせおよびフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない ) をコードする、単離された野生型のポリヌクレオチドおよび/または発現カセットに関する。いくつかの遺伝子の変異は、免疫応答を発生する遺伝子産物の能力に有害な影響を与えることなく、遺伝子産物の活性を減少させるか、または排除することが記載される。例

50

示的なポリヌクレオチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

【 0 0 1 2 】

【 数 1 】

*EnvTV001c8.2* (配列番号61 (SEQ ID NO:61) ),

*EnvTV001c8.5* (SEQ ID NO:62), *EnvTV001c12.1* (SEQ ID NO:63), *Env*

*TV003cE260* (SEQ ID NO:64), *EnvTV004cC300* (SEQ ID NO:65), *EnvTV006c9.1*

(SEQ ID NO:66), *EnvTV006c9.2* (SEQ ID NO:67), *EnvTV006cE9* (SEQ ID NO:68),

*EnvTV007cB104* (SEQ ID NO:69), *EnvTV007cB105* (SEQ ID NO:70),

*EnvTV008c4.3* (SEQ ID NO:71), *EnvTV008c4.4* (SEQ ID NO:72), *EnvTV010cD7*

(SEQ ID NO:73), *EnvTV012c2.1* (SEQ ID NO:74), *EnvTV012c2.2* (SEQ ID

NO:75), *EnvTV013cB20* (SEQ ID NO:76), *EnvTV013cH17* (SEQ ID NO:77),

*EnvTV014c6.3* (SEQ ID NO:78), *EnvTV014c6.4* (SEQ ID NO:79),

*EnvTV018cF1027* (SEQ ID NO:80), *EnvTV019c5* (SEQ ID NO:81), *GagTV001G8*

(SEQ ID NO:82), *GagTV001G11* (SEQ ID NO:83), *GagTV002G8* (SEQ ID NO:84),

10

20

【 0 0 1 3 】

【 数 1 A 】

*GagTV003G15* (SEQ ID NO:85), *GagTV004G17* (SEQ ID NO:86), *GagTV004G24*

(SEQ ID NO:87), *GagTV006G11* (SEQ ID NO:88), *GagTV006G97* (SEQ ID

NO:89), *GagTV007G59* (SEQ ID NO:90), *GagTV008G65* (SEQ ID NO:91),

*GagTV008G66* (SEQ ID NO:92), *GagTV010G74* (SEQ ID NO:93), *GagTV012G34*

(SEQ ID NO:94), *GagTV012G40* (SEQ ID NO:95), *GagTV013G2* (SEQ ID NO:96),

*GagTV013G15* (SEQ ID NO:97), *GagTV014G73* (SEQ ID NO:98),

*GagTV018G60* (SEQ ID NO:99), *GagTV019G20* (SEQ ID NO:100),

*GagTV019G25* (SEQ ID NO:101), 8\_2\_TV1 LTR (SEQ ID NO:181), および

2\_1/4\_TV12\_C\_ZA (SEQ ID NO:182).

30

【 0 0 1 4 】

他の実施形態において、本発明は、HIVポリペプチド (*Env*、*Gag*、*Pol*、*Prot*、*Int*、*Vpr*、*Vpu*、*Vif*、*Nef*、*Tat*、*Rev*ならびに/またはこれらの組み合わせおよびフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない) をコードする合成のポリヌクレオチドおよび/または発現カセットに関する。さらに、本発明また、HIVポリペプチドの発現の改善、およびウイルス様粒子の産生に関する。HIVポリペプチド (例えば、*Gag* - , *pol* - , プロテアーゼ (*prot*) - 、逆転写酵素、インテグラーゼ、*RNAseH*、*Tat*、*Rev*、*Nef*、*Vpr*、*Vpu*、*Vif*および/または*Env*を含有するポリペプチド) をコードする合成発現カセットが記載され、この発現カセットの使用も記載される。いくつかの遺伝子の変異は、免疫応答を発生する遺伝子産物の能力に有害な影響を与えることなく、遺伝子産物の活性を減少させるか、または排除することが記載される。例示的な合成ポリヌクレオチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

40

【 0 0 1 5 】

50

【 数 2 】

GagComplPolmut\_C (SEQ ID NO:9), GagComplPolmutAtt\_C (SEQ ID NO:10), GagComplPolmutIna\_C (SEQ ID NO:11), GagComplPolmutInaTatRevNef\_C (SEQ ID NO:12), GagPolmut\_C (SEQ ID NO:13), GagPolmutAtt\_C (SEQ ID NO:14), GagPolmutIna\_C (SEQ ID NO:15), GagProtInaRTmut\_C (SEQ ID NO:16), GagProtInaRTmutTatRevNef\_C (SEQ ID NO:17), GagRTmut\_C (SEQ ID NO:18), GagRTmutTatRevNef\_C (SEQ ID NO:19), GagTatRevNef\_C (SEQ ID NO:20), gp120mod.TV1.del118-210 (SEQ ID NO:21), gp120mod.TV1.delV1V2 (SEQ ID NO:22), gp120mod.TV1.delV2 (SEQ ID NO:23), gp140mod.TV1.del118-210 (SEQ ID NO:24), gp140mod.TV1.delV1V2 (SEQ ID NO:25), gp140mod.TV1.delV2 (SEQ ID NO:26); gp140mod.TV1.mut7 (SEQ ID NO:27), gp140mod.TV1.tpa2 (SEQ ID NO:28), gp140TMmod.TV1 (SEQ ID

10

【 0 0 1 6 】

## 【数 2 A】

NO:29), gp160mod.TV1.del118-210 (SEQ ID NO:30), gp160mod.TV1.delV1V2 (SEQ ID NO:31), gp160mod.TV1.delV2 (SEQ ID NO:32), gp160mod.TV1.dV1 (SEQ ID NO:33), gp160mod.TV1.dV1-gagmod.BW965 (SEQ ID NO:34), gp160mod.TV1.dV1V2-gagmod.BW965 (SEQ ID NO:35), gp160mod.TV1.dV2-gagmod.BW965 (SEQ ID NO:36), gp160mod.TV1.tpa2 (SEQ ID NO:37), gp160mod.TV1-gagmod.BW965 (SEQ ID NO:38), int.opt.mut\_C (SEQ ID NO:39), int.opt\_C (SEQ ID NO:40), nef.D106G.-myr19.opt\_C (SEQ ID NO:41), p15RnaseH.opt\_C (SEQ ID NO:42), p2Pol.opt.YMWM\_C (SEQ ID NO:43), p2Polopt.YM\_C (SEQ ID NO:44), p2Polopt\_C (SEQ ID NO:45), p2PolTatRevNef opt C (SEQ ID NO:46), p2PolTatRevNef.opt.native\_C (SEQ ID NO:47), p2PolTatRevNef.opt\_C (SEQ ID NO:48), protInaRT.YM.opt\_C (SEQ ID NO:49), protInaRT.YMWM.opt\_C (SEQ ID NO:50), ProtRT.TatRevNef.opt\_C (SEQ ID NO:51), rev.exon1\_2.M5-10.opt\_C (SEQ ID NO:52), tat.exon1\_2.opt.C22-37\_C (SEQ ID NO:53), tat.exon1\_2.opt.C37\_C (SEQ ID NO:54), TatRevNef.opt.native\_ZA (SEQ ID NO:55), TatRevNef.opt\_ZA (SEQ ID NO:56), TatRevNefGag C (SEQ ID NO:57), TatRevNefgagCpollna C (SEQ ID NO:58), TatRevNefGagProtInaRTmut C (SEQ ID NO:59), TatRevNefProtRT opt C (SEQ ID NO:60), gp140.modTV1.mut1.dV2 (SEQ ID NO:183); gp140mod.TV1.mut2.dV2 (SEQ ID NO:184), gp140mod.TV1.mut3.dV2 (SEQ ID NO:185), gp140mod.TV1.mut4.dV2 (SEQ ID NO:186), gp140.mod.TV1.GM161 (SEQ ID NO:187), gp140mod.TV1.GM161-195-204 (SEQ ID NO:188), gp140mod.TV1.GM161-204 (SEQ ID NO:189), gp140mod.TV1.GM-V1V2 (SEQ ID NO:190), gp140modC8.2mut7.delV2.Kozmod.Ta (SEQ ID NO:191), および Nef-myrD124LLAA (SEQ ID NO:203).

## 【0017】

従って、本発明の1つの局面は、発現カセットおよびこの中に含まれるポリヌクレオチドに関する。この発現カセットは、代表的には、発現ベクター骨格に挿入されたHIVポリペプチドコード配列を含む。1つの実施形態において、発現カセットは、1以上のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここで、このポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、約85%~100%の間、およびこの間の任意の整数値（例えば、少なくとも約85%、好ましくは約90%、より好ましくは約95%、およびより好ましくは約98%）の配列同一性を有する配列を含む。

## 【0018】

本発明のHIVポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、さらなるポリペプチドをコードする配列を含み得る。ポリペプチドをコードするこのようなさらなるポリヌクレオチドは、例えば、他のウイルスタンパク質（例えば、B型肝炎またはC型肝炎あるいは他のHIVのタンパク質）についてのコード配列（例えば、HIV Gagポリペ

チドをコードするポリヌクレオチド配列、H I V E n v ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列および/またはv i f、v p r、t a t、r e v、v p uおよびn e fのうち1以上をコードするポリヌクレオチド) ; サイトカインまたは他の導入遺伝子を含み得る。

【 0 0 1 9 】

1つの実施形態において、H I V P o l ポリペプチドをコードする配列は、逆転写酵素およびインテグラーゼに対応するコード領域の欠失によって改変され得る。このポリメラーゼポリペプチドにおけるこのような欠失はまた、作製され得、その結果、このポリヌクレオチド配列は、ヘルパーT細胞およびCTLのエピトープを保存する。目的の他の抗原は、同様にポリメラーゼに挿入され得る。

10

【 0 0 2 0 】

別の実施形態において、発現カセットは、例えば、以下 :

【 0 0 2 1 】

【 数 3 】

GagComplPolmut\_C (SEQ ID NO:9),  
 GagComplPolmutAtt\_C (SEQ ID NO:10), GagComplPolmutIna\_C (SEQ ID NO:11),  
 GagComplPolmutInaTatRevNef\_C (SEQ ID NO:12), GagPolmut\_C (SEQ ID  
 NO:13), GagPolmutAtt\_C (SEQ ID NO:14), GagPolmutIna\_C (SEQ ID NO:15),  
 GagProtInaRTmut\_C (SEQ ID NO:16), GagProtInaRTmutTatRevNef\_C (SEQ ID  
 NO:17), GagRTmut\_C (SEQ ID NO:18), GagRTmutTatRevNef\_C (SEQ ID NO:19),  
 GagTatRevNef\_C (SEQ ID NO:20), gp120mod.TV1.del118-210 (SEQ ID NO:21),  
 gp120mod.TV1.delV1V2 (SEQ ID NO:22), gp120mod.TV1.delV2 (SEQ ID NO:23),  
 gp140mod.TV1.del118-210 (SEQ ID NO:24), gp140mod.TV1.delV1V2 (SEQ ID  
 NO:25), gp140mod.TV1.delV2 (SEQ ID NO:26), gp140mod.TV1.mut7 (SEQ ID  
 NO:27), gp140mod.TV1.tpa2 (SEQ ID NO:28), gp140TMmod.TV1 (SEQ ID  
 NO:29), gp160mod.TV1.del118-210 (SEQ ID NO:30), gp160mod.TV1.delV1V2  
 (SEQ ID NO:31), gp160mod.TV1.delV2 (SEQ ID NO:32), gp160mod.TV1.dV1  
 (SEQ ID NO:33), gp160mod.TV1.dV1-gagmod.BW965 (SEQ ID NO:34),  
 gp160mod.TV1.dV1V2-gagmod.BW965 (SEQ ID NO:35), gp160mod.TV1.dV2-  
 gagmod.BW965 (SEQ ID NO:36), gp160mod.TV1.tpa2 (SEQ ID NO:37),

20

30

【 0 0 2 2 】

## 【数 3 A】

gp160mod.TV1-gagmod.BW965 (SEQ ID NO:38), int.opt.mut\_C (SEQ ID NO:39),  
 int.opt\_C (SEQ ID NO:40), nef.D106G.-myr19.opt\_C (SEQ ID NO:41),  
 p15RnaseH.opt\_C (SEQ ID NO:42), p2Pol.opt.YMWM\_C (SEQ ID NO:43),  
 p2Polopt.YM\_C (SEQ ID NO:44), p2Polopt\_C (SEQ ID NO:45), p2PolTatRevNef  
 opt C (SEQ ID NO:46), p2PolTatRevNef.opt.native\_C (SEQ ID NO:47),  
 p2PolTatRevNef.opt\_C (SEQ ID NO:48), protInaRT.YM.opt\_C (SEQ ID NO:49),  
 protInaRT.YMWM.opt\_C (SEQ ID NO:50), ProtRT.TatRevNef.opt\_C (SEQ ID  
 NO:51), rev.exon1\_2.M5-10.opt\_C (SEQ ID NO:52), tat.exon1\_2.opt.C22-37\_C  
 (SEQ ID NO:53), tat.exon1\_2.opt.C37\_C (SEQ ID NO:54),  
 TatRevNef.opt.native\_ZA (SEQ ID NO:55), TatRevNef.opt\_ZA (SEQ ID NO:56),  
 TatRevNefGag C (SEQ ID NO:57), TatRevNefgagCpollna C (SEQ ID NO:58),  
 TatRevNefGagProtInaRTmut C (SEQ ID NO:59), および TatRevNefProtRT opt C  
 (SEQ ID NO:60),

10

20

## 【0023】

のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここで、これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、約 85% ~ 100% の間、およびこの間の任意の整数値（例えば、少なくとも約 85%、好ましくは約 90%、より好ましくは約 95%、そしてより好ましくは約 98%）の配列同一性を有する配列を含む。

## 【0024】

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

30

## 【0025】

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

## 【0026】

本発明は、さらに、選択した宿主細胞における使用のための組換え発現系を包含し、ここで、この組換え発現系は、本発明の 1 つ以上のポリヌクレオチドおよび発現カセットを用いる。このような系において、ポリヌクレオチド配列は、選択した宿主細胞における発現と適合性のコントロールエレメントに作動可能に連結される。多数の発現コントロールエレメントが、当該分野で公知であり、これらとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：転写プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終止シグナル、ポリアデニル化配列、翻訳の開始を最適化するための配列、および翻訳終止配列。例示的な転写プロモーターとしては、CMV、CMV + イントロン A、SV40、RSV、HIV-Ltr、MMLV-Ltr およびメタロチオネインから誘導されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

40

## 【0027】

本発明の別の局面は、本発明の 1 つ以上の発現カセットを含む細胞を含み、ここで、ポ

50

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

【0028】

さらなる局面において、本発明は、免疫学的応答を発生するための組成物を包含し、ここで、この組成物は、代表的には、本発明の少なくとも1つの発現カセットを含有し、そして例えば、発現カセット（例えば、Pol誘導体化ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する1つ以上の発現カセット、Gag誘導体化ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する1つ以上の発現カセット、付随ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ネイティブもしくは合成の、vpu、vpr、nef、vif、tat、rev）を有する1つ以上の発現カセット、および/またはEnv誘導体化ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する1つ以上の発現カセット）の組み合わせを含有し得る。このような組成物は、さらに、アジュバント（単数または複数）を含有し得る。これらの組成物はまた、1つ以上のHIVポリペプチドを含有し得る。このHIVポリペプチドは、組成物中の発現カセットによってコードされるポリペプチドに対応し得るか、または発現カセットによってコードされるポリペプチドとは異なり得る。発現カセット（または、本発明のポリヌクレオチド）およびポリペプチドの両方を含有する組成物において、本発明の種々の発現カセットが混合され得、そして/または本明細書中に記載される種々のHIVポリペプチドと適合され得る。

【0029】

別の局面において、本発明は、被験体の免疫化の方法を包含する。本方法において、上記の組成物のいずれかは、被験体中の発現カセットの発現に適合性である条件下で、被験体中にある。1つの実施形態において、発現カセット（または、本発明のポリヌクレオチド）は、遺伝子送達ベクターを使用して導入され得る。この遺伝子送達ベクターは、例えば、非ウイルスベクター、またはウイルスベクターであり得る。例示的なウイルスベクターとしては、真核層状開始系（eucaryotic layered vector initiation system）、Sindbisウイルス（または他のウイルス）由来ベクター、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定されない。他の例示的なベクターとしては、pCMV Km2、pCMV 6a、pCMV-link、およびpCMVPLEdhfrが挙げられるが、これらに限定されない。免疫学的応答を生じるために有用な組成物はまた、特定のキャリア（例えば、PLG微粒子またはCTAB-PLG微粒子）を使用して送達され得る。さらに、このような組成物は、例えば、金粒子またはタングステン粒子、および例えば、遺伝子銃を使用して被験体に送達されるコーティングされた粒子上にコーティングされ得る。これらの組成物はまた、リポソームとして処方され得る。この方法の1つの実施形態において、被験体は、哺乳動物であり、そして例えば、ヒトであり得る。

【0030】

さらなる局面において、本発明は、被験体において免疫応答を生じる方法を包含する。本明細書中に記載される任意の発現カセットは、適切な細胞において発現されて、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるHIVポリペプチドの発現を提供し得る。次いで、ポリペプチドは単離（例えば、続いて精製）され、免疫応答を誘発するのに十分な量で被験体に投与される。特定の実施形態において、本方法は、本明細書中に記載される遺伝子送達技術のいずれかを使用して、本発明の1つ以上の発現カセットまたはポリヌクレオチドを投与する工程を包含する。他の実施形態において、本方法は、本発明の1つ以上

10

20

30

40

50

の発現カセットまたはポリヌクレオチドおよび1つ以上のポリペプチドを同時投与する工程を包含し、ここで、これらのポリペプチドは、これらのポリヌクレオチドから発現され得るか、または他のHIVポリペプチドであり得る。他の実施形態において、本方法は、本発明の複数の発現カセットまたはポリヌクレオチドを同時投与する工程を包含し得る。なおさらなる実施形態において、本方法は、複数のポリペプチド、例えば、本発明のポリヌクレオチドから発現されるポリペプチドおよび/または他のHIVポリペプチドを同時投与する工程を包含する。

#### 【0031】

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

10

#### 【0032】

本発明のポリヌクレオチドは、単独または組み合わせて使用され得る。HIV誘導体化ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドは、種々の方法において発現され得る。これらの方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：プロモーターから発現される単一の遺伝子産物（またはそれらの一部分）をコードするポリヌクレオチド；1つより多い遺伝子産物（またはそれらの一部分）をコードする複数のポリヌクレオチド（例えば、ポリシストロニックコード配列）；単一のポリタンパク質を産生するための複数のポリヌクレオチドインフレーム；およびポリタンパク質がポリタンパク質を含む1つ以上のポリペプチドの間にタンパク質切断部位を有する、単一のポリタンパク質を産生するための複数のポリヌクレオチドインフレーム。

20

#### 【0033】

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

30

(1) HIV Gagポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Gagポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18および配列番号19からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(2) HIV Gagポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Gagポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号12または配列番号20の少なくとも500個の連続するヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

40

(3) HIV Envポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Envポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号21、配列番号22、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28、配列番号29および配列番号30に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(4) HIV Envポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Envポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37および配列番号38に対して少なくとも90%

50

の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(5) HIV Intポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Intポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号39に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(6) HIV Intポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Intポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号40に対して少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(7) HIV Nefポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Nefポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号41または配列番号203に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(8) HIV p15RNaseHポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該p15RNaseHポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号42に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(9) HIV Polポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Polポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号43、配列番号44および配列番号45からなる群より選択される配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(10) HIV Tatポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Tatポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号46、配列番号47および配列番号48からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(11) HIV Protポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Protポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号49または配列番号50に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(12) HIV Protポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Protポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号51に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(13) HIV Revポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Revポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号52に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(14) HIV Tatポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Tatポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、および配列番号60からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(15) HIV Envポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、該Envポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190および配列番号191からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

(16) 項目1~15のいずれかに記載の発現カセットを含む、選択された宿主細胞における使用のための組換え発現系であって、前記ポリヌクレオチド配列が、該選択された宿

10

20

30

40

50

主細胞における発現と適合する制御エレメントに作動可能に連結されている、組換え発現系。

(17) 項目16に記載の組換え発現系であって、前記制御エレメントが、転写プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終結シグナル、ポリアデニル化配列、翻訳の開始の最適化のための配列、および翻訳終結配列からなる群より選択される、組換え発現系。

(18) 項目16に記載の組換え発現系であって、前記転写プロモーターが、CMV、CMVおよびイントロンA、SV40、RSV、HIV-Ltr、MMLV-Ltr、ならびにメタロチオネインからなる群より選択される、組換え発現系。

(19) 項目1~15のいずれか1項に記載の発現カセットを含む細胞であって、前記ポリヌクレオチド配列が、前記選択された細胞における発現に適合する制御エレメントに作動可能に連結されている、細胞。

(20) 前記細胞が哺乳動物細胞である、項目19に記載の細胞。

(21) 前記細胞が、BHK細胞、VERO細胞、HT1080細胞、293細胞、RD細胞、COS-7細胞、およびCHO細胞からなる群より選択される、項目20に記載の細胞。

(22) 前記細胞が、CHO細胞である、項目21に記載の細胞。

(23) 前記細胞が、昆虫細胞である、項目19に記載の細胞。

(24) 前記細胞が、Trichoplusia ni (Tn5) 昆虫細胞またはSf9昆虫細胞のいずれかである、項目23に記載の細胞。

(25) 前記細胞が、細菌細胞である、項目19に記載の細胞。

(26) 前記細胞が、酵母細胞である、項目19に記載の細胞。

(27) 前記細胞が、植物細胞である、項目19に記載の細胞。

(28) 前記細胞が、抗原提示細胞である、項目19に記載の細胞。

(29) 項目28に記載の細胞であって、前記抗原提示細胞が、リンパ細胞であり、該リンパ細胞が、そのマクロファージ、単球、樹状細胞、B細胞、T細胞、幹細胞、および始原細胞からなる群より選択される、細胞。

(30) 項目19に記載の細胞であって、前記細胞が、始原細胞である、細胞。

(31) 項目19に記載の細胞であって、前記細胞が、不死化細胞である、細胞。

(32) 項目19に記載の細胞であって、前記細胞が、腫瘍由来細胞である、細胞。

(33) HIV Gag ポリペプチド配列を含むポリペプチドを産生するための方法であって、該方法が、以下：

項目19に記載の細胞を、該ポリペプチドを産生するための条件下でインキュベートする工程、

を包含する、方法。

(34) 哺乳動物被験体における使用のための遺伝子送達ベクターであって、

該被験体における使用のための適切な遺伝子送達ベクターを含み、該ベクターが、項目1~15のいずれかに記載の発現カセットを含み、そして前記ポリヌクレオチド配列が、該被験体における発現と適合する制御エレメントに作動可能に連結されている、遺伝子送達ベクター。

(35) 被験体のDNA免疫化の方法であって、以下：

該被験体における前記発現カセットの発現と適合する条件下で、項目34に記載の遺伝子送達ベクターを該被験体に導入する工程、

を包含する、方法。

(36) 前記遺伝子送達ベクターが、非ウイルスベクターである、項目35に記載の方法。

(37) 前記ベクターが特定のキャリアーを使用して送達される、項目35に記載の方法。

(38) 項目37に記載の方法であって、前記ベクターが、金またはタングステンの粒子上にコーティングされ、そして該コーティングされた粒子が、遺伝子銃を使用して前記被

10

20

30

40

50

験体に送達される、方法。

(39) 前記ベクターが、リポソーム調製物にカプセル化されている、項目35に記載の方法。

(40) 前記ベクターが、ウイルスベクターである、項目35に記載の方法。

(41) 前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、項目40に記載の方法。

(42) 前記ウイルスベクターが、アルファウイルスベクターである、項目40に記載の方法。

(43) 前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、項目40に記載の方法。

(44) 前記被験体が、哺乳動物である、項目35に記載の方法。

(45) 前記哺乳動物が、ヒトである、項目44に記載の方法。

(46) 被験体において免疫応答を生じさせる方法であって、以下：

該被験体の細胞に、項目34に記載の遺伝子送達ベクターを、前記ポリヌクレオチドの発現および該ポリペプチドの産生を可能にする条件下で、トランスフェクトし、それによって、該ポリペプチドに免疫学的応答を誘発する工程、を包含する、方法。

(47) 前記ベクターが非ウイルスベクターである、項目46に記載の方法。

(48) 前記ベクターが特定のキャリアーを使用して送達される、項目46に記載の方法。

(49) 項目46に記載の方法であって、前記ベクターが、金またはタングステンの粒子上にコーティングされ、そして該コーティングされた粒子が、遺伝子銃を使用して前記脊椎動物に送達される、方法。

(50) 前記ベクターが、リポソーム調製物にカプセル化されている、項目46に記載の方法。

(51) 前記ベクターが、ウイルスベクターである、項目46に記載の方法。

(52) 前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、項目51に記載の方法。

(53) 前記ウイルスベクターが、アルファウイルスベクターである、項目51に記載の方法。

(54) 前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、項目51に記載の方法。

(55) 前記被験体が、哺乳動物である、項目46に記載の方法。

(56) 前記哺乳動物が、ヒトである、項目55に記載の方法。

(57) 前記トランスフェクションが、エキソピボで行われ、そして前記トランスフェクトされた細胞が、前記被験体に再導入される、項目46に記載の方法。

(58) 前記トランスフェクションが、前記被験体においてインピボで行われる、項目46に記載の方法。

(59) 前記免疫応答が、体液性免疫応答である、項目46に記載の方法。

(60) 前記免疫応答が、細胞性免疫応答である、項目46に記載の方法。

(61) 項目46に記載の方法であって、前記遺伝子送達ベクターが、筋肉内、粘膜内、鼻腔内、皮下、皮内、経皮、膈内、直腸内、経口、または静脈内で投与される、方法。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1A】図1A～図1Dは、C型HIV 8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZA（配列番号1；本明細書中でTV1と称される）のヌクレオチド配列を示す。種々の領域を表Aに示す。

【図1B】図1A～図1Dは、C型HIV 8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZA（配列番号1；本明細書中でTV1と称される）のヌクレオチド配列を示す。種々の領域を表Aに示す。

【図1C】図1A～図1Dは、C型HIV 8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZA（配列番号1；本明細書中でTV1と称される）のヌクレオチド配列を示す。種々の領域を表Aに示す。

10

20

30

40

50

【図1D】図1A～図1Dは、C型HIV 8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZA（配列番号1；本明細書中でTV1と称される）のヌクレオチド配列を示す。種々の領域を表Aに示す。

【図2-1】図2A～図2Cは、種々のHIV単離物（SF162、配列番号2；TV1.8\_\_2、配列番号3；TV1.8\_\_5、配列番号4；TV2.12-5/1、配列番号5；コンセンサス配列、配列番号6）由来のEnvポリペプチドのアライメントを示す。この矢印の間の領域は、削除および/または短縮され得る、シート領域および/または架橋（bridging）シート領域における領域（TV1クローンおよびTV2クローン、両方ともC型HIVの単離体）を示す。この「\*」は、（TV1クローンおよびTV2クロンの）N連結グリコシル化部位、改変（例えば、削除および/または短縮）され得る1つ以上の部位を記載する。

【図2-2】図2-1のつづき。

【図2-3】図2-2のつづき。

【図3】図3は、HIV Envポリペプチドの以下：gp160、gp140、gp120およびgp41の形態間の関係を示す概念図を示す。

【図4】図4は、293細胞におけるLTR-CATプラスミドの発現に対するTat変異体の転写活性に関する例示的データを示す。

【図5】図5は、CAT発現によってモニタリングされるRev変異体の輸送（export）活性に関する例示的データを示す。

【図6-1】図6（シート1およびシート2）は、構築物Gag Compl Pol mut\_\_Cの配列（配列番号9）を示す。

【図6-2】図6（シート1およびシート2）は、構築物Gag Compl Pol mut\_\_Cの配列（配列番号9）を示す。

【図7-1】図7（シート1およびシート2）は、構築物Gag Compl Pol mut Att\_\_Cの配列（配列番号10）を示す。

【図7-2】図7（シート1およびシート2）は、構築物Gag Compl Pol mut Att\_\_Cの配列（配列番号10）を示す。

【図8-1】図8（シート1およびシート2）は、構築物Gag Compl Pol mut Ina\_\_Cの配列（配列番号11）を示す。

【図8-2】図8（シート1およびシート2）は、構築物Gag Compl Pol mut Ina\_\_Cの配列（配列番号11）を示す。

【図9-1】図9（シート1およびシート2）は、構築物Gag Compl Pol mut Ina Tat Rev Nef\_\_Cの配列（配列番号12）を示す。

【図9-2】図9（シート1およびシート2）は、構築物Gag Compl Pol mut Ina Tat Rev Nef\_\_Cの配列（配列番号12）を示す。

【図10】図10は、構築物Gag Pol mut\_\_Cの配列（配列番号13）を示す。

【図11】図11は、構築物Gag Pol mut Att\_\_Cの配列（配列番号14）を示す。

【図12】図12は、構築物Gag Pol mut Ina\_\_Cの配列（配列番号15）を示す。

【図13】図13は、構築物Gag Prot Ina RT mut\_\_Cの配列（配列番号16）を示す。

【図14-1】図14（シート1およびシート2）は、構築物Gag Prot Ina RT mut Tat Rev Nef\_\_Cの配列（配列番号17）を示す。

【図14-2】図14（シート1およびシート2）は、構築物Gag Prot Ina RT mut Tat Rev Nef\_\_Cの配列（配列番号17）を示す。

【図15】図15は、構築物Gag RT mut\_\_Cの配列（配列番号18）を示す。

【図16-1】図16（シート1および2）は、構築物Gag RT mut Tat Rev Nef\_\_Cの配列（配列番号19）を示す。

【図16-2】図16（シート1および2）は、構築物Gag RT mut Tat Rev Nef\_\_Cの配列（配列番号19）を示す。

10

20

30

40

50

【図17】図17は、構築物 G a g T a t R e v N e f \_ \_ C の配列（配列番号20）を示す。

【図18】図18は、構築物 g p l 2 0 m o d . T V 1 . d e l 1 8 - 2 1 0 の配列（配列番号21）を示す。

【図19】図19は、構築物 g p l 2 0 m o d . T V 1 . d e l V 1 V 2 の配列（配列番号22）を示す。

【図20】図20は、構築物 g p l 2 0 m o d . T V 1 . d e l V 2 の配列（配列番号23）を示す。

【図21】図21は、構築物 g p l 4 0 m o d . T V 1 . d e l 1 1 8 - 2 1 0 の配列（配列番号24）を示す。

【図22】図22は、構築物 g p l 4 0 m o d . T V 1 . d e l V 1 V 2 の配列（配列番号25）を示す。

【図23】図23は、構築物 g p l 4 0 m o d . T V 1 . d e l V 2 の配列（配列番号26）を示す。

【図24】図24は、構築物 g p l 4 0 m o d . T V 1 . m u t 7 の配列（配列番号27）を示す。

【図25】図25は、構築物 g p l 4 0 m o d . T V 1 . t p a 2 の配列（配列番号28）を示す。

【図26】図26は、構築物 g p l 4 0 T M m o d . T V 1 の配列（配列番号29）を示す。

【図27】図27は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d e l 1 1 8 - 2 1 0 の配列（配列番号30）を示す。

【図28】図28は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d e l V 1 V 2 の配列（配列番号31）を示す。

【図29】図29は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d e l V 2 の配列（配列番号32）を示す。

【図30】図30は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d V 1 の配列（配列番号33）を示す。

【図31-1】図31（シート1および2）は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d V 1 - g a g m o d . B W 9 6 5 の配列（配列番号34）を示す。

【図31-2】図31（シート1および2）は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d V 1 - g a g m o d . B W 9 6 5 の配列（配列番号34）を示す。

【図32-1】図32（シート1および2）は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d V 1 V 2 - g a g m o d . B W 9 6 5 の配列（配列番号35）を示す。

【図32-2】図32（シート1および2）は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d V 1 V 2 - g a g m o d . B W 9 6 5 の配列（配列番号35）を示す。

【図33-1】図33（シート1および2）は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d V 2 - g a g m o d . B W 9 6 5 の配列（配列番号36）を示す。

【図33-2】図33（シート1および2）は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . d V 2 - g a g m o d . B W 9 6 5 の配列（配列番号36）を示す。

【図34】図34は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 . t p a 2 の配列（配列番号37）を示す。

【図35-1】図35（シート1および2）は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 - g a g m o d . B W 9 6 5 の配列（配列番号38）を示す。

【図35-2】図35（シート1および2）は、構築物 g p l 6 0 m o d . T V 1 - g a g m o d . B W 9 6 5 の配列（配列番号38）を示す。

【図36】図36は、構築物 i n t . o p t . m u t \_ \_ C の配列（配列番号39）を示す。

【図37】図37は、構築物 i n t . o p t \_ \_ C の配列（配列番号40）を示す。

【図38】図38は、構築物 n e f . D 1 0 6 G . - m y r l 9 . o p t \_ \_ C の配列（配

10

20

30

40

50

列番号 4 1 ) を示す。

【図 3 9】図 3 9 は、構築物 p 1 5 R n a s e H . o p t \_ C の配列 ( 配列番号 4 2 ) を示す。

【図 4 0】図 4 0 は、構築物 p 2 P o l . o p t . Y M W M \_ C の配列 ( 配列番号 4 3 ) を示す。

【図 4 1】図 4 1 は、構築物 p 2 P o l o p t . Y M \_ C の配列 ( 配列番号 4 4 ) を示す。

【図 4 2】図 4 2 は、構築物 p 2 P o l o p t \_ C の配列 ( 配列番号 4 5 ) を示す。

【図 4 3】図 4 3 は、構築物 p 2 P o l T a t R e v N e f o p t C の配列 ( 配列番号 4 6 ) を示す。

【図 4 4】図 4 4 は、構築物 p 2 P o l T a t R e v N e f . o p t . n a t i v e \_ C の配列 ( 配列番号 4 7 ) を示す。

【図 4 5】図 4 5 は、構築物 p 2 P o l T a t R e v N e f . o p t \_ C の配列 ( 配列番号 4 8 ) を示す。

【図 4 6】図 4 6 は、構築物 p r o t I n a R T . Y M . o p t \_ C の配列 ( 配列番号 4 9 ) を示す。

【図 4 7】図 4 7 は、構築物 p r o t I n a R T . Y M W M . o p t \_ C の配列 ( 配列番号 5 0 ) を示す。

【図 4 8】図 4 8 は、構築物 P r o t R T . T a t R e v N e f . o p t \_ C の配列 ( 配列番号 5 1 ) を示す。

【図 4 9】図 4 9 は、構築物 r e v . e x o n 1 \_ 2 . M 5 - 1 0 . o p t \_ C の配列 ( 配列番号 5 2 ) を示す。

【図 5 0】図 5 0 は、構築物 t a t . e x o n 1 \_ 2 . o p t . C 2 2 - 3 7 \_ C の配列 ( 配列番号 5 3 ) を示す。

【図 5 1】図 5 1 は、構築物 t a t . e x o n 1 \_ 2 . o p t . C 3 7 \_ C の配列 ( 配列番号 5 4 ) を示す。

【図 5 2】図 5 2 は、構築物 T a t R e v N e f . o p t . n a t i v e \_ Z A の配列 ( 配列番号 5 5 ) を示す。

【図 5 3】図 5 3 は、構築物 T a t R e v N e f . o p t \_ Z A の配列 ( 配列番号 5 6 ) を示す。

【図 5 4】図 5 4 は、構築物 T a t R e v N e f G a g C の配列 ( 配列番号 5 7 ) を示す。

【図 5 5 - 1】図 5 5 ( シート 1 および 2 ) は、構築物 T a t R e v N e f g a g C p o l I n a C の配列 ( 配列番号 5 8 ) を示す。

【図 5 5 - 2】図 5 5 ( シート 1 および 2 ) は、構築物 T a t R e v N e f g a g C p o l I n a C の配列 ( 配列番号 5 8 ) を示す。

【図 5 6 - 1】図 5 6 ( シート 1 および 2 ) は、構築物 T a t R e v N e f G a g P r o t I n a R T m u t C の配列 ( 配列番号 5 9 ) を示す。

【図 5 6 - 2】図 5 6 ( シート 1 および 2 ) は、構築物 T a t R e v N e f G a g P r o t I n a R T m u t C の配列 ( 配列番号 5 9 ) を示す。

【図 5 7】図 5 7 は、構築物 T a t R e v N e f P r o t R T o p t C の配列 ( 配列番号 6 0 ) を示す。

【図 5 8】図 5 8 は、単離体 C - 9 8 T V 0 0 1 のクローン T V 0 0 1 c 8 . 2 の E n v の配列 ( 配列番号 6 1 ) を示す。

【図 5 9】図 5 9 は、単離体 C - 9 8 T V 0 0 1 のクローン T V 0 0 1 c 8 . 5 の E n v の配列 ( 配列番号 6 2 ) を示す。

【図 6 0】図 6 0 は、単離体 C - 9 8 T V 0 0 2 のクローン T V 0 0 1 c 1 2 . 1 の E n v の配列 ( 配列番号 6 3 ) を示す。

【図 6 1】図 6 1 は、単離体 C - 9 8 T V 0 0 3 のクローン T V 0 0 3 c E 2 6 0 の E n v の配列 ( 配列番号 6 4 ) を示す。

10

20

30

40

50

【図62】図62は、単離体C-98TV004のクローンTV004cC300のEnvの配列（配列番号65）を示す。

【図63】図63は、単離体C-98TV006のクローンTV006c9.1のEnvの配列（配列番号66）を示す。

【図64】図64は、単離体C-98TV006のクローンTV006c9.2のEnvの配列（配列番号67）を示す。

【図65】図65は、単離体C-98TV006のクローンTV006cE9のEnvの配列（配列番号68）を示す。

【図66】図66は、単離体C-98TV007のクローンTV007cB104のEnvの配列（配列番号69）を示す。

10

【図67】図67は、単離体C-98TV007のクローンTV007cB105のEnvの配列（配列番号70）を示す。

【図68】図68は、単離体C-98TV008のクローンTV008c4.3のEnvの配列（配列番号71）を示す。

【図69】図69は、単離体C-98TV008のクローンTV008c4.4のEnvの配列（配列番号72）を示す。

【図70】図70は、単離体C-98TV010のクローンTV010cD7のEnvの配列（配列番号73）を示す。

【図71】図71は、単離体C-98TV012のクローンTV012c2.1のEnvの配列（配列番号74）を示す。

20

【図72】図72は、単離体C-98TV012のクローンTV012c2.2のEnvの配列（配列番号75）を示す。

【図73】図73は、単離体C-98TV013のクローンTV013cB20のEnvの配列（配列番号76）を示す。

【図74】図74は、単離体C-98TV013のクローンTV013cH17のEnvの配列（配列番号77）を示す。

【図75】図75は、単離体C-98TV014のクローンTV014c6.3のEnvの配列（配列番号78）を示す。

【図76】図76は、単離体C-98TV014のクローンTV014c6.4のEnvの配列（配列番号79）を示す。

30

【図77】図77は、単離体C-98TV018のクローンTV018cF1027のEnvの配列（配列番号80）を示す。

【図78】図78は、単離体C-98TV019のクローンTV019c5のEnvの配列（配列番号81）を示す。

【図79】図79は、単離体C-98TV001のクローンTV001G8のGagの配列（配列番号82）を示す。

【図80】図80は、単離体C-98TV001のクローンTV001G11のGagの配列（配列番号83）を示す。

【図81】図81は、単離体C-98TV002のクローンTV002G8のGagの配列（配列番号84）を示す。

40

【図82】図82は、単離体C-98TV003のクローンTV003G15のGagの配列（配列番号85）を示す。

【図83】図83は、単離体C-98TV004のクローンTV004G17のGagの配列（配列番号86）を示す。

【図84】図84は、単離体C-98TV004のクローンTV004G24のGagの配列（配列番号87）を示す。

【図85】図85は、単離体C-98TV006のクローンTV006G11のGagの配列（配列番号88）を示す。

【図86】図86は、単離体C-98TV006のクローンTV006G97のGagの配列（配列番号89）を示す。

50

【図 8 7】図 8 7 は、単離体 C - 9 8 T V 0 0 9 のクローン T V 0 0 7 G 5 9 の G a g の配列（配列番号 9 0）を示す。

【図 8 8】図 8 8 は、単離体 C - 9 8 T V 0 0 8 のクローン T V 0 0 8 G 6 5 の G a g の配列（配列番号 9 1）を示す。

【図 8 9】図 8 9 は、単離体 C - 9 8 T V 0 0 8 のクローン T V 0 0 8 G 6 6 の G a g の配列（配列番号 9 2）を示す。

【図 9 0】図 9 0 は、単離体 C - 9 8 T V 0 1 0 のクローン T V 0 1 0 G 7 4 の G a g の配列（配列番号 9 3）を示す。

【図 9 1】図 9 1 は、単離体 C - 9 8 T V 0 1 2 のクローン T V 0 1 2 G 3 4 の G a g の配列（配列番号 9 4）を示す。

【図 9 2】図 9 2 は、単離体 C - 9 8 T V 0 1 2 のクローン T V 0 1 2 G 4 0 の G a g の配列（配列番号 9 5）を示す。

【図 9 3】図 9 3 は、単離体 C - 9 8 T V 0 1 3 のクローン T V 0 1 3 G 2 の G a g の配列（配列番号 9 6）を示す。

【図 9 4】図 9 4 は、単離体 C - 9 8 T V 0 1 3 のクローン T V 0 1 3 G 1 5 の G a g の配列（配列番号 9 7）を示す。

【図 9 5】図 9 5 は、単離体 C - 9 8 T V 0 1 4 のクローン T V 0 1 4 G 7 3 の G a g の配列（配列番号 9 8）を示す。

【図 9 6】図 9 6 は、単離体 C - 9 8 T V 0 1 8 のクローン T V 0 1 8 G 6 0 の G a g の配列（配列番号 9 9）を示す。

【図 9 7】図 9 7 は、単離体 C - 9 8 T V 0 1 9 のクローン T V 0 1 9 G 2 0 の G a g の配列（配列番号 1 0 0）を示す。

【図 9 8】図 9 8 は、単離体 C - 9 8 T V 0 1 9 のクローン T V 0 1 9 G 2 5 の G a g の配列（配列番号 1 0 1）を示す。

【図 9 9 a 1】図 9 9 a 1、9 9 a 2、9 9 b および 9 9 c は、S o u t h A f r i c a n サブタイプ C 単離体（T V 0 0 1（N e f については配列番号 1 0 2、T a t については配列番号 2 0 6、および R e v については配列番号 2 3 0）；T V 0 0 2（T a t については配列番号 1 0 3、配列番号 2 0 7 および R e v については配列番号 2 3 1）；T V 0 0 3（N e f については配列番号 1 0 4、T a t については配列番号 2 0 8、R e v については配列番号 2 3 2）；T V 0 0 4（N e f については配列番号 1 0 5、T a t については配列番号 2 0 9 および R e v については配列番号 2 3 3）；T V 0 0 5（N e f については配列番号 1 0 6、T a t については配列番号 2 1 0 および R e v については配列番号 2 3 4）；T V 0 0 6（N e f については配列番号 1 0 7、T a t については配列番号 2 1 1 および R e v については配列番号 2 3 5）；T V 0 0 7（N e f については配列番号 1 0 8、T a t については配列番号 2 1 2 および R e v については配列番号 2 3 6）；T V 0 0 8（N e f については配列番号 1 0 9、T a t については配列番号 2 1 3 および R e v については配列番号 2 3 7）；T V 0 1 0（N e f については配列番号 1 1 0、T a t については配列番号 2 1 4 および R e v については配列番号 2 3 8）；T V 0 1 2（N e f については配列番号 1 1 1、T a t については配列番号 2 1 5 および R e v については配列番号 2 3 9）；T V 0 1 3（N e f については配列番号 1 1 2、T a t については配列番号 2 1 6 および R e v については配列番号 2 4 0）；T V 0 1 4（N e f については配列番号 1 1 3、T a t については配列番号 2 1 7 および R e v については配列番号 2 4 1）；T V 0 1 8（N e f については配列番号 1 1 4、T a t については配列番号 2 1 8 および R e v については配列番号 2 4 2）；T V 0 1 9（N e f については配列番号 1 1 5、T a t については配列番号 2 1 9 および R e v については配列番号 2 4 3））由来の N e f（図 9 9 a 1 および 9 9 a 2）、T a t（図 9 9 b）および R e v（図 9 9 c）の推定アミノ酸配列の、いくつかのサブタイプ C 参照株（9 2 B R 0 2 5（N e f については配列番号 1 1 6、T a t については配列番号 2 2 0 および R e v については配列番号 2 4 4）；3 0 1 9 0 4 - I n d（N e f については配列番号 1 1 7、T a t については配列番号 2 2 1 および R e v については配列番号 2 4 5）；3 0 1 9 0 5 - I n d

10

20

30

40

50

(N e f については配列番号 1 1 8、T a t については配列番号 2 2 2 および R e v については配列番号 2 4 6) ; 3 0 1 9 9 - I n d (N e f については配列番号 1 1 9、T a t については配列番号 2 2 3 および R e v については配列番号 2 4 7) ; 9 6 B W 1 6 - D 1 4 (N e f については配列番号 1 2 0、T a t については配列番号 2 2 4 および R e v については配列番号 2 4 8) ; 9 6 B W 0 4 - 0 9 (N e f については配列番号 1 2 1、T a t については配列番号 2 2 5 および R e v については配列番号 2 4 9) ; 9 6 B W 1 2 - 1 0 (N e f については配列番号 1 2 2、T a t については配列番号 2 2 6 および R e v については配列番号 2 5 0) ; C 2 2 2 0 - E t h (N e f については配列番号 1 2 3、T a t については配列番号 2 2 7 および R e v については配列番号 2 5 1) ) ならびにサブタイプ B 参照株 H X B 2 (N e f については配列番号 1 2 4、T a t については配列番号 2 2 8 および R e v については配列番号 2 5 2) と組み合わせた、アラインメントを示す。コンセンサス配列は最下段に示す (N e f については配列番号 1 2 5、T a t については配列番号 2 2 9 および R e v については配列番号 2 5 3) 。点は、同一の残基配列を示し、ダッシュは、ギャップを、そしてアスタリスクは、終結コドンを示す。優れたタンパク質ドメインおよび保存モチーフは、影を付けられるかまたは標識される。

【図 9 9 a 2】図 9 9 a 1、9 9 a 2、9 9 b および 9 9 c は、S o u t h A f r i c a n サブタイプ C 単離体 (T V 0 0 1 (N e f については配列番号 1 0 2、T a t については配列番号 2 0 6、および R e v については配列番号 2 3 0) ; T V 0 0 2 (T a t については配列番号 1 0 3、配列番号 2 0 7 および R e v については配列番号 2 3 1) ; T V 0 0 3 (N e f については配列番号 1 0 4、T a t については配列番号 2 0 8、R e v については配列番号 2 3 2) ; T V 0 0 4 (N e f については配列番号 1 0 5、T a t については配列番号 2 0 9 および R e v については配列番号 2 3 3) ; T V 0 0 5 (N e f については配列番号 1 0 6、T a t については配列番号 2 1 0 および R e v については配列番号 2 3 4) ; T V 0 0 6 (N e f については配列番号 1 0 7、T a t については配列番号 2 1 1 および R e v については配列番号 2 3 5) ; T V 0 0 7 (N e f については配列番号 1 0 8、T a t については配列番号 2 1 2 および R e v については配列番号 2 3 6) ; T V 0 0 8 (N e f については配列番号 1 0 9、T a t については配列番号 2 1 3 および R e v については配列番号 2 3 7) ; T V 0 1 0 (N e f については配列番号 1 1 0、T a t については配列番号 2 1 4 および R e v については配列番号 2 3 8) ; T V 0 1 2 (N e f については配列番号 1 1 1、T a t については配列番号 2 1 5 および R e v については配列番号 2 3 9) ; T V 0 1 3 (N e f については配列番号 1 1 2、T a t については配列番号 2 1 6 および R e v については配列番号 2 4 0) ; T V 0 1 4 (N e f については配列番号 1 1 3、T a t については配列番号 2 1 7 および R e v については配列番号 2 4 1) ; T V 0 1 8 (N e f については配列番号 1 1 4、T a t については配列番号 2 1 8 および R e v については配列番号 2 4 2) ; T V 0 1 9 (N e f については配列番号 1 1 5、T a t については配列番号 2 1 9 および R e v については配列番号 2 4 3) ) 由来の N e f (図 9 9 a 1 および 9 9 a 2)、T a t (図 9 9 b) および R e v (図 9 9 c) の推定アミノ酸配列の、いくつかのサブタイプ C 参照株 (9 2 B R 0 2 5 (N e f については配列番号 1 1 6、T a t については配列番号 2 2 0 および R e v については配列番号 2 4 4) ; 3 0 1 9 0 4 - I n d (N e f については配列番号 1 1 7、T a t については配列番号 2 2 1 および R e v については配列番号 2 4 5) ; 3 0 1 9 0 5 - I n d (N e f については配列番号 1 1 8、T a t については配列番号 2 2 2 および R e v については配列番号 2 4 6) ; 3 0 1 9 9 - I n d (N e f については配列番号 1 1 9、T a t については配列番号 2 2 3 および R e v については配列番号 2 4 7) ; 9 6 B W 1 6 - D 1 4 (N e f については配列番号 1 2 0、T a t については配列番号 2 2 4 および R e v については配列番号 2 4 8) ; 9 6 B W 0 4 - 0 9 (N e f については配列番号 1 2 1、T a t については配列番号 2 2 5 および R e v については配列番号 2 4 9) ; 9 6 B W 1 2 - 1 0 (N e f については配列番号 1 2 2、T a t については配列番号 2 2 6 および R e v については配列番号 2 5 0) ; C 2 2 2 0 - E t h (N e f については配列番号 1 2 3、T a t については配列番号 2 2 7 および R e v については配列番号 2 5 1) ) なら

10

20

30

40

50

びにサブタイプB参照株HXB2 (Nefについては配列番号124、Tatについては配列番号228およびRevについては配列番号252)と組み合わせた、アラインメントを示す。コンセンサス配列は最下段に示す(Nefについては配列番号125、Tatについては配列番号229およびRevについては配列番号253)。点は、同一の残基配列を示し、ダッシュは、ギャップを、そしてアスタリスクは、終結コドンを示す。優位なタンパク質ドメインおよび保存モチーフは、影を付けられるかまたは標識される。

【図99b】図99a1、99a2、99bおよび99cは、South AfricanサブタイプC単離体(TV001(Nefについては配列番号102、Tatについては配列番号206、およびRevについては配列番号230); TV002(Tatについては配列番号103、配列番号207およびRevについては配列番号231); TV003(Nefについては配列番号104、Tatについては配列番号208、Revについては配列番号232); TV004(Nefについては配列番号105、Tatについては配列番号209およびRevについては配列番号233); TV005(Nefについては配列番号106、Tatについては配列番号210およびRevについては配列番号234); TV006(Nefについては配列番号107、Tatについては配列番号211およびRevについては配列番号235); TV007(Nefについては配列番号108、Tatについては配列番号212およびRevについては配列番号236); TV008(Nefについては配列番号109、Tatについては配列番号213およびRevについては配列番号237); TV010(Nefについては配列番号110、Tatについては配列番号214およびRevについては配列番号238); TV012(Nefについては配列番号111、Tatについては配列番号215およびRevについては配列番号239); TV013(Nefについては配列番号112、Tatについては配列番号216およびRevについては配列番号240); TV014(Nefについては配列番号113、Tatについては配列番号217およびRevについては配列番号241); TV018(Nefについては配列番号114、Tatについては配列番号218およびRevについては配列番号242); TV019(Nefについては配列番号115、Tatについては配列番号219およびRevについては配列番号243))由来のNef(図99a1および99a2)、Tat(図99b)およびRev(図99c)の推定アミノ酸配列の、いくつかのサブタイプC参照株(92BR025(Nefについては配列番号116、Tatについては配列番号220およびRevについては配列番号244); 301904-Ind(Nefについては配列番号117、Tatについては配列番号221およびRevについては配列番号245); 301905-Ind(Nefについては配列番号118、Tatについては配列番号222およびRevについては配列番号246); 30199-Ind(Nefについては配列番号119、Tatについては配列番号223およびRevについては配列番号247); 96BW16-D14(Nefについては配列番号120、Tatについては配列番号224およびRevについては配列番号248); 96BW04-09(Nefについては配列番号121、Tatについては配列番号225およびRevについては配列番号249); 96BW12-10(Nefについては配列番号122、Tatについては配列番号226およびRevについては配列番号250); C2220-Eth(Nefについては配列番号123、Tatについては配列番号227およびRevについては配列番号251))ならびにサブタイプB参照株HXB2 (Nefについては配列番号124、Tatについては配列番号228およびRevについては配列番号252)と組み合わせた、アラインメントを示す。コンセンサス配列は最下段に示す(Nefについては配列番号125、Tatについては配列番号229およびRevについては配列番号253)。点は、同一の残基配列を示し、ダッシュは、ギャップを、そしてアスタリスクは、終結コドンを示す。優位なタンパク質ドメインおよび保存モチーフは、影を付けられるかまたは標識される。

【図99c】図99a1、99a2、99bおよび99cは、South AfricanサブタイプC単離体(TV001(Nefについては配列番号102、Tatについては配列番号206、およびRevについては配列番号230); TV002(Tatにつ

10

20

30

40

50

いては配列番号103、配列番号207およびRevについては配列番号231) ; TV003 (Nefについては配列番号104、Tatについては配列番号208、Revについては配列番号232) ; TV004 (Nefについては配列番号105、Tatについては配列番号209およびRevについては配列番号233) ; TV005 (Nefについては配列番号106、Tatについては配列番号210およびRevについては配列番号234) ; TV006 (Nefについては配列番号107、Tatについては配列番号211およびRevについては配列番号235) ; TV007 (Nefについては配列番号108、Tatについては配列番号212およびRevについては配列番号236) ; TV008 (Nefについては配列番号109、Tatについては配列番号213およびRevについては配列番号237) ; TV010 (Nefについては配列番号110、Tatについては配列番号214およびRevについては配列番号238) ; TV012 (Nefについては配列番号111、Tatについては配列番号215およびRevについては配列番号239) ; TV013 (Nefについては配列番号112、Tatについては配列番号216およびRevについては配列番号240) ; TV014 (Nefについては配列番号113、Tatについては配列番号217およびRevについては配列番号241) ; TV018 (Nefについては配列番号114、Tatについては配列番号218およびRevについては配列番号242) ; TV019 (Nefについては配列番号115、Tatについては配列番号219およびRevについては配列番号243) )由来のNef (図99a1および99a2)、Tat (図99b)およびRev (図99c)の推定アミノ酸配列の、いくつかのサブタイプC参照株 (92BR025 (Nefについては配列番号116、Tatについては配列番号220およびRevについては配列番号244) ; 301904 - Ind (Nefについては配列番号117、Tatについては配列番号221およびRevについては配列番号245) ; 301905 - Ind (Nefについては配列番号118、Tatについては配列番号222およびRevについては配列番号246) ; 30199 - Ind (Nefについては配列番号119、Tatについては配列番号223およびRevについては配列番号247) ; 96BW16 - D14 (Nefについては配列番号120、Tatについては配列番号224およびRevについては配列番号248) ; 96BW04 - 09 (Nefについては配列番号121、Tatについては配列番号225およびRevについては配列番号249) ; 96BW12 - 10 (Nefについては配列番号122、Tatについては配列番号226およびRevについては配列番号250) ; C2220 - Eth (Nefについては配列番号123、Tatについては配列番号227およびRevについては配列番号251) )ならびにサブタイプB参照株HXB2 (Nefについては配列番号124、Tatについては配列番号228およびRevについては配列番号252)と組み合わせた、アラインメントを示す。コンセンサス配列は最下段に示す (Nefについては配列番号125、Tatについては配列番号229およびRevについては配列番号253)。点は、同一の残基配列を示し、ダッシュは、ギャップを、そしてアスタリスクは、終結コドンを示す。優位なタンパク質ドメインおよび保存モチーフは、影を付けられるかまたは標識される。

【図100 - 1】図100 (シート1~9)は、Los Alamos Database由来のサブタイプC参照株 : IN21068 (配列番号147)、96BW05.02 (配列番号148)、ETH2220 (配列番号149)、および92BR025.8 (配列番号150)と比較した、South African HIV-1サブタイプC配列 (TV001c8.2 (配列番号126) ; TV001c8.1 (配列番号127) ; TV002c12.1 (配列番号128) ; TV012c2.1 (配列番号129) ; TV012c2.2 (配列番号130) ; TV006c9.1 (配列番号131) ; TV006cE9 (配列番号132) ; TV006c9.2 (配列番号133) ; TV007cB104 (配列番号134) ; TV007cB105 (配列番号135) ; TV010cD7 (配列番号136) ; TV018cF1027 (配列番号137) ; TV014c6.3 (配列番号138) ; TV014c6.4 (配列番号139) ; TV008c4.3 (配列番号140) ; TV008c4.4 (配列番号141) ; TV019c5 (配列番

号142) ; TV003cE260 (配列番号143) ; TV004cC300 (配列番号144) ; TV013cH17 (配列番号145) ; TV013cB20 (配列番号146) )由来の完全Envタンパク質のアラインメントを示す。点は、IN21068配列と同一の配列を示し、ダッシュは、最適なアラインメントに導入されるギャップを示す。カレットは、ほとんどの配列に存在するグリコシル化可能部位を示す。アスタリスクは、システイン残基の位置を示す。V1、V2、V3、V4およびV5 変換可能ループ、ならびにシグナルペプチドおよびCD4結合残基およびCD4結合部位は、上記の配列で示される。V3ループの11位、25位および35位の三角形は、SI/NSI表現型について評価されるアミノ酸を示す。

【図100-2】図100のつづきである。

【図100-3】図100のつづきである。

【図100-4】図100のつづきである。

【図100-5】図100のつづきである。

【図100-6】図100のつづきである。

【図100-7】図100のつづきである。

【図100-8】図100のつづきである。

【図100-9】図100のつづきである。

【図101-1】図101 (シート1~3) は、South African サブタイプC単離体 (太字) TV007-6 (Vifについては配列番号151、Vprについては配列番号254およびVpuについては配列番号288) ; TV007-2 (Vif 20 については配列番号152、Vprについては配列番号255およびVpuについては配列番号289) ; TV019-82 (Vifについては配列番号153、Vprについては配列番号256およびVpuについては配列番号290) ; TV019-85 (Vif については配列番号154、Vprについては配列番号257およびVpuについては配列番号291) ; TV008-17 (Vifについては配列番号155、Vprについては配列番号258およびVpuについては配列番号292) ; TV008-1 (Vif については配列番号156、Vprについては配列番号259およびVpuについては配列番号293) ; TV014-25 (Vifについては配列番号157、Vprについては配列番号260およびVpuについては配列番号294) ; TV014-31 (Vif については配列番号158、Vprについては配列番号261およびVpuについては配列番号295) ; TV004-45 (Vifについては配列番号159、Vprについては配列番号262およびVpuについては配列番号296) ; TV001-2 (Vif については配列番号160、Vprについては配列番号263およびVpuについては配列番号297) ; TV018-7 (Vifについては配列番号286、Vprについては配列番号264およびVpuについては配列番号298) ; TV018-8 (Vif については配列番号161、Vprについては配列番号265およびVpuについては配列番号299) ; TV002-84 (Vifについては配列番号162、Vprについては配列番号266およびVpuについては配列番号300) ; TV009-3 (Vif については配列番号163、Vprについては配列番号267およびVpuについては配列番号301) ; TV013-2 (Vifについては配列番号164、Vprについては配列番号268およびVpuについては配列番号302) ; TV013-3 (Vif については配列番号165、Vprについては配列番号269およびVpuについては配列番号303) ; TV003-12 (Vifについては配列番号166、Vprについては配列番号270およびVpuについては配列番号304) ; TV003-B (Vif については配列番号167、Vprについては配列番号271およびVpuについては配列番号305) ; TV005-81 (Vif については配列番号168、Vprについては配列番号272およびVpuについては配列番号306) ; TV012-4 (Vif については配列番号169、Vprについては配列番号273およびVpuについては配列番号307) ; TV006-9 (Vif については配列番号170、Vprについては配列番号274およびVpuについては配列番号308) ; TV010-25 (Vif については配列番号1 30

10

20

30

40

50

71、Vprについては配列番号275およびVpuについては配列番号309)由来の(A)推定Vifアミノ酸配列、(B)推定Vprアミノ酸配列、および(C)推定Vpuアミノ酸配列の、いくつかのサブタイプC参照株92BR025(Vifについては配列番号172、Vprについては配列番号276およびVpuについては配列番号310); 301904-Ind(Vifについては配列番号173、Vprについては配列番号277およびVpuについては配列番号311); 301905-Ind(Vifについては配列番号174、Vprについては配列番号278およびVpuについては配列番号312); 30199-Ind(Vifについては配列番号175、Vprについては配列番号279およびVpuについては配列番号313); 96BW16-D14(Vifについては配列番号176、Vprについては配列番号280およびVpuについては配列番号314); 96BW04-09(Vifについては配列番号177、Vprについては配列番号281およびVpuについては配列番号315); 96BW12-10(Vifについては配列番号178、Vprについては配列番号282およびVpuについては配列番号316); C2220-Eth(Vifについては配列番号179、Vprについては配列番号283およびVpuについては配列番号317))ならびにHXB2(Vifについては配列番号180、Vprについては配列番号284およびVpuについては配列番号318)と組み合わせた、アラインメントを示す。コンセンサス配列は、Vifについては配列番号287、Vprについては配列番号285およびVpuについては配列番号319として示される。

10

【図101-2】図101のつづきである。

20

【図101-3】図101のつづきである。

【図101-4】図101のつづきである。

【図102-1】図102(シート1および2)は、8\_\_2\_\_TV1と示されたクローンの3'領域由来のヌクレオチド配列(配列番号181)を示す。

【図102-2】図102のつづきである。

【図103-1】図103(シート1~5)は、2\_\_1/4\_\_TV12\_\_C\_\_ZAのヌクレオチド配列(配列番号182)を示す。

【図103-2】図103のつづきである。

【図103-3】図103のつづきである。

【図103-4】図103のつづきである。

30

【図103-5】図103のつづきである。

【図104】図104は、gp140.modTV1.mut1.dV2のヌクレオチド配列(配列番号183)を示す。

【図105】図105は、gp140mod.TV1.mut2.dV2のヌクレオチド配列(配列番号184)を示す。

【図106】図106は、gp140mod.TV1.mut3.dV2のヌクレオチド配列(配列番号185)を示す。

【図107】図107は、gp140mod.TV1.mut4.dV2のヌクレオチド配列(配列番号186)を示す。

【図108】図108は、gp140.mod.TV1.GM161のヌクレオチド配列(配列番号187)を示す。

40

【図109】図109は、gp140mod.TV1.GM161-195-204のヌクレオチド配列(配列番号188)を示す。

【図110】図110は、gp140mod.TV1.GM161-204のヌクレオチド配列(配列番号189)を示す。

【図111】図111は、gp140mod.TV1.GM-V1V2のヌクレオチド配列(配列番号190)を示す。

【図112】図112は、gp140modC8.2mut7.delV2.Kozmod.Taのヌクレオチド配列(配列番号191)を示す。

【図113】図113は、種々のEnv切断部位変異体(gp140mod.TV1.d

50

e1V2の翻訳(配列番号192); gp140mod.TV1.mut1.dV2の翻訳(配列番号193); gp140mod.TV1.mut2.dV2の翻訳(配列番号194); gp140mod.TV1.mut3.dV2の翻訳(配列番号195); gp140mod.TV1.mut4.dV2の翻訳(配列番号196); およびgp140mod.TV1.mut7.dV2の翻訳(配列番号197)のアミノ酸配列のアラインメントを示す。アミノ酸変化は、太字で示される。

【図114】図114は、gp140mod.TV1の翻訳(配列番号198); gp140mod.TV1.GM161の翻訳(配列番号199); gp140mod.TV1.GM161-204の翻訳(配列番号200); gp140mod.TV1.GM161-195-204の翻訳(配列番号201); およびgp140mod.TV1.GM-V1V2の翻訳(配列番号202)を含む、種々のEnvグリコシル化変異体(GM)のアミノ酸配列のアラインメントを示す。

【図115】図115は、Nef-myrd124LLAAのヌクレオチド配列(配列番号203)を示す。

【図116】図116は、Nef-myrd124LLAAから翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列(配列番号204)を示す。

【図117】図117は、gp160mod.TV2のヌクレオチド配列(配列番号205)を示す。

【図118】図118は、HIV-1のゲノム構成の概要および有用なサブゲノムフラグメントを示す。

【図119】図119は、Env DNAおよびタンパク質での免疫後の、免疫化ウサギにおけるログ相乗平均抗体力価を示すグラフである。

【図120】図120は、3度のDNA免疫および単回のタンパク質追加免疫後に収集されたウサギ血清中のサブタイプB Envタンパク質およびサブタイプC Envタンパク質に対するELISA力価の比較を示す棒グラフである。

【図121】図121は、DNA初回刺激タンパク質追加免疫レジメンにおける、サブタイプC TV1 Envで免疫されたウサギ中のサブタイプB SF162 Env dV2株に対する中和された抗体応答のデータを示す。

【図122】図122は、単回タンパク質追加免疫後の5.25レポーター細胞アッセイにおける、サブタイプC初代株、TV1およびTV2に対する中和された抗体応答のデータを示す。

【図123】図123は、単回タンパク質追加免疫後の、サブタイプC、TV1およびDu174、ならびにサブタイプB、SF162に対する中和された抗体応答(Duke PBMCアッセイにより測定される)のデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0035】

(発明の詳細な説明)

本発明の実行において、他に示されない限り、当該分野における従来 of 化学法、生物化学法、分子生物学法、免疫学法および薬理学法を使用する。このような技術は、文献において十分に説明される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. ColowickおよびN. Kaplan(編)、Academic Press、Inc.); およびHandbook of Experimental Immunology、第I~IV巻(D. M. WeirおよびC. C. Blackwell(編)、1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第2版、1989); Short Protocols in Molecular Biology、第4版(Ausubelら(編)、1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology

10

20

30

40

50

Techniques: An Intensive Laboratory Course (Reamら (編)、1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series) 第2版 (Newton & Graham (編)、1997, Springer Verlag) を参照のこと。

【0036】

本明細書中で使用される場合、単数型「a」、「an」および「the」は、明確にそうではないことを指示しない限り、複数を含む。したがって、例えば、「抗原 (antigen)」は、2種以上のこのような抗原の混合物を含む。

【0037】

(1. 定義)

本発明の記載において、以下の用語が使用され、以下に示されるとおりに規定されることが意図される。

【0038】

本明細書中で使用される場合には、「合成」配列とは、その発現が本明細書中で記載されているように、例えば、阻害配列のコドンの置換、改変された活性および/または不活化によって改変されている、HIVポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドをいう。「野生型」配列または「天然の」配列とは、本明細書中で使用される場合には、本質的にはそれらが天然において見出される通りのポリペプチドコード配列をいう。例えば、HIV単離株にて見出されるようなGag、Pol、Vif、Vpr、Tat、Rev、Vpu、Envおよび/またはNefのコード配列(例えば、SF162、SF2、AF110965、AF110967、AF110968、AF110975、8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZA、8\_\_2\_\_TV1\_\_C.ZAまたは12-5\_\_1\_\_TV2\_\_C.ZA)である。HIVゲノムの種々の領域は、8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZAに対する番号付けと共に表Aに示される(図1A~1D)。従って、用語「Pol」は、以下のポリペプチドのうちの1つ以上をいう:ポリメラーゼ(p6Pol);プロテアーゼ(prot);逆転写酵素(p66RTまたはRT);RNAseH(p15RNAseH);および/またはインテグラーゼ(p31IntまたはInt)。任意の選択されたHIV単離株についての遺伝子領域の同定は、本明細書中に示される教示および当該分野で公知の情報に基づいて当業者によって実行され得る(例えば、8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZAに対するアライメント(図1A~1D)または他の既知のHIV単離株(例えば、遺伝子領域(例えば、SF2、GenBank登録番号K02007;SF162、GenBank登録番号M38428)を有するサブタイプB単離株、および遺伝子領域(例えば、GenBank登録番号AF110965およびGenBank登録番号AF110975)を有するサブタイプC単離株)に対するアライメントを実行することによる)。

【0039】

本明細書中で使用される場合は、用語「ウイルス様粒子」または「VLP」は、以下にさらに議論されるいくつかのウイルスのうちのいずれかに由来する、複製しないウイルス外皮をいう。VLPは、一般的には、キャプシドタンパク質、コートタンパク質、殻タンパク質、表面タンパク質、および/またはエンベロープタンパク質と呼ばれるタンパク質、あるいはこれらのタンパク質に由来する粒子形成ポリペプチド(これらに限定されない)のような、1つ以上のウイルスタンパク質から構成される。VLPは、適切な発現系中でタンパク質の組換え発現の際に自発的に形成し得る。粒子状のVLPを産生するための方法が、当該分野で公知であり、そして以下により完全に記載される。ウイルスタンパク質の組換え発現後のVLPの存在は、当該分野で公知の従来技術(例えば、電子顕微鏡分析、X線結晶解析など)を使用して検出され得る。例えば、Bakerら、Biophys.J.(1991)60:1445-1456;Hagenseeら、J.Virology.(1994)68:4503-4505を参照のこと。例えば、VLPは、密度勾配遠心分離によって単離され得、そして/または特徴的な密度のバンド形成によって同定され得る。あるいは、低温電子顕微鏡分析が、対象のVLP調製物のガラス状にされた水性サ

10

20

30

40

50

ンプル対して行われ得、そして適切な露出条件下で画像が記録され得る。

【0040】

特定のウイルスタンパク質に由来する「粒子形成ポリペプチド」によって、VLP形成に好ましい条件下でVLPを形成する能力を有する全長またはほぼ全長のウイルスタンパク質、ならびにそれらのフラグメント、または内部欠失を有するウイルスタンパク質が意味される。従って、そのポリペプチドは、全長の配列、フラグメント、短縮された配列および部分的な配列、ならびに参照分子のアナログおよび前駆体の形態を含み得る。従って、この用語は、ポリペプチドがVLPを形成する能力を維持している限りは、その配列に対する欠失、付加、および置換を意図する。従って、この用語は、特定のポリペプチドの天然のバリエーションを含む。なぜなら、コートタンパク質におけるバリエーションがしばしば、ウイルスの単離物間で存在するからである。この用語はまた、タンパク質がVLPを形成する能力を維持している限りは、参照のタンパク質中では天然には生じない欠失、付加、および置換を含む。好ましい置換は、天然で保存されている置換（すなわち、側鎖が関連するアミノ酸のファミリー内で生じる置換）である。詳細には、アミノ酸は、一般的に、4つのファミリーに分けられる：（1）酸性 - - アスパラギン酸およびグルタミン酸；（2）塩基性 - - リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性 - - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；ならびに（4）非荷電極性 - - グリシン、アスパラギン、グルタミン、シスチン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時折、芳香族アミノ酸として分類される。

10

20

【0041】

用語「HIVポリペプチド」とは、ネイティブHIVポリペプチド（例えば、Gag、Env、Prot、Pol、RT、Int、vif、vpr、vpu、tat、rev、nefおよび/またはその組み合わせ）に対して配列相同性を示す任意のアミノ酸配列および/または機能的な任意のアミノ酸配列をいう。HIVポリペプチドによって示され得る機能の非制限的な例としては、免疫原としての使用（例えば、体液性および/または細胞性の免疫応答を生成すること）、診断剤における使用（例えば、ELISAまたは他の免疫アッセイにおける使用のために適切な抗体により結合している）および/または野生型もしくは合成のHIVポリペプチドと関連する1つ以上の生物学的活性を示すポリペプチドが挙げられる。例えば、本明細書中で使用される場合、用語「Gagポリペプチド」は、1つ以上の抗Gag抗体によって結合されており；体液性および/または細胞性の免疫応答を惹起し；そして/または粒子を形成する能力を示す、ポリペプチドをいい得る。

30

【0042】

「抗原」とは、体液性および/または細胞性の抗原特異的応答を生じるように宿主免疫系を刺激する、1以上のエピトープを含む分子（線状、立体構造（conformational）のいずれか、またはその両方）をいう。この用語は、用語「免疫原」と交換可能に使用される。通常、B細胞エピトープは、少なくとも約5個のアミノ酸を含むが、3～4アミノ酸程度の少なさであり得る。T細胞エピトープ（例えば、CTLエピトープ）は、少なくとも約7～9個のアミノ酸を含み、そしてヘルパーT細胞エピトープは、少なくとも約12～20個のアミノ酸を含む。通常、エピトープは、約7と15との間のアミノ酸（例えば、9、10、12、または15個のアミノ酸）を含む。用語「抗原」は、サブユニット抗原（すなわち、天然で付随している生物全体から分離されそして別個である、抗原）、ならびに殺傷されたか、弱毒化されたか、または不活性化された、細菌、ウイルス、真菌、寄生生物、または他の微生物の両方を示す。抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）、またはそのフラグメントおよび合成ペプチドミモトープ（これは、抗原または抗原決定基を模倣し得る）もまた、本明細書中で使用される抗原の定義の下に捕捉される。同様に、例えば、遺伝子治療およびDNA免疫適用において、インピボで抗原または抗原決定基を発現するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドもまた、本明細書中の抗原の定義内に含まれる。

40

【0043】

50

本発明の目的のために、抗原は、以下により十分に記載されるように、いくつかの既知のウイルス、細菌、寄生生物および真菌のいずれかに由来し得る。この用語はまた、種々の腫瘍抗原のいずれかを意図する。さらに、本発明の目的のために、「抗原」は、タンパク質が本明細書中に定義されるような免疫学的応答を誘発する能力を維持する限り、ネイティブな配列に対する改変（例えば、欠失、付加および置換）（一般に天然で保存される）を含むタンパク質をいう。これらの改変は、部位特異的変異誘発を通してのように故意であってもよく、または抗原を産生する宿主の変異を通してのように偶然であってもよい。

#### 【0044】

抗原または組成物に対する「免疫学的応答」は、目的の組成物中に存在する抗原に対する体液性および/または細胞性の免疫応答の被験体における発生である。本発明の目的のために、「体液性免疫応答」とは、抗体分子により媒介される免疫応答をいい、一方、「細胞性免疫応答」は、Tリンパ球および/または他の白血球により媒介される免疫応答である。細胞性免疫の1つの重要な局面は、細胞傷害性T細胞（「CTL」）による抗原特異的応答に関する。CTLは、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）によりコードされるタンパク質と結合して存在しそして細胞表面上に発現される、ペプチド抗原に対する特異性を有する。CTLは、細胞内微生物の破壊またはこのような微生物に感染した細胞の溶解の誘導および促進を補助する。細胞性免疫の別の局面は、ヘルパーT細胞による抗原特異的応答に関する。ヘルパーT細胞は、それらの表面上にMHCと結合したペプチド抗原を提示する細胞に対する非特異的エフェクター細胞の機能を刺激し、そしてこの細胞に対する活性に焦点を当てることを補助するように作用する。「細胞性免疫応答」はまた、サイトカイン、ケモカイン、ならびに活性化T細胞および/または他の白血球（CD4+およびCD8+T細胞に由来するものを含む）により産生される他のこのような分子の産生をいう。

#### 【0045】

細胞性免疫応答を誘発する組成物またはワクチンは、細胞表面でMHC分子と結合している抗原の提示により、脊椎動物被験体を感作するように働き得る。この細胞媒介性免疫応答は、その細胞の表面に抗原を提示する細胞に、またはその付近に指向される。さらに、抗原特異的Tリンパ球は、免疫された宿主の将来的な防御を可能にするように生成され得る。

#### 【0046】

特定の抗原が細胞媒介性免疫学的応答を刺激する能力は、多くのアッセイによって（例えば、リンパ増殖（lymphoproliferation）（リンパ球活性化）アッセイ、CTL細胞傷害性細胞アッセイによってか、または感作された被験体における抗原に特異的なTリンパ球についてアッセイをすることによって）決定され得る。このようなアッセイは、当該分野において周知である。例えば、Ericksonら、J. Immunol. (1993) 151: 4189~4199; Doeら、Eur. J. Immunol. (1994) 24: 2369~2376を参照のこと。細胞媒介性免疫応答を測定する最近の方法は、細胞内サイトカインまたはT細胞集団によるサイトカイン分泌の測定、またはエピトープ特異的T細胞の測定（例えば、テトラマー技術による）を含む（McMichael, A. J., およびO'Callaghan, C. A., J. Exp. Med. 187(9) 1367~1371, 1998; Mcheyzer-Williams, M. G.ら、Immunol. Rev. 150: 5~21, 1996; Lalvanii, A.ら、J. Exp. Med. 186: 859~865, 1997）により総説される）。

#### 【0047】

従って、本明細書中で使用される免疫学的応答は、CTLの産生、および/またはヘルパーT細胞の産生もしくは活性化を刺激するものであり得る。目的の抗原はまた、抗体媒介性免疫応答を誘発し得る。従って、免疫学的応答は、以下の効果のうちの1以上を含み得る：B細胞による抗体の産生；ならびに/あるいは目的の組成物またはワクチン中に存

10

20

30

40

50

在する抗原に対して特異的なサブレッサーT細胞および/または T細胞の活性化。これらの応答は、感染性を中和し、そして/あるいは抗体-補体、または抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を媒介して、免疫された宿主に対する防御を提供するように働き得る。このような応答は、当該分野において周知である、標準的な免疫アッセイおよび中和アッセイを使用して決定され得る。

**【0048】**

「免疫原性組成物」は、被験体への組成物の投与が、目的の抗原性分子に対する被験体における体液性免疫応答/細胞性免疫応答の発生を生じる、抗原性分子を含む組成物である。免疫原性組成物は、例えば、注射、吸入、経口、鼻腔内、および粘膜(例えば、直腸内または膈内)投与によって、レシピエント被験体に直接導入され得る。

10

**【0049】**

「サブユニット」ワクチンとは、目的の病原体由来(例えば、ウイルス、細菌、寄生生物または真菌由来)の抗原に由来するかまたはそれに相同である、1以上の選択された抗原(しかし、全ての抗原ではない)を含むワクチン組成物を意味する。このような組成物は、インタクトな病原体細胞もしくは病原性粒子、またはこのような細胞もしくは粒子の溶解物を実質的に含まない。従って、「サブユニットワクチン」は、病原体から少なくとも部分的に精製された(好ましくは、実質的に精製された)免疫原性ポリペプチドまたはそのアナログから調製され得る。従って、サブユニットワクチンに含まれる抗原を入手する方法は、標準的な精製技術、組換え産生、または合成産生を含み得る。

20

**【0050】**

「実質的に精製される(た)」とは、一般に、物質(化合物、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ポリペプチド組成物)が、存在するサンプルの主要な割合を含むように、その物質を単離することをいう。代表的には、サンプル中に、実質的に精製された成分は、このサンプルの50%、好ましくは80~85%、より好ましくは90~95%を含む。目的のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを精製するための技術は、当該分野において周知であり、そして例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、および密度に従う沈降が挙げられる。

**【0051】**

「コード配列」または選択されたポリペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列(または「制御エレメント」)の制御下に置かれた場合、インピボで転写され(DNAの場合)、そしてポリペプチドに翻訳される(mRNAの場合)核酸分子である。コード配列の境界は、5'(アミノ)末端の開始コドンおよび3'(カルボキシ)末端の翻訳終止コドンによって決定される。コード配列には、ウイルス由来のcDNA、原核生物または真核生物のmRNA、ウイルスまたは原核生物DNA由来のゲノムDNA配列、および合成DNA配列さえも含まれ得るが、これらに限定されない。終止コドンのような転写終結配列は、コード配列に対して3'に位置され得る。

30

**【0052】**

代表的な「制御エレメント」には、転写プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終結シグナル、ポリアデニル化配列(翻訳終止コドンに対して3'に位置する)、翻訳の開始の最適化のための配列(コード配列に対して5'に位置する)、および翻訳終結配列が含まれるが、これらに限定されない。例えば、本明細書中に記載される配列および/またはベクターはまた、転写および/または終結を最適化し得る1つ以上のさらなる配列を含み得、これらとしては、コドン最適化野生型リーダーのATGの前(5')に位置するKozak配列(例えば、GCCACC、配列番号191のヌクレオチド1~6)、または任意の他の適切なリーダー配列(例えば、tpa1、tpa2、wtLnat(ネイティブ野生型リーダー))またはコード配列の後(3')に位置する終結配列(例えば、TAA、または好ましくはTAAA、配列番号191のヌクレオチド1978~1981)が挙げられるが、これらに限定されない。

40

**【0053】**

「ポリヌクレオチドコード配列」または選択されたポリペプチドを「コード」する配列

50

は、核酸分子であり、これは、適切な調節配列（または「制御エレメント」）の制御下で配置される場合、インピトロで（DNAの場合に）転写され、そして（mRNAの場合に）ポリペプチドに翻訳される。コード配列の境界は、開始コドン（例えば、5'末端またはその付近）および翻訳終止コドン（例えば、3'末端またはその付近）によって決定される。例示的なコード配列は、本発明の改変されたウイルスのポリペプチドコード配列である。本発明のポリヌクレオチド配列のコード領域は、当業者によって同定可能であり、そして例えば、ポリヌクレオチドの3つ全てのフレームの翻訳を実行すること、およびコードされたポリペプチド（例えば、nef由来のポリペプチドをコードする本発明の合成nefポリヌクレオチド）に対応するフレームを同定することによって、容易に同定され得る。転写終結配列は、コード配列の3'に位置され得る。代表的な「制御エレメント」としては、転写レギュレーター（例えば、プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終結シグナル、およびポリアデニル化配列）；および転写レギュレーター（例えば、翻訳の開始を最適化するための配列（例えば、Shine-Dalgarno（リボソーム結合部位）配列、Kozak配列（すなわち、翻訳、配置の最適化のための配列（例えば、コード配列の5'））、リーダー配列、翻訳開始コドン（例えば、ATG）、および翻訳終結配列）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、1つ以上の翻訳調節配列または翻訳開始配列（例えば、リーダー配列）が、野生型翻訳開始配列（すなわち、そのネイティブ状態におけるコード領域の翻訳を調節する配列）に由来する。本明細書中に記載される方法を用いて改変されている野生型リーダー配列もまた、本発明における使用が見出される。プロモーターは、誘導性プロモーター（ここで、プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補因子、調節タンパク質などによって誘導される）、抑制プロモーター（ここで、プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補因子、調節タンパク質などによって誘導される）、および構築プロモーターを含み得る。

10

20

**【0054】**

「核酸」分子には、原核生物配列、真核生物mRNA、真核生物mRNA由来のcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）DNA由来のゲノムDNA配列、および合成DNA配列さえも含まれ得るが、これらに限定されない。その用語はまた、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかを含む配列を捕捉する。

30

**【0055】**

「作動可能に連結した」は、エレメントの配置をいい、ここで、そのように記載された成分は、それらの機能を行うように構成されている。従って、コード配列に作動可能に連結した所定のプロモーターは、その適切な酵素が存在する場合、コード配列の発現をもたらし得る。そのプロモーターは、その発現を指向するように機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、転写はされるが翻訳はされない介在配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてプロモーター配列はなお、コード配列に「作動可能に連結」していると考えられ得る。

**【0056】**

本明細書において、核酸分子を記載するために使用される「組換え」は、その起源または操作により、（1）天然において結合しているポリヌクレオチドの全てまたは一部と結合していない；および/または（2）天然において結合している以外のポリヌクレオチドに連結している、ゲノム、cDNA、半合成または合成の起源のポリヌクレオチドを意味する。タンパク質またはポリペプチドに関して使用される用語「組換え」は、組換えポリヌクレオチドの発現によって生成されるポリペプチドを意味する。「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞株」、「細胞培養物」、および単細胞部分として培養された原核生物微生物または真核生物細胞株を示すそのような他の用語は、互換的に使用され、そして組換えベクターまたはその他の移入DNAのためのレシピエントとして使用され得るか、または使用されている細胞のことをいい、そしてトランスフェクトされている元の細胞の子孫を含む。単一の親細胞の子孫は、偶発的な変異または意図的な変異に起因して、必ずしも、形態学上、または元の親に相補的なゲノムもしくは全DNAにおいて完

40

50

全に同一でなくてもよいことが理解される。関連する特性（例えば、所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在）によって特徴づけられるべき親に十分に類似している親細胞の子孫は、この定義によって意図される子孫に含まれ、そして上記の用語によって包含される。

【0057】

アミノ酸配列「類似性」を決定するための技術は、当該分野で周知である。一般に、「類似性」は、アミノ酸が同一であるか、または類似の化学的および/または物理的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する適切な部位での2つ以上のポリペプチドの正確なアミノ酸対アミノ酸の比較を意味する。次いで、いわゆる「パーセント同一性」は、比較したポリペプチド配列間で決定され得る。核酸およびアミノ酸配列の同一性を決定するための技術もまた、当該分野で周知であり、その遺伝子に対するmRNAのヌクレオチド配列を決定する（通常、cDNA中間体を介して）こと、およびそれによりコードされるアミノ酸配列を決定すること、およびこれを第2のアミノ酸配列と比較することを包含する。一般に、「同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の、それぞれの、正確なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の対応をいう。

10

【0058】

2つ以上のポリヌクレオチド配列は、それらの「パーセント同一性」を決定することによって比較され得る。2つ以上のアミノ酸配列は、同様に、「パーセント同一性」を決定することによって比較され得る。2つの配列のパーセント同一性（核酸またはペプチド配列が一般に記載されているか否か）は、一般に、より短い配列の長さによって除算され、そして100を積算された2つの整列された配列間の正確な整合の数として記載される。核酸配列についてのおよその整列は、SmithおよびWaterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981)の局所的な相同性アルゴリズムによって提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff編、5補遺、3:353-358、National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USAによって開発され、そしてGriskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763 (1986)によって正規化された、スコア付けマトリックスを使用して、ペプチド配列を用いて使用するために拡張され得る。核酸配列およびペプチド配列についてのこのアルゴリズムの実行は、それらのBestFitユーティリティアプリケーションにおいてGenetics Computer Group (Madison, WI)によって提供される。この方法についてのデフォルトパラメータは、Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (Genetics Computer Group, Madison, WIより入手可能)に記載される。配列間のパーセント同一性または類似性を計算するための他の等しく適切なプログラムは、当該分野で一般に公知である。

20

30

【0059】

例えば、特定のヌクレオチド配列の、参照配列に対するパーセント同一性は、SmithおよびWatermanの相同性アルゴリズムを、デフォルトスコア付け表および6ヌクレオチド位置のギャップペナルティを用いて使用して決定され得る。本発明の状況においてパーセント同一性を確立するための別の方法は、John F. CollinsおよびShane S. Sturrokによって開発され、そしてIntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA)によって頒布されているUniversity of Edinburghに著作権の帰属するプログラムのMPSRCHパッケージを使用することである。このパッケージソフトから、Smith-Watermanアルゴリズムが、スコア付表（例えば、12のギャップオープンペナルティ、1のギャップ拡張ペナルティ、および6のギャップ）について使用されるデフォルトパラメータが使用される場合に、利用され得る。作成されたデータから、「マッチ」値は、「

40

50

配列同一性」を反映する。配列間のパーセント同一性または類似性を計算するための他の適切なプログラム（例えば、整列プログラム B L A S T（これはデフォルトパラメータでも使用され得る））は、一般に、当該分野で公知である。例えば、B L A S T N および B L A S T P は、以下のデフォルトパラメータでも使用され得る：遺伝子コード = 標準；フィルター = なし；鎖 = 両方；カットオフ = 60；予想 = 10；マトリックス = B L O S U M 6 2；記載 = 50 配列；選別 = 高スコア；データベース = 非縮重、G e n b a n k + E M B L + D D B J + P D B + G e n b a n k C D S t r a n s l a t i o n s + S w i s s p r o t e i n + S p u p d a t e + P I R。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスで見出され得る：<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>。

10

#### 【0060】

当業者は、所定の配列について使用するための適切な検索パラメータを容易に決定し得、例示的な好ましい S m i t h W a t e r m a n ベースのパラメータが上記される。例えば、検索パラメータは、問題の配列のサイズに基づいて変化し得る。従って、本発明のポリヌクレオチド配列について、本明細書中に開示されるポリヌクレオチド配列の長さは、選択されたデータベースに対して検索され、そして本質的に同じ長さの配列と比較されて % 同一性を決定する。例えば、本発明の代表的な実施形態は、X 個の連続するヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチドを含み、ここで、(i) X 個の連続するヌクレオチドは、本明細書中に記載される配列（表 C）の 1 つ以上の Y 個の連続したヌクレオチドまたはそのフラグメントに関して、少なくともほぼ選択されたレベルの % 同一性を有し、

20

#### 【0061】

本発明の配列は、例えば、約 15 ヌクレオチドから本明細書中に記載される全長配列（例えば、図を参照のこと）に存在するヌクレオチドの数まで（上記範囲内の全ての整数値を含む）の配列フラグメントを含み得る。例えば、本発明のポリヌクレオチド配列のフラグメントは、30 ~ 60 ヌクレオチド、60 ~ 120 ヌクレオチド、120 ~ 240 ヌクレオチド、240 ~ 480 ヌクレオチド、480 ~ 1000 ヌクレオチド、およびこれらの間の全ての整数値であり得る。

30

#### 【0062】

本発明の合成の発現カセット（および精製したポリヌクレオチド）には、本明細書に開示される合成の発現カセット配列および / またはポリヌクレオチド配列に対して（例えば、本発明の配列）、本発明の配列が、（例えば、配列のデータベースに対する）問い合わせ配列として使用された場合に、約 80 % ~ 100 % の、80 ~ 85 % より大きい、好ましくは、90 ~ 92 % より大きい、より好ましくは、95 % より大きい、そして最も好ましくは、98 % より大きい 100 % までの配列同一性（これらの記載の範囲に入る全ての整数値を含む）有する関連するポリヌクレオチド配列が含まれる。

#### 【0063】

2 つの核酸フラグメントは、本明細書に記載される場合、「選択的にハイブリダイズ」と考えられる。2 つの核酸分子間の配列同一性の程度は、このような分子間のハイブリダイゼーション事象の効率および強度に影響を及ぼす。部分的に同一の核酸配列は、少なくとも部分的に、完全に同一な配列が標的分子にハイブリダイズすることを阻害する。完全に同一な配列のハイブリダイゼーションの阻害は、当該分野で周知のハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、サザンプロット、ノーザンプロット、溶液ハイブリダイゼーションなど、S a m b r o o k ら、前出、または A u s u b e l ら、前出を参照）を使用して評価され得る。このようなアッセイは、例えば、低ストリンジェントから高ストリンジェントまでの種々の条件を使用して、種々の程度の選択性を使用して行われ得る。低ストリンジェンシー条件が利用される場合、非特異的結合の不在は、非特異的な結合事象の非存在下で、二次プローブが標的にハイブリダイズしないように、部分的な程度の配列同

40

50

一性を欠損する二次プローブ（例えば、標的分子と約30%よりも少ない配列同一性を有するプローブ）を使用することによって評価され得る。

【0064】

ハイブリダイゼーションに基づく検出システムが利用される場合、標的核酸配列に対して相補的な核酸プローブが選択され、次いで適切な条件の選択により、そのプローブおよび標的配列が、互いに、「選択的にハイブリダイズする」か、結合して、ハイブリッド分子を形成する。「中程度のストリンジェント」な条件下で標的配列に選択的にハイブリダイズし得る核酸分子は、代表的には、選択された核酸プローブの配列と少なくとも約70%の配列同一性を有する少なくとも約10~14個のヌクレオチド長の標的核酸配列の検出を可能にする条件下でハイブリダイズする。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、代表的には、選択された核酸プローブの配列と約90~95%より大きな配列同一性を有する少なくとも約10~14個のヌクレオチド長の標的核酸配列の検出を可能にする。プローブと標的が特定の程度の配列同一性を有するプローブ/標的ハイブリダイゼーションのために有用なハイブリダイゼーション条件は、当該分野で公知なように決定され得る（例えば、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach、B. D. HamesおよびS. J. Higgins 編、(1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press）。

10

【0065】

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

20

【0066】

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

30

【0067】

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

【0068】

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

40

【0069】

「コードされる」とは、ポリペプチド配列をコードする核酸配列に関連し、ここでこのポリペプチド配列またはその一部は、この核酸配列によりコードされるポリペプチドに由来する、少なくとも3~5個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも8~10個のアミノ酸、そしてさらにより好ましくは少なくとも15~20個のアミノ酸からなる配列を含む。免疫学的にこの配列によってコードされるポリペプチドと同一視され得るポリペプチド配列もまた含まれる。さらに、ポリタンパク質は、ポリペプチドまたはペプチド産物をコ

50

ードする、2つ以上のポリヌクレオチド配列をインフレーム融合することによって構築され得る。さらに、ポリシストロン (polycistronic) コード配列は、互いに隣接するポリペプチド産物をコードする2つ以上のポリヌクレオチド配列を、典型的には1つのプロモーターの制御下に、配置することで産生され得、ここで各ポリペプチドコード配列は、内部リボソーム結合部位に対する配列を含むよう改変され得る。

#### 【0070】

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

10

#### 【0071】

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

20

#### 【0072】

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

#### 【0073】

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

30

#### 【0074】

用語「トランスフェクション」は、外来DNAの、細胞による取り込みを示すために使用される。外因性DNAが細胞膜内に導入された場合、細胞は、「トランスフェクト」されている。多くのトランスフェクション技術は、当該分野で一般に公知である。例えば、Grahamら (1973) *Virology*, 52: 456, Sambrookら (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davisら (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier、およびChuら (1981) *Gene* 13: 197を参照のこと。このような技術を用いて、1つ以上の外来DNA部分を、適切な宿主細胞中に導入し得る。この用語は、遺伝子物質の安定な取り込みおよび一過性の取り込みの両方を意味し、そしてペプチド結合DNAまたは抗体結合DNAの取り込みを含む。

40

#### 【0075】

「ベクター」は、遺伝子配列を、標的細胞へ移入し得る (例えば、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、粒子性キャリアおよびリボソーム)。典型的には、「ベクター構築

50

物」、「発現ベクター」および「遺伝子移入ベクター」は、目的の遺伝子発現を指向し得る任意の核酸構築物をいい、これらは、遺伝子配列を、標的細胞に移入し得る。従って、この用語は、クローニングおよび発現ビヒクル、ならびにウイルスベクターを含む。

【0076】

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

10

【0077】

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

20

【0078】

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

【0079】

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

30

【0080】

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

40

【0081】

「生理学的 pH」または「生理学的範囲にある pH」とは、約 7.0 ~ 8.0 に含まれる範囲にある pH を意味し、より典型的には、約 7.2 ~ 7.6 に含まれる範囲にある。

【0082】

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

【0083】

50

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

【0084】

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

【0085】

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

【0086】

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

【0087】

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

【0088】

「プロデューサー細胞」または「ベクター産生細胞」とは、組換えレトロウイルスベク

10

20

30

40

50

ター粒子の産生のために必要な全てのエレメントを含む細胞をいう。

【0089】

(2. 本発明を実行する様式)

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

【0090】

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

10

【0091】

(2.1.0. HIVゲノム)

HIVゲノムおよび種々のポリペプチドコード領域を、表Aに示す。ヌクレオチド位置は、8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZA(図1; HIV C型単離株)に対して与えられる。しかし、本発明の開示の技術の観点から、例えば、配列比較プログラム(例えば、本明細書中に記載されるBLASTなど)または構造的特徴の同定およびアラインメント(例えば、種々の領域を同定し得る、本明細書中に記載される「ALB」プログラムのようなプログラム)を使用して、他のHIV株または改変体(例えば、単離株HIV<sub>IIIB</sub>、HIV<sub>SF2</sub>、HIV-1<sub>SF162</sub>、HIV-1<sub>SF170</sub>、HIV<sub>LAV</sub>、HIV<sub>LAI</sub>、HIV<sub>MN</sub>、HIV-1<sub>CM235</sub>、HIV-1<sub>US4</sub>)、種々のサブタイプ由来の他のHIV-1株(例えば、サブタイプA~G、およびO)、HIV-2株および種々のサブタイプ(例えば、HIV-2<sub>UC1</sub>およびHIV-2<sub>UC2</sub>)、ならびにサル免疫不全ウイルス(SIV)(これらおよび他の関連のウイルスの記載について、例えば、Virology、第三版(W.K. Joklik編、1988); Fundamental Virology、第二版(B.N. FieldsおよびD.M. Knipe編、1991); Virology、第三版(Fields, BN, DM Knipe, PM Howley、編者、1996、Lippincott-Raven、Philadelphia, PA)を参照のこと)中の対応する領域を決定する方法は、当業者に容易に明らかである。

20

30

【0092】

(表A: 8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZAに関するHIVゲノム領域)

【0093】

【表A】

領域	ヌクレオチド配列中の位置
5'LTR	1-636
U3	1-457
R	458-553
U5	554-636
NFκB II	340-348
NFκB I	354-362
Sp1 III	379-388
Sp1 II	390-398

40

【0094】

## 【表 A A】

Sp1 I	400-410	
TATA ボックス	429-433	
TAR	474-499	
ポリ A シグナル	529-534	
<b>PBS</b>	<b>638-655</b>	
<b>p7 結合領域、パッケージングシグナル</b>	<b>685-791</b>	10
<b>Gag:</b>	<b>792-2285</b>	
p17	792-1178	
p24	1179-1871	
シクロフェリン A bdg.	1395-1505	
MHR	1632-1694	
p2	1872-1907	
p7	1908-2072	
フレームシフトスリップ	2072-2078	20
p1	2073-2120	
p6Gag	2121-2285	
Zn-モチーフ I	1950-1991	
Zn-モチーフ II	2013-2054	
<b>Pol:</b>	<b>2072-5086</b>	
p6Pol	2072-2245	
Prot	2246-2542	
p66RT	2543-4210	
p15RNaseH	3857-4210	30
p31Int	4211-5086	
<b>Vif:</b>	<b>5034-5612</b>	
親水性領域	5292-5315	
<b>Vpr:</b>	<b>5552-5839</b>	
オリゴマー形成	5552-5677	
両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス	5597-5653	40
<b>Tat:</b>	<b>5823-6038 および 8417-8509</b>	
Tat-1 エキソン	5823-6038	
Tat-2 エキソン	8417-8509	
N-末端ドメイン	5823-5885	

## 【表 A B】

トランス活性化ドメイン	5886-5933	
形質導入ドメイン	5961-5993	
<b>Rev:</b>	<b>5962-6037 および 8416-8663</b>	
Rev-1 エキソン	5962-6037	
Rev-2 エキソン	8416-8663	
高親和性 bdg. 部位	8439-8486	
Leu-リッチエフェクタードメイン	8562-8588	10
<b>Vpu:</b>	<b>6060-6326</b>	
膜貫通ドメイン	6060-6161	
細胞質ドメイン	6162-6326	
<b>Env (gp160):</b>	<b>6244-8853</b>	
シグナルペプチド	6244-6324	
gp120	6325-7794	
V1	6628-6729	20
V2	6727-6852	
V3	7150-7254	
V4	7411-7506	
V5	7663-7674	
C1	6325-6627	
C2	6853-7149	
C3	7255-7410	
C4	7507-7662	
C5	7675-7794	30
CD4 結合	7540-7566	
gp41	7795-8853	
融合タンパク質	7789-7842	
オリゴマー形成ドメイン	7924-7959	
N-末端 7 回反復	7921-8028	
C-末端 7 回反復	8173-8280	
免疫優性領域	8023-8076	
<b>Nef:</b>	<b>8855-9478</b>	
ミリストイル化	8858-8875	40
SH3 結合	9062-9091	
ポリプリン路	9128-9154	
SH3 結合	9296-9307	

## 【 0 0 9 6 】

当業者が、表 A に示される任意の配列を整列させて、任意の特定の HIV 遺伝子の相対的な位置を容易に決定し得ることは、容易に明らかである。例えば、本明細書中に記載されるアラインメントプログラムの 1 つ (例えば、BLAST) を使用して、他の HIV ゲノム配列を、8\_\_5\_\_TV1\_\_C.ZA と共に整列させて (表 A)、遺伝子の位置を決定し得る。ポリペプチド配列も同様に整列し得る。例えば、図 2 A ~ 2 C は、種々の株由来

の Env ポリペプチド配列の、SF-162 に対するアラインメントを示す。共有に係る WO/39303 に詳細に記載されるように、Env ポリペプチド（例えば、gp120、gp140 および gp160）は、シートを形成する 4 つのアンチパラレル鎖（-2、-3、-20 および -21）からなる「架橋（bridging）シート」を含む。1 つの対の鎖（-2 および -3）からの突出は、2 つのループ（V1 および V2）である。SF-162 に対して、この -2 シートは、ほぼアミノ酸残基 113（Cys）～アミノ酸残基 117（Thr）を占めるが、-3 は、ほぼアミノ酸残基 192（Ser）～アミノ酸残基 194（Ile）を占める。この「V1/V2 領域」は、SF-162 に対して、ほぼアミノ酸残基 120（Cys）～アミノ酸残基 189（Cys）を占める。鎖の第二の対（-20 および -21）からの突出は、「小ループ」構造であり、本明細書中で「架橋シート小ループ」とも称される。小ループおよび架橋シート小ループの両方の位置は、本明細書中および WO/39303 の技術に従って、HXB-2 に対して決定され得る。図 2A～2C において、矢印によって、シート領域からの欠失配列のおおよその部位もまた示される。「\*」は、本明細書の技術に従って変異され得る N グリコシル化部位を示す。

10

## 【0097】

（2.1.1. 野生型 HIV 配列）

種々の新規サブタイプ C 新規単離物の単離されたヌクレオチド配列を、以下の図 A1 に示す。配列を、Engelbrecht ら（2001）AIDS Res. Hum. Retroviruses 17（16）：1533 - 1547 に記載されるように得、そして分析した（例えば、系統樹分析）（GeneBank もまた参照のこと）。付属のタンパク質配列およびこれらのタンパク質の分析は、Scriba ら（2001）AIDS Res. Hum. Retroviruses 17（8）775 - 781 に記載される。

20

## 【0098】

（表 A1：野生型配列）

## 【0099】

【表 A 1】

名前	配列番号	図の番号	説明
<i>Env</i> TV001c8.2	61	58 (2シート)	単離 C-98TV001 のクローン TV001c8.2 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV001c8.5	62	59 (2シート)	単離 C-98TV001 のクローン TV001c8.5 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV001c12.1	63	60 (2シート)	単離 C-98TV002 のクローン TV001c12.1 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV003cE260	64	61 (2シート)	単離 C-98TV003 のクローン TV003cE260 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV004cC300	65	62 (2シート)	単離 C-98TV004 のクローン TV004cC300 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV006c9.1	66	63 (2シート)	単離 C-98TV006 のクローン TV006c9.1 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV006c9.2	67	64 (2シート)	単離 C-98TV006 のクローン TV006c9.2 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV006cE9	68	65 (2シート)	単離 C-98TV006 のクローン TV006cE9 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV007cB104	69	66 (2シート)	単離 C-98TV007 のクローン TV007cB104 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV007cB105	70	67 (2シート)	単離 C-98TV007 のクローン TV007cB105 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV008c4.3	71	68 (2シート)	単離 C-98TV008 のクローン TV008c4.3 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV008c4.4	72	69 (2シート)	単離 C-98TV008 のクローン TV008c4.4 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV010cD7	73	70 (2シート)	単離 C-98TV010 のクローン TV010cD7 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV012c2.1	74	71 (2シート)	単離 C-98TV012 のクローン TV012c2.1 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV012c2.2	75	72 (2シート)	単離 C-98TV012 のクローン TV012c2.2 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV013cB20	76	73 (2シート)	単離 C-98TV013 のクローン TV013cB20 の完全 <i>Env</i> 配列

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

【表 A 1 A】

名前	配列番号	図の番号	説明
<i>Env</i> TV013cH17	77	74 (2シート)	単離 C-98TV013 のクローン TV013cH17 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV014c6.3	78	75 (2シート)	単離 C-98TV014 のクローン TV014c6.3 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV014c6.4	79	76 (2シート)	単離 C-98TV014 のクローン TV014c6.4 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV018cF1027	80	77 (2シート)	単離 C-98TV018 のクローン TV018cF1027 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Env</i> TV019c5	81	78 (2シート)	単離 C-98TV019 のクローン TV019c5 の完全 <i>Env</i> 配列
<i>Gag</i> TV001G8	82	79	単離 C-98TV001 のクローン TV001G8 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV001G11	83	80	単離 C-98TV001 のクローン TV001G11 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV002G8	84	81	単離 C-98TV002 のクローン TV002G8 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV003G15	85	82	単離 C-98TV003 のクローン TV003G15 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV004G17	86	83	単離 C-98TV004 のクローン TV004G17 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV004G24	87	84	単離 C-98TV004 のクローン TV004G24 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV006G11	88	85	単離 C-98TV006 のクローン TV006G11 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV006G97	89	86	単離 C-98TV006 のクローン TV006G97 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV007G59	90	87	単離 C-98TV009 のクローン TV007G59 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV008G65	91	88	単離 C-98TV008 のクローン TV008G65 の完全 <i>Gag</i> 配列
<i>Gag</i> TV008G66	92	89	単離 C-98TV008 のクローン TV008G66 の完全 <i>Gag</i> 配列

10

20

30

40

【 0 1 0 1 】

【表 A 1 B】

名前	配列番号	図の番号	説明
Gag TV010G74	93	90	単離 C-98TV010 のクローン TV010G74 の完全 Gag 配列
Gag TV012G34	94	91	単離 C-98TV012 のクローン TV012G34 の完全 Gag 配列
Gag TV012G40	95	92	単離 C-98TV012 のクローン TV012G40 の完全 Gag 配列
Gag TV013G2	96	93	単離 C-98TV013 のクローン TV013G2 の完全 Gag 配列
Gag TV013G15	97	94	単離 C-98TV013 のクローン TV013G15 の完全 Gag 配列
Gag TV014G73	98	95	単離 C-98TV014 のクローン TV014G73 の完全 Gag 配列
Gag TV018G60	99	96	単離 C-98TV018 のクローン TV018G60 の完全 Gag 配列
Gag TV019G20	100	97	単離 C-98TV019 のクローン TV019G20 の完全 Gag 配列
Gag TV019G25	101	98	単離 C-98TV019 のクローン TV019G25 の完全 Gag 配列
8_2_TV1 LTR	181	102 (2シート)	8_2_TV1と命名されたクローンの3'領域からの配列
2_1/4_TV12_C_ZA	182	103 (5シート)	2_1/4_TV12_C_ZA の配列

10

20

30

## 【0102】

(2.2.0 合成発現カセット)

本発明の1つの局面は、例えば、対応する野生型配列と比較して改善された発現を有する、HIV-1コード配列ならびに関連の配列の作製である。

## 【0103】

(2.2.1 HIV-1核酸コード配列の改変)

第1に、得られる核酸コード配列が、高度に発現されるヒト遺伝子に見出されるコドン使用法に匹敵するように、HIV-1コドン使用法パターンを改変した。HIVコドン使用法は、コドントリプレットのヌクレオチドAまたはTの高い含量を反映する。HIV-1コドン使用法の効果は、DNA配列における高いAT含量であり、減少した翻訳能力およびmRNAの不安定性をもたらす。比較すると、高度に発現されるヒトコドンは、ヌクレオチドGまたはCを好む。HIVコード配列は、高度に発現されるヒト遺伝子において見出されるコドン使用法に匹敵するように改変された。

40

## 【0104】

第2に、例えば、Gagコード配列のコード配列内に位置する、阻害性(または不安定性)エレメント(INS)が存在する。RREは、HIVコードRev-タンパク質と相互作用して、INSの発現下方調節の影響を克服する二次RNA構造である。RREおよびRevの転写後活性化機構を克服するために、不安定性エレメントは、コードされるタ

50

ンパク質のリーディングフレームを変更しない複数の点変異を導入することによって不活化され得る。

【0105】

第3に、いくつかの遺伝子に関して、このコード配列は、ポリヌクレオチドコード配列が不活性または非機能的である遺伝子産物（例えば、不活性化ポリメラーゼ遺伝子産物、不活性化プロテアーゼ遺伝子産物、不活性化tat遺伝子産物、不活性化rev遺伝子産物、不活性化nef遺伝子産物、不活性化vif遺伝子産物、不活性化vpr遺伝子産物、および/または不活性化vpu遺伝子産物）をコードするように変更される。実施例1は、いくつかの例示的な変異を記載する。実施例8は、変異Tat抗原、変異Rev抗原および変異Nef抗原の機能的な分析に関する情報を示す。

10

【0106】

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

【0107】

Gagポリペプチドコード配列の改変は、多数の哺乳動物細胞株（および他の型の細胞株であって、昆虫細胞が挙げられるが、これに限定されない）の野生型コード配列に対して改善された発現を生じる。

【0108】

Gag含有ポリペプチドをコードするいくつかの例示的なポリヌクレオチド配列は、以下：

20

【0109】

【数4】

GagComplPolmut\_C, GagComplPolmutAtt\_C,

GagComplPolmutIna\_C, GagComplPolmutInaTatRevNef\_C, GagPolmut\_C,

GagPolmutAtt\_C, GagPolmutIna\_C, GagProtInaRTmut\_C,

GagProtInaRTmutTatRevNef\_C, GagRTmut\_C, GagRTmutTatRevNef\_C,

GagTatRevNef\_C, および gp120mod.TV1.del118-210

30

【0110】

である。

【0111】

同様に、本発明はまた、合成Envコードポリヌクレオチドおよび改変Envタンパク質であって、例えば、以下が挙げられる：

【0112】

【数5】

gp120mod.TV1.del118-210,

40

gp120mod.TV1.delV1V2, gp120mod.TV1.delV2, gp140mod.TV1.del118-210,

gp140mod.TV1.delV1V2, gp140mod.TV1.delV2, gp140mod.TV1.mut7,

gp140mod.TV1.tpa2, gp140TMmod.TV1, gp160mod.TV1.del118-210,

gp160mod.TV1.delV1V2, gp160mod.TV1.delV2, gp160mod.TV1.dV1,

gp160mod.TV1.dV1-gagmod.BW965, gp160mod.TV1.dV1V2-gagmod.BW965,

gp160mod.TV1.dV2-gagmod.BW965, gp160mod.TV1.tpa2, および gp160mod.TV1-

gagmod.BW965。

50

## 【0113】

得られた核酸コード配列が、高度に発現されるヒト遺伝子において見出されたコドン使用法に匹敵されるように、Envのコドン使用法パターンを、Gagに関して上述したように改変した。本発明の支持において実施された実施例は、合成Env配列が、天然のEnv配列と比較して高いレベルのタンパク質を産生し得ることを示す。

## 【0114】

Envポリペプチドコード配列の改変は、多数の哺乳動物細胞株（および他の型の細胞株であって、昆虫細胞が挙げられるが、これに限定されない）の野生型コード配列と比較して改善された発現を生じる。類似のPolポリペプチドコード配列（Gagについて上述したものを含む）が、種々の単離物からの改善された発現について得られ、改変され、そして試験され得る。

10

## 【0115】

Envのさらなる改変としては、その中に変異および/または欠失を有するEnvポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを生成することが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、超可変領域（V1および/またはV2）は、本明細書中に記載されるように欠失され得る。さらに、例えば、Env内の架橋シート領域および/またはN-グリコシル化部位に対する他の改変はまた、本明細書の教示に従って実施され得る。（図2A~C、ならびにWO 00/39303、WO 00/39302、WO 00/39304、WO 02/04493を参照のこと）。これらの改変の種々の組み合わせを使用して、本明細書中に記載されるような合成発現カセットを作製し得る。

20

## 【0116】

本発明はまた、合成Pol配列を含む発現カセットを含む。上記のように、「Pol」は、ポリメラーゼ、プロテアーゼ、逆転写酵素および/またはインテグラーゼを含有する配列を含むタンパク質-コード領域が挙げられるが、これらに限定されない（Wanら（1996）*Biochem. J.* 316:569~573; Kohlら（1988）*PNAS USA* 85:4686~4690; Krausslichら（1988）*J. Virol.* 62:4393~4397; Coffin, 「*Retroviridae and their Replication*」*Virology*, 第1437~1500（Raven, New York, 1990）; Patelら（1995）*Biochemistry* 34:5351~5363）。従って、本明細書中に例示される合成発現カセットは、1以上のこれらの領域、および生じるアミノ酸配列に対する1以上の変化を含む。Pol誘導体化ポリペプチドをコードする、いくつかの例示的なポリヌクレオチド配列は、表Cに示される。

30

## 【0117】

生じる核酸コード配列が、高度に発現されるヒト遺伝子において見出されたコドン使用法に匹敵するように、Polのコドン使用法パターンを、GagおよびEnvに関して上述したように改変した。

## 【0118】

構築物は、種々の方法で改変され得る。例えば、この発現構築物は、インテグラーゼポリペプチドの最初の6アミノ酸をコードする配列を含み得る。この6アミノ酸領域は、HIVプロテアーゼによって認識される切断認識部位を提供すると考えられる（例えば、McCornackら（1997）*FEBS Letts* 414:84~88を参照のこと）。構築物は、1つ以上の導入遺伝子の挿入のための、マルチクロニングサイト（MCS）を、代表的にはこの構築物の3'末端に含み得る。さらに、RTにおいて触媒中心から誘導された触媒中心エピトープをコードするカセットは、代表的に、インテグラーゼの6アミノ酸をコードする配列を3'末端に含んだ。このカセットは、RTのIle178~セリン191をコードし、そしてこの十分に保存された領域を、可能なCTLエピトープとして維持するために添加され得る。さらに、これらの構築物は、リーディングフレームを保存する挿入変位を含む（例えば、Parkら（1991）*J. Virol.* 65:5111を参照のこと）。

40

50

## 【0119】

特定の実施形態において、RTの触媒中心および/またはプライマーグリップ領域が、  
改変される。RTの触媒中心およびプライマーグリップ領域は、例えば、Patelら(1995) Biochem. 34:5351およびPalaniappanら(1997) J. Biol. Chem. 272(17):11157に記載されている。例えば、p66RTの183位~185位(AF110975に対して番号付けられた)においてアミノ酸YMD Dをコードする野生型配列は、アミノ酸「AP」をコードする配列と置換され得る。さらに、プライマーグリップ領域(アミノ酸WMGY、p66RTの残基229~232(AF110975に対して番号付けられた))が、アミノ酸「PI」をコードする配列で置換され得る。

10

## 【0120】

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

## 【0121】

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

20

## 【0122】

本発明はまた、Gag、EnvおよびPol以外のHIV遺伝子由来の合成配列を含有する、発現カセットを含み、これらには、Gag、Env、Pol内の領域、ならびに以下が挙げられるが、これらに限定されない：

## 【0123】

【数 6】

GagComplPolmut\_C,

GagComplPolmutAtt\_C, GagComplPolmutIna\_C, GagComplPolmutInaTatRevNef\_C,  
 GagPolmut\_C, GagPolmutAtt\_C, GagPolmutIna\_C, GagProtInaRTmut\_C,  
 GagProtInaRTmutTatRevNef\_C, GagRTmut\_C, GagRTmutTatRevNef\_C,  
 GagTatRevNef\_C, gp120mod.TV1.del118-210, gp120mod.TV1.delV1V2,  
 gp120mod.TV1.delV2, gp140mod.TV1.del118-210, gp140mod.TV1.delV1V2, 10  
 gp140mod.TV1.delV2, gp140mod.TV1.mut7, gp140mod.TV1.tpa2,  
 gp140TMmod.TV1, gp160mod.TV1.del118-210, gp160mod.TV1.delV1V2,  
 gp160mod.TV1.delV2, gp160mod.TV1.dV1, gp160mod.TV1.dV1-gagmod.BW965,  
 gp160mod.TV1.dV1V2-gagmod.BW965, gp160mod.TV1.dV2-gagmod.BW965,  
 gp160mod.TV1.tpa2, gp160mod.TV1-gagmod.BW965, int.opt.mut\_C, int.opt\_C,  
 nef.D106G.-myr19.opt\_C, p15RnaseH.opt\_C, p2Pol.opt.YMWM\_C,  
 p2Polopt.YM\_C, p2Polopt\_C, p2PolTatRevNef opt C, 20  
 p2PolTatRevNef.opt.native\_C, p2PolTatRevNef.opt\_C, protInaRT.YM.opt\_C,  
 protInaRT.YMWM.opt\_C, ProtRT.TatRevNef.opt\_C, rev.exon1\_2.M5-10.opt\_C,  
 tat.exon1\_2.opt.C22-37\_C, tat.exon1\_2.opt.C37\_C, TatRevNef.opt.native\_ZA,  
 TatRevNef.opt\_ZA, TatRevNefGag C, TatRevNefgagCpollna C,  
 TatRevNefGagProtInaRTmut C, および TatRevNefProtRT opt C。

【0124】

他の株から得られる配列は、本明細書の教示に従って同様の様式で製造され得る。上記の  
 ように、生じる核酸コード配列が、高度に発現されたヒト遺伝子において見出されたコド  
 ン使用法に匹敵するように、G a g、E n v および P o l に関して上述したように、コド  
 ン使用法パターンを改変した。代表的に、これらの合成配列は、ネイティブ配列と比較し  
 てより高度のレベルのタンパク質を産生し得、そして野生型ポリペプチドコード配列の改  
 変は、多数の哺乳動物細胞株（および他の型の細胞株であって、昆虫細胞が挙げられるが  
 、これに限定されない）の野生型コード配列と比較して改善された発現を生じる。さらに  
 、核酸配列もまた改変されて、遺伝子の1つ以上の領域に変異を導入し得、例えば、遺伝  
 子産物の機能を変更し得（例えば、その遺伝子産物を非機能的にし得る）、そして/また  
 は改変部位（例えば、N e f におけるミリストイル化部位）を排除し得る。 30

【0125】

本明細書中に例示される、H I V C 型コード配列由来の合成発現カセットは、以下の  
 合成ポリヌクレオチドの1以上を含む配列が挙げられるが、これらに限定されない： 40

【0126】

【数7】

GagComplPolmut\_C, GagComplPolmutAtt\_C,  
 GagComplPolmutIna\_C, GagComplPolmutInaTatRevNef\_C, GagPolmut\_C,  
 GagPolmutAtt\_C, GagPolmutIna\_C, GagProtInaRTmut\_C,  
 GagProtInaRTmutTatRevNef\_C, GagRTmut\_C, GagRTmutTatRevNef\_C,  
 GagTatRevNef\_C, gp120mod.TV1.del118-210, gp120mod.TV1.delV1V2,  
 gp120mod.TV1.delV2, gp140mod.TV1.del118-210, gp140mod.TV1.delV1V2,  
 gp140mod.TV1.delV2, gp140mod.TV1.mut7, gp140mod.TV1.tpa2,  
 gp140TMmod.TV1, gp160mod.TV1.del118-210, gp160mod.TV1.delV1V2,  
 gp160mod.TV1.delV2, gp160mod.TV1.dV1, gp160mod.TV1.dV1-gagmod.BW965,  
 gp160mod.TV1.dV1V2-gagmod.BW965, gp160mod.TV1.dV2-gagmod.BW965,  
 gp160mod.TV1.tpa2, gp160mod.TV1-gagmod.BW965, int.opt.mut\_C, int.opt\_C,  
 nef.D106G.-myr19.opt\_C, p15RnaseH.opt\_C, p2Pol.opt.YMWM\_C,  
 p2Polopt.YM\_C, p2Polopt\_C, p2PolTatRevNef opt C,  
 p2PolTatRevNef.opt.native\_C, p2PolTatRevNef.opt\_C, protInaRT.YM.opt\_C,  
 protInaRT.YMWM.opt\_C, ProtRT.TatRevNef.opt\_C, rev.exon1\_2.M5-10.opt\_C,  
 tat.exon1\_2.opt.C22-37\_C, tat.exon1\_2.opt.C37\_C, TatRevNef.opt.native\_ZA,  
 TatRevNef.opt\_ZA, TatRevNefGag C, TatRevNefgagCpolIna C,  
 TatRevNefGagProtInaRTmut C, および TatRevNefProtRT opt C。

10

20

【0127】

Gag - 完全 (Gag - complete) は、例えば、Gag および pol を含むインフレームポリタンパク質をいい、ここで、Gag の p 6 位が存在する。

30

【0128】

本発明のいくつかの局面において使用され得る、さらなる配列は、WO 00/39302、WO 00/39303、WO 00/39304、WO 02/04493 に記載されている。

【0129】

(2.2.2 HIV 核酸コード配列を含む配列のさらなる改変)

本明細書中に記載される、HIV ポリペプチドコード発現カセットはまた、例えば、1つ以上の導入遺伝子をコードする、1つ以上のさらなる配列を含み得る。本発明の実施において有用なさらなる配列 (例えば、導入遺伝子) としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: さらなるウイルスエピトープ/抗原 { HCV 抗原 (例えば、E1、E2; Houghton, M. ら、米国特許第 5,714,596 号 (1998 年 2 月 3 日発行); Houghton, M. ら、米国特許第 5,712,088 号 (1998 年 1 月 27 日発行); Houghton, M. ら、米国特許第 5,683,864 号 (1997 年 11 月 4 日発行); Weiner, A. J. ら、米国特許第 5,728,520 号 (1998 年 3 月 17 日発行); Weiner, A. J. ら、米国特許第 5,766,845 号 (1998 年 6 月 16 日発行); Weiner, A. J. ら、米国特許第 5,670,152 号 (1997 年 9 月 23 日発行))、HIV 抗原 (例えば、1 以上の HIV 単離物由来のもの) を含むがこれらに限定されない} をコードするさらなる配列; および腫瘍抗原/エピトープをコードする配列。さらなる配列はまた、非ウイルス供給源に由来

40

50

し得る（例えば、インターロイキン - 2 ( I L - 2 )、幹細胞因子 ( S C F )、インターロイキン 3 ( I L - 3 )、インターロイキン 6 ( I L - 6 )、インターロイキン 12 ( I L - 12 )、G - C S F、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F )、インターロイキン - 1 ( I L - 1 I )、インターロイキン - 11 ( I L - 11 )、M I P - 1 I、腫瘍壊死因子 ( T N F )、白血病抑制因子 ( L I F )、c - k i t リガンド、トロンボポエチン ( T P O ) および f l t 3 リガンドのようなサイトカイン（例えば、G e n z y m e ( F r a m i n g h a m , M A )、G e n e t e c h ( S o u t h S a n F r a n c i s c o , C A )、A m g e n ( T h o u s a n d O a k s , C A )、R & D S y s t e m s a n d I m m u n e x ( S e a t t l e , W A ) のようないくつかの販売元から市販されている) をコードする配列)。さらなる配列は、以下に記載されている。また、G a g および他のコード配列の、互いに対する向きのバリエーションは、以下に記載されている。

10

#### 【0130】

H I V ポリペプチドコード配列は、他の H I V 単離物から得られ得る。例えば、M y e r s ら、L o s A l a m o s D a t a b a s e , L o s A l a m o s N a t i o n a l L a b o r a t o r y , L o s A l a m o s , N e w M e x i c o ( 1 9 9 2 ) ; M y e r s ら、H u m a n R e t r o v i r u s e s a n d A i d s , 1 9 9 7 , L o s A l a m o s , N e w M e x i c o : L o s A l a m o s N a t i o n a l L a b o r a t o r y を参照のこと。合成発現カセットは、このようなコード配列を出発物質として使用して、本明細書の教示に従って、作製され得る。

20

#### 【0131】

さらに、本発明の合成発現カセットは、本明細書中に開示される合成発現カセット配列によってコードされるポリペプチドに対して、85%より大きい配列同一性、好ましくは90%より大きい配列同一性、より好ましくは95%より大きい配列同一性、そして最も好ましくは98%より大きい配列同一性を有する、関連するポリペプチド配列を含む。

#### 【0132】

例示の発現カセットおよび改変体は、実施例1に記載される。

#### 【0133】

( 2 . 2 . 3 H I V - 1 ポリペプチドおよび関連するポリペプチドをコードする、合成配列の発現 )

30

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

#### 【0134】

次いで、これらのベクターは、いくつかの異なる細胞型 ( 種々の哺乳動物細胞株 ( 2 9 3、R D、C O S - 7、および C H O、例えば、A . T . C . C . から入手可能な細胞株 ) が挙げられる ) にトランスフェクトされ得る。次いで、細胞株は、適切な条件下で培養され、そして任意の適切なポリペプチド産物のレベルが、上清中で評価され得る ( 表 A を参照のこと )。例えば、p 2 4 は、G a g 発現を評価するために使用され得る ; g p 1 6 0、g p 1 4 0 または g p 1 2 0 は、E n v 発現を評価するために使用され得る ; p 6 p o l は、P o l 発現を評価するために使用され得る ; p r o t は、プロテアーゼを評価するために使用され得る ; p 1 5 は、R N A s e H を評価するために使用され得る ; p 3 1 は、インテグラーゼを評価するために使用され得る ; そして他の適切なポリペプチドは、V i f、V p r、T a t、R e v、V p u および N e f を評価するために使用され得る。さらに、改変されたポリペプチドがまた使用され得、例えば、他の E n v ポリペプチドとしては、例えば、ネイティブ g p 1 6 0、オリゴマー g p 1 4 0、モノマー g p 1 2 0、

40

50

ならびにこれらのポリペプチドの改変配列および/または合成配列が挙げられるが、これらに限定されない。これらのアッセイの結果は、合成HIVポリペプチドコード配列の発現が、対応する野生型配列より有意に高いことを実証する。

【0135】

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

【0136】

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

【0137】

これらのHIV含有ポリペプチドの、哺乳動物細胞株における効率的な発現は、以下の利点を提供する：ポリペプチドは、パキユロウイルス夾雑物を含まない；FDAによって認可された、確立された方法による産生；増加した純度；より高い収率（ネイティブコード配列と比較して）；およびCHO細胞におけるSub HIV含有ポリペプチドの産生（これは、本発明の構築物を使用して得られる増加した発現の非存在下では実行不可能である）の新規方法。例示的な哺乳動物細胞株としては、BHK、VERO、HT1080、293、293T、RD、COS-7、CHO、Jurkat、HUT、SUPT、C8166、MOLT4/クローン8、MT-2、MT-4、H9、PM1、CEM、およびCEMX174（このような細胞株は、例えば、A.T.C.C.から入手可能である）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0138】

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

【0139】

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

【0140】

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

【0141】

例えば、合成発現カセットは、所望のコード配列に作動可能に連結された制御エレメントを含むベクターに挿入され得、これによって、選択された細胞型における遺伝子の発現が可能となる。例えば、哺乳動物細胞発現のための代表的なプロモーターとしては、とりわけ、SV40初期プロモーター、CMVプロモーター（例えば、CMV前初期プロモーター（CMVプロモーターはイントロンAを含み得る））、RSV、HIV-Ltr、マウス乳腺癌ウイルスLTRプロモーター（MMLV-1tr）、アデノウイルスの主要後期プロモーター（Ad MLP）、および単純疱疹ウイルスプロモーターが挙げられる。他の非ウイルスプロモーター（例えば、マウスメタロチオネイン遺伝子由来のプロモータ

10

20

30

40

50

ー)もまた、哺乳動物発現のために用途を見出す。代表的に、転写終結配列およびポリアダニル化配列もまた存在し、翻訳終止コドンに対して3'に位置する。好ましくは、翻訳の開始の最適化のための配列もまた存在し、コード配列に対して5'に位置する。転写終結シグナル/ポリアダニル化シグナルの例としては、Sambrookら、前出に記載されるようなSV40由来のシグナル、およびウシ成長ホルモンターミネーター配列が挙げられる。スプライドナー部位およびアクセプター部位を含むイントロンもまた、本発明と共に使用するための構築物中に設計され得る(Chapmanら, *Nuc. Acids Res.* (1991) 19: 3979-3986)。

#### 【0142】

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

#### 【0143】

所望の合成ポリペプチドをコードする配列は、多数の市販のベクターにクローニングされて、このポリペプチドの、適切な宿主系における発現を生じさせ得る。これらの系としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:パキュロウイルス発現{Reilly, P. R.ら, *BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL* (1992); Beamesら, *Biotechniques* 11: 378 (1991); Pharmingen; Clontech, Palo Alto, CA)、ワクシニア発現{Earl, P. L.ら, 「Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia」*Current Protocols in Molecular Biology.* (F. M. Ausubelら編), *Greene Publishing Associates & Wiley Interscience*, New York (1991); Moss, B.ら, 米国特許第5, 135, 855号(1992年8月4日発行)}、細菌における発現{Ausubel, F. M.ら, *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley and Sons, Inc., Media PA; Clontech)、酵母における発現{Rosenberg, S.およびTekamp-Olson, P., 米国再発行特許発明第35, 749号(1998年3月17日発行); Shuster, J. R., 米国特許第5, 629, 203号(1997年5月13日発行); Gellissen, G.ら, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 62(1-2): 79-93 (1992); Romanos, M. A.ら, *Yeast* 8(6): 423-488 (1992); Goeddel, D. V., *Methods in Enzymology* 185 (1990); Guthrie, C., およびG. R. Fink, *Methods in Enzymology* 194 (1991)}、哺乳動物細胞における発現{Clontech; Gibco-BRL, Ground Island, NY; 例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(Haynes, J.ら, *Nuc. Acid. Res.* 11: 687-706 (1983); 1983, Lau, Y. F.ら, *Mol. Cell. Biol.* 4: 1469-1475 (1984); Kaufman, R. J., 「Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells」, *Methods in Enzymology*, 第185巻, 537-566頁, *Academic Press, Inc.*, San Diego CA (1991)}、および植

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

**【0144】**

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

**【0145】**

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

**【0146】**

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

**【0147】**

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

**【0148】**

合成HIV1ポリヌクレオチドは、本明細書中に記載されており、例えば、図を参照のこと。本明細書中に記載される本発明の異なる実施形態の様々な形態は、組み合わせられてもよい。

## 【0149】

例示的な発現アッセイが実施例2に記載される。ウエスタンブロット分析についての例示的な条件は、実施例3に示される。

## 【0150】

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

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

10

## 【0151】

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

## 【0152】

(2.3.1 本発明の合成発現カセットを使用するVLP生成)

本発明のGag含有合成発現カセットは、ネイティブのGagコード配列と比較して、Gagタンパク質およびVLPの両方の優れた生成を提供し得る。さらに、VLP生成の電子顕微鏡評価を使用して、推定サイズの遊離の発芽している未成熟ウイルス粒子は、この合成発現カセットを含む細胞によって生成されることが示され得る。

20

## 【0153】

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

30

## 【0154】

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

40

## 【0155】

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

50

ては、細菌発現系、哺乳動物発現系、バキュロウイルス/昆虫発現系、ワクシニア発現系、セムリキ森林熱ウイルス(SFV)発現系、アルファウイルス(例えば、シンドビスウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎(VEE)ウイルス)発現系、哺乳動物発現系、酵母発現系およびゼノプス発現系が挙げられるが、これらに限定されず、これらは当該分野で周知である。特に好ましい発現系は、哺乳動物細胞株系、ワクシニア系、シンドビス系、真核生物に移植した(layered)ベクター開始系(例えば、米国特許第6,015,686号、米国特許第5,814,482号、米国特許第6,015,694号、同第5,789,245、EP 1029068A2、WO 9918226A2/A3、EP 00907746A2、WO 9738087A2)、昆虫系、および酵母系である。

#### 【0156】

本発明の発現カセットについての合成DNAフラグメント(例えば、Pol、Gag、Env、Tat、Rev、Nef、Vif、Vprおよび/またはVpu)は、以下の真核生物発現ベクター中にクローニングされ得る：一過性発現アッセイおよびDNA免疫研究のためのpCMV Km2、pCMV Km2ベクターは、pCMV6a(Chapmanら、Nuc, Acids. Res. (1991) 19: 3979-3986)に由来し、そしてカナマイシン選択マーカ、ColE1複製起点、CMVプロモーターエンハンサー、およびイントロンAを含み、その後ろに以下に記載される合成配列のための挿入部位を含み、その後ろにウシ成長ホルモン由来のポリアデニル化シグナルを含む - pCMV Km2ベクターは、pCMV-linkベクターと、ポリリンカー部位がpCMV Km2に挿入されてpCMV-linkが作製されるという点でのみ異なる；チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞における発現のためのpESN2 dhfrおよびpCMV PL Edhfr；およびpAcc13、バキュロウイルス発現系において使用するためのシャトルベクター(pAcc13は、Munemitsu S.ら、Mol Cell Biol. 10(11): 5977-5982、1990に記載されるpAcc12に由来する)。

#### 【0157】

簡単に述べると、pCMV PL Edhfrの構築は、以下の通りである。

#### 【0158】

DHFRカセットを構築するために、EMCV IRES(内部リボソーム侵入部位)リーダーを、pCite-4a+(Novagen, Inc., Milwaukee, WI)からPCR増幅し、そしてXba-NcoフラグメントとしてpET23d(Novagen, Inc., Milwaukee, WI)に挿入し、pET-EMCVを獲得した。dhfr遺伝子を、pESN2 dhfrからPCR増幅して翻訳終止コドンの代わりにGly-Gly-Gly-Serスペーサーを有する産物を獲得し、そしてNco-BamH1フラグメントとして挿入し、pET-E-DHFRを獲得した。次に、希釈したneo遺伝子をpSV2Neo(Clontech, Palo Alto, CA)誘導體からPCR増幅し、そしてpET-E-DHFRの特有のBamH1部位に挿入し、pET-E-DHFR/Neo(m2)を獲得した。最後に、pCDNA3(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)由来のウシ成長ホルモントーミネーターを、neo遺伝子の下流に挿入し、pET-E-DHFR/Neo(m2) B G H tを獲得した。EMCV-dhfr/neo選択マーカカセットフラグメントを、pET-E-DHFR/Neo(m2) B G H tの切断により調製した。

#### 【0159】

1つのベクター構築物において、CMVエンハンサー/プロモーターおよびイントロンAを、pCMV6a(Chapmanら、Nuc. Acids. Res. (1991) 19: 3979-3986)からHindIII-SalIフラグメントとしてpUC19(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)に移した。NdeI部位からSalI部位まで、pUC19のベクター骨格を欠失させた。上記のDHFRカセットを、EMCV IRESが、CMVプロモーターの後ろにくるように、この構築物に加えた。このベクターはまた、amp<sup>r</sup>遺伝子およびSV40複製起点を含ん

10

20

30

40

50

だ。

【0160】

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

10

20

【0161】

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

30

【0162】

選択された発現系および宿主に依存して、VLPは、粒子形成ポリペプチドが発現されてVLPが形成され得る条件下で、発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を増殖することにより生成される。適切な増殖条件の選択は、当業者の範囲内である。VLPが細胞内で形成される場合、この細胞は、細胞を溶解するがVLPを実質的にインタクトなまま保つ、化学的手段、物理的手段または機械的手段を使用して破壊される。このような方法は、当業者に公知であり、そして例えば、Protein Purification Applications: A Practical Approach (E.L.V. HarrisおよびS. Angal編、1990)に記載される。

40

【0163】

次いで、この粒子は、それらの完全性を保存する方法(例えば、勾配遠心分離(例えば、塩化セシウム(CsCl)スクロース勾配、ペレット化など))(例えば、Kirnb

50

auerら、*J. Virol.* (1993) 67: 6929 - 6936を参照のこと)、  
ならびに標準的な精製技術(例えば、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロ  
マトグラフィーが挙げられる)を使用して、単離される(または実質的に精製される)。

#### 【0164】

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

10

20

#### 【0165】

VLP免疫刺激(または、ワクチン)組成物は、種々の賦形剤、アジュバント、キャリ  
ア、補助物質、調節剤などを含み得る。免疫刺激組成物は、免疫学的応答を開始するの  
に十分な量のVLP/抗原を含む。適切な有効量は、当業者によって決定され得る。このよ  
うな量は、慣用的な試験により決定され得る比較的広い範囲内に含まれ、一般に、約0.  
1  $\mu$ g ~ 約1000  $\mu$ g、より好ましくは約1  $\mu$ g ~ 約300  $\mu$ gの程度のVLP/抗原  
の量である。

#### 【0166】

キャリアが必要に応じて存在し、ここでこのキャリアは、組成物を受ける個体に対して  
有害な抗体の生成をそれ自体は引き起こさない分子である。適切なキャリアは、典型的に  
は、ゆっくりと代謝される大きな高分子(例えば、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリ  
グリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体(例えば、油滴または  
リポソーム)、および不活性なウイルス粒子)である。粒子性キャリアの例としては、ポ  
リメチルメタクリレートポリマーから誘導されるキャリア、ならびにポリ(ラクチド)お  
よびポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLGとして公知)から誘導される微粒子が  
挙げられる。例えば、Jefferyら、*Pharm. Res.* (1993) 10: 36  
2 - 368; McGee JPら、*J. Microencapsul.* 14(2): 19  
7 - 210, 1997; O'Hagan DTら、*Vaccine* 11(2): 149  
- 54, 1993を参照のこと。このようなキャリアは、当業者に周知である。さらに、  
これらのキャリアは、免疫刺激因子(「アジュバント」として機能し得る。さらに、抗  
原は、細菌毒素(例えば、ジフテリア、テタヌス、コレラなど由来の毒素)、およびE.  
coli由来の毒素に結合され得る。

30

40

#### 【0167】

アジュバントはまた、組成物の効力を増大するために使用され得る。このようなアジュ  
バントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:(1)アルミニウム塩(  
ミョウバン)(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムな  
ど);(2)水中油型エマルジョン処方物(ムラミルペプチド(以下を参照のこと)または  
細菌細胞壁成分のような他の特定の免疫刺激因子を含むかまたは含まない)(例えば、  
(a)MF59(国際公開番号WO90/14837)(これは5%スクアレン、0.  
5% Tween 80および0.5% Span 85を含み(必要に応じて種々の量

50

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

#### 【0168】

ムラミルペプチドとしては、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(nor-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(MTP-PE)などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0169】

10

20

30

40

50

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

【0170】

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

10

【0171】

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

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

20

30

40

【0172】

他の実施形態において、遺伝子移入ベクターは、サイトカインまたは他の免疫調節性分子をコードするように構築され得る。例えば、ネイティブのIL-2およびγ-インターフェロンをコードする核酸配列は、それぞれ、米国特許第4,738,927号および同第5,326,859号に記載される様にして、得られ得、一方、これらのタンパク質の有用なムテインは、米国特許第4,853,332号に記載されるようにして得られ得る。mCSFの短い形態および長い形態をコードする核酸配列は、それぞれ、米国特許第4,847,201号および同第4,879,227号に記載されるようにして得られ得る。本発明の特定の局面において、サイトカインを発現するレトロウイルスベクターまたは免疫調節性遺伝子は、本明細書中（例えば、本発明のパッケージング細胞株を使用する）

50

および国際出願番号 PCT US 94/02951 (表題「Compositions and Methods for Cancer Immunotherapy」)に記載されるようにして、生成され得る。

【0173】

本明細書中で使用するために適切な免疫調節性分子の例としては、以下が挙げられる：  
 IL-1およびIL-2 (Karupiahら、(1990) J. Immunology 144:290-298, Weberら、(1987) J. Exp. Med. 166:1716-1733, Gansbacherら、(1990) J. Exp. Med. 172:1217-1224および米国特許第4,738,927号); IL-3およびIL-4 (Tepperら、(1989) Cell 57:503-512, Golumbe  
 10 kら、(1991) Science 254:713-716および米国特許第5,017,691); IL-5およびIL-6 (Brakenhofら(1987) J. Immunol. 139:4116-4121および国際公開番号WO90/06370号); IL-7 (米国特許第4,965,195号); IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12およびIL-13 (Cytokine Bulletin, Summer 1994); IL-14およびIL-15; -インターフェロン (Finter  
 20 ら、(1991) Drugs 42:749-765, 米国特許第4,892,743号および同第4,966,843号、国際公開番号WO85/02862, Nagataら  
 (1980) Nature 284:316-320, Famillettiら(1981) Methods in Enz. 78:387-394, Twuら(1989) Pr  
 30 oc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2046-2050, およびFaktorら、(1990) Oncogene 5:867-872); -インターフェロン (Seifら、(1991) J. Virol. 65:664-671); -インターフェロン (Radfordら(1991) The American Society of Hepatology 20082015, Watanabeら(1989) Pr  
 40 oc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9456-9460, Gansbacherら(1990) Cancer Research 50:7820-7825, Maioraら、(1989) Can. Immunol. Immunother. 30:34-42、ならびに米国特許第4,762,791号および同第4,727,138号); G-CSF (米国特許第4,999,291号および同第4,810,643号); GM  
 50 -CSF (国際公開番号WO85/04188)。

【0174】

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

【0175】

上記の基質をコードする核酸分子、および本発明での使用に有利である他の核酸分子は、種々の供給源(例えば、American Type Culture Collectionのような寄託所を含む)から、またはBritish Bio-Technology Limited (Cowley, Oxford England)のような商業  
 40 的供給源から容易に得られ得る。代表的な例としては、BBG12(127個のアミノ酸の成熟タンパク質をコードするGM-CSF遺伝子を含む)、BBG6(これは、インターフェロンをコードする配列を含む)、A.T.C.C.寄託番号39656(これは、TNFをコードする配列を含む)、A.T.C.C.寄託番号20663(これは、インターフェロンをコードする配列を含む)、A.T.C.C.寄託番号31902、31902および39517(これは、インターフェロンをコードする配列を含む)、A.T.C.C.寄託番号67024(これは、インターロイキン1bをコードする配列を含む)、A.T.C.C.寄託番号39405、39452、39516、39626および39673(これは、インターロイキン2をコードする配列を含む)、A.T.C.C.寄託番号59399、59398および67326(これは、インターロイキン3を  
 50

コードする配列を含む)、A.T.C.C. 寄託番号57592(これは、インターロイキン4をコードする配列を含む)、A.T.C.C. 寄託番号59394および59395(これは、インターロイキン5をコードする配列を含む)、ならびにA.T.C.C. 寄託番号67153(これは、インターロイキン6をコードする配列を含む)が挙げられる。

【0176】

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

10

【0177】

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

20

【0178】

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

30

【0179】

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

40

【0180】

本発明の合成発現カセットは、レトロウイルスベクターを用いる使用のためのパッケージング細胞株の構築において使用され得る。

【0181】

1つの型のレトロウイルス、マウスの白血病ウイルス、または「MLV」は、遺伝子治療適用のために広範に利用されている(一般に、Mannら(Cell 33:153,

50

1993)、CaneおよびMulligan(Proc, Nat'l Acad. Sci. USA 81:6349, 1984)、ならびにMillerら, Human Gene Therapy 1:5-14, 1990を参照のこと)。

【0182】

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

10

【0183】

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

【0184】

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

20

30

【0185】

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

【0186】

パッケージング細胞株(合成Gagポリメラーゼ遺伝子の発現を指向する発現カセットを含むか、または本明細書中に記載される合成Env遺伝子の発現を指向する発現カセットを含む)が、提供される。(他の改変Env配列の記載に関して、Andre, S.ら、Journal of Virology 72(2):1497-1503, 1998; Haas, J.ら、Current Biology 6(3):315-324, 1996もまた参照のこと)。レンチウイルスベクターは、ベクター産生細胞株を生成するためにパッケージング細胞株に導入される。

40

【0187】

上記のように、レンチウイルスベクターは、目的の選択された遺伝子または配列を保有または発現するように設計され得る。レンチウイルスベクターは、広範の種々のレンチウイルスから容易に構築され得る(RNA Tumor Viruses, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985を参照のこと)。レンチウイルスの代表的な例としては、HIV、HIV-1、HIV-2、FIVおよびS

50

I Vが挙げられる。このようなレンチウイルスは、患者の単離物から、あるいはより好ましくは、American Type Culture Collectionのような寄託機関または収集機関から得られるか、あるいは、利用可能な技術を使用して公知の供給源から単離されるかのいずれかであり得る。

【0188】

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

10

【0189】

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

20

【0190】

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

30

【0191】

5'LTRおよび3'LTR、tRNA結合部位、および第2のDNA鎖合成の起点に加えて、組換えレトロウイルスベクター構築物はまた、パッケージングシグナル、および目的の1つ以上の遺伝子またはコード配列を含み得る。さらに、このレンチウイルスベクターは、核輸送エレメント（好ましい実施形態において、RREではない）を有する。適切な核輸送エレメントの代表的な例としては、ラウス肉腫ウイルスのエレメント（Ogertら、J Virol 70、3834-3843、1996）、ラウス肉腫ウイルスのエレメント（Liu & Mertz、Genes & Dev.、9、1766-1789、1995）およびシミアンレトロウイルスI型のゲノムのエレメント（Zolotukhinら、J Virol 68、7944-7952、1994）が挙げられる。他の潜在的なエレメントとしては、ヒストン遺伝子のエレメント（Kedes、Ann u . Rev . Biochem . 48、837-870、1970）、 $\alpha$ -インターフェロン遺伝子（Nagataら、Nature 287、401-408、1980）、 $\beta$ -アドレナリン作用性レセプター遺伝子（Koilkaら、Nature 329、75-79、1987）、ならびにc-Jun遺伝子（Hattorieら、Proc . Nat l . Acad . Sci . USA 85、9148-9152、1988）が挙げられる。

40

【0192】

50

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

【0193】

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

【0194】

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

【0195】

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

【0196】

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

【0197】

適切な合成HIVポリヌクレオチド配列の代表的な例は、本発明の発現カセットにおける使用について、本明細書中に記載される。上記のように、ネイティブのコード配列および/または合成のコード配列もまた、これらの発現カセットにおいて利用され得る。

【0198】

上記の発現カセットを利用することにより、広範な種々のパッケージング細胞株が産生され得る。例えば、一局面において、パッケージング細胞株（合成Gagポリメラーゼをコードする配列、および核輸送エレメントを含む発現カセットを含む）が、提供され、ここで、このプロモーターは、Gagポリメラーゼをコードする配列に作動可能に連結される。他の局面において、パッケージング細胞株（プロモーター、およびtat、rev、Env、もしくは他のHIV抗原、またはそれら由来のエピトープをコードする配列を含む）が、提供され、ここで、このプロモーターは、tat、rev、Env、またはHIV抗原もしくはエピトープをコードする配列に作動可能に連結される。さらなる実施形態において、このパッケージング細胞株は、tat、rev、nef、vif、vpuまたはvprのうちいずれか1個以上をコードする配列を含み得る。例えば、このパッケージング細胞株は、tat、rev、nef、vif、vpuまたはvpr単独のみ、tat、revとnef、nefとvif、nefとvpu、nefとvpr、vifとvpu、vifとvpr、vpuとvpr、nef、vifとvpu、nef、vifとvpr、nef、vpuとvpr、vif、vpuとvpr、またはnef、vif、vpuとvprの4つ全てなどを含み得る。

【0199】

1つの実施形態において、この発現カセットは、安定に組み込まれる。別の実施形態に

10

20

30

40

50

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

【0200】

改変されたコード配列を含む合成カセットは、選択された細胞株にトランスフェクトされる。(i) 代表的に、HIVコード配列の組み込まれた安定なコピーを保有し、そして(ii) これらのポリペプチドの受容可能なレベルを発現する、トランスフェクトされた細胞が選択される(発現は、本発明の開示の教示を考慮して、当該分野で公知の方法により評価され得る)。この細胞株がVLPを産生する能力もまた、実証され得る。

10

【0201】

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

【0202】

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

20

【0203】

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

【0204】

(2.4.0 DNA免疫および遺伝子送達)

種々のHIVポリペプチド抗原、特にHIV抗原は、本発明の粒子中で使用され得る。HIV抗原は、DNA免疫構築物中に含まれ得、この構築物は、例えば、合成Env発現カセット、合成Gag発現カセット、合成pol誘導ポリペプチド発現カセット、1つ以上の補助的遺伝子もしくは調節遺伝子(例えば、tat、rev、nef、vif、vpu、vpr)をコードする配列を含む合成発現カセット、および/またはインフレームで、ポリペプチド抗原(合成または野生型)のコード配列に融合される合成Gag発現カセットを含み、この構築物の発現により、目的の抗原を提示するVLPが得られる。

30

【0205】

本発明の実施に使用される特定の目的のHIV抗原としては、pol、tat、rev、nef、vif、vpu、vprおよび他のHIV-I (HTLV-II、LAV、ARVなどとしてもまた知られている)抗原またはそれら由来のエピトープ(例えば、gp120、gp41、gp160(ネイティブおよび改変体の両方)のような抗原が挙げられるが、これらに限定されない); Gag; ならびに種々の単離体由来のpol(多様なサブタイプ由来のHIV<sub>IIIB</sub>、HIV<sub>SF2</sub>、HIV-1<sub>SF162</sub>、HIV-1<sub>SF170</sub>、HIV<sub>LAV</sub>、HIV<sub>LAI</sub>、HIV<sub>MN</sub>、HIV-1<sub>CM235</sub>、HIV-1<sub>US4</sub>、種々のサブタイプ(例えば、サブタイプA~G、およびO)由来の他のHIV-1株、HIV-2株および種々のサブタイプ(例えば、HIV-2<sub>UC1</sub>およびHIV-2<sub>UC2</sub>)が挙げられるが、これらに限定されない)。例えば、Myersら、Los Alamos Database、Los Alamos National Laboratory、Los Alamos、New Mexico; Myersら、Human Retroviruses and Aids、1990、Los Alamos、New Mexico; Los Alamos National Laborat

40

50

oryを参照のこと。これらの抗体は、合成（本明細書中で記載されるような）または野生型であり得る。

【0206】

効力を評価するために、本発明の合成発現カセットを使用したDNA免疫は、例えば、以下のように実施され得る。マウスは、tat/rev/nefの合成発現カセットで免疫される。他のマウスは、tat/rev/nefの野生型発現カセットで免疫される。プラスミドDNAを用いたマウスの免疫は、代表的には、この合成発現カセットがネイティブな発現カセットに対して免疫原性の明瞭な改良を提供することを示す。また、第2のブースト免疫は、例えば、約2週間後に、第2の免疫応答を誘導する。さらに、CTLアッセイの結果は、代表的には、DNA免疫による細胞毒性Tリンパ球（CTL）応答の誘導について、合成発現カセットの増強した効力を示す。

10

【0207】

中和抗体の評価およびHIVに対する細胞性免疫応答に指向される例示的な霊長類の研究が、以下に記載される。

【0208】

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

【0209】

（2.4.1 本発明の合成発現カセットの送達）

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

20

30

【0210】

次に、所望の抗原をコードする遺伝子配列は、本発明の合成発現カセットを含むベクターに挿入され得る。1つの実施形態において、選択される抗原をコードするポリヌクレオチドは、発現ベクター（例えば、第一のベクターにおけるEnvコードポリヌクレオチド、第二のベクターにおけるGagコードポリヌクレオチド、第三のベクターにおけるPol誘導化ポリペプチドコードポリヌクレオチド、さらなるベクターにおけるtatコードポリヌクレオチド、revコードポリヌクレオチド、nefコードポリヌクレオチド、vifコードポリヌクレオチド、vprコードポリヌクレオチド、など）に別個クローン化される。特定の実施形態において、抗原は、合成Gagコード配列に挿入されるかまたは隣接し、その結果、結合された配列が発現される場合に、Gagポリペプチドおよび目的の抗原（例えば、Env（ネイティブまたは改変体）またはHIV由来の他の抗原（ネイティブまたは改変体））を含むVLPの産物を生じる。挿入は、コード配列内またはコード配列のいずれかの末端（発現されたGagポリペプチドの5'アミノ末端；または発現されたGagポリペプチドの3'カルボキシル末端）で作製され得る（Wagner、Rら、Arch Virol. 127：117-137、1992；Wagner、Rら、Virology 200：162-175、199

40

50

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

【0211】

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

10

【0212】

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

20

【0213】

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

【0214】

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

30

【0215】

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

40

【0216】

さらに、キメラ抗原-コード遺伝子配列を含み、例えば、1つより多くのウイルス単離体に由来する、例えば、目的の複数抗原/エピトープをコードする、プラスミドが構築さ

50

れ得る。

【0217】

代表的には、抗原コード配列は、合成コード配列に先行するか、または後に続き、キメラ性転写単位は、目的の抗原および合成コード配列の両方をコードする単一のオープンリーディングフレームを有する。

【0218】

あるいは、マルチシストロン性カセット（例えば、ニシストロン性カセット）が、EMCV IRESなどを使用して単一のmRNAからの複数の抗原の発現を可能にするように構築され得る（実施例7）。

【0219】

本発明の1つの実施形態において、核酸免疫組成物は、例えば、以下：Gag発現カセットを含む第1の発現ベクター、Env発現カセットを含む第2の発現ベクター、およびPol発現カセットを含む第3の発現ベクター、または1つ以上のPolのコード領域（例えば、Prot、RT、RNase、Int）を含み得、ここでさらなる抗原コード配列は、Pol発現と関連し得、このような抗原は、例えば、アクセサリ遺伝子（例えば、vpr、vpu、vif）、調節遺伝子（例えば、nef、tat、rev）、またはPol配列の一部（例えば、Prot、RT、RNase、Int）から得られ得る。別の実施形態において、核酸免疫組成物は、例えば、本発明の合成ポリヌクレオチド配列のいずれかを含む発現カセットを含み得る。別の実施形態において、核酸免疫組成物は、例えば、多くのHIV遺伝子（またはこのような遺伝子に由来する配列）のコード配列を含む発現カセットを含み得、ここでこのコード配列は、インフレームであり、そして単一のプロモーターの制御下にある（例えば、Gag-Env構築物、Tat-Rev-Nef構築物、P2Pol-tat-rev-nef構築物など）。本発明の合成コード配列は、コード配列産物（すなわち、HIVポリペプチド）に依存して任意の数の組み合わせで組み合わせられ得、例えば、このコード配列産物に対して免疫応答が惹起されることが所望される。さらに別の実施形態において、複数のHIV由来のポリペプチドの合成コード配列は、単一のプロモーターの制御下のポリシストロン性メッセージに構築され得、ここでIRESは、各コードされたポリペプチドのコード配列の近傍に配置される。

【0220】

一旦完成すると、この構築物は、標準の遺伝子送達プロトコルを使用して核酸免疫のために使用される。遺伝子送達方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,399,346号、同第5,580,859号、同第5,589,466号を参照のこと。遺伝子は、脊椎動物被験体に直接送達され得るか、あるいは被験体に由来する細胞にエキソピボで送達され得、そしてこの細胞は、被験体に再移植される。

【0221】

多くのウイルスベースの系が、哺乳動物細胞への遺伝子送達のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための便利な基盤を提供する。選択された配列は、ベクターに挿入され得、そして当該分野で公知の技術を使用して、レトロウイルス粒子中にパッケージングされ得る。次いで、組換えウイルスは単離され得、そしてインピボまたはエキソピボのいずれかで、被験体の細胞に送達され得る。多くのレトロウイルス系が、記載されてきた（米国特許第5,219,740号；MillerおよびRosman、BioTechniques（1989）7：980-990；Miller、A.D.、Human Gene Therapy（1990）1：5-14；Scarpàら、Virology（1991）180：849-852；Burnsら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA（1993）90：8033-8037；ならびにBoris-LawrieおよびTemin、Cur.Opin.Genet.Dev（1993）3：102-109）。

【0222】

多くのアデノウイルスベクターがまた、記載されてきた。宿主ゲノムに組込むレトロウイルスとは違い、アデノウイルスは、染色体外に存在し、それ故、挿入突然変異誘発に関

10

20

30

40

50

連する危険性を最小化する (Haj - Ahmad および Graham, J. Virol. (1986) 57: 267 - 274; Bettis, J. Virol. (1993) 67: 5911 - 5921; Mittereder, Human Gene Therapy (1994) 5: 717 - 729; Sethi, J. Virol. (1994) 68: 933 - 940; Barris, Gene Therapy (1994) 1: 51 - 58; Berkner, K. L. BioTechniques (1988) 6: 616 - 629; ならびに Richi, Human Gene Therapy (1993) 4: 461 - 476)。

#### 【0223】

さらに、種々のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター系が、遺伝子送達のために開発されている。AAVベクターは、当該分野で周知の技術を使用して容易に構築され得る。例えば、米国特許第5,173,414号および同第5,139,941号; 国際公開第WO92/01070号 (1992年1月23日に公開された) およびWO93/03769号 (1993年3月4日に公開された); Lebkowski, Molec. Cell. Biol. (1988) 8: 3988 - 3996; Vincent, Vaccines 90 (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. Current Opinion in Biotechnology (1992) 3: 533 - 539; Muzyczka, N. Current Topics in Microbiol. and Immunol. (1992) 158: 97 - 129; Kotin, R. M. Human Gene Therapy (1994) 5: 793 - 801; Shelling および Smith, Gene Therapy (1994) 1: 165 - 169; ならびに Zhou, J. Exp. Med. (1994) 179: 1867 - 1875を参照のこと。

#### 【0224】

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

#### 【0225】

目的の抗原をコードする核酸分子を送達するための用途が見出されるさらなるウイルスベクターとしては、ボックスファミリーのウイルス (ワクシニアウイルスおよび鳥類ボックスウイルスを含む) に由来する抗原が挙げられる。例として、遺伝子を発現するワクシニアウイルス組換え体は、以下のように構築され得る。特定の合成 HIV ポリペプチドコード配列をコードする DNA は、適切なベクターにまず挿入され、その結果、この DNA は、ワクシニアプロモーターの近傍に存在し、そしてワクシニア DNA 配列 (例えば、チミジンキナーゼ (TK) をコードする配列) に隣接する。このベクターは、次いで、ワクシニアで同時に感染される細胞をトランスフェクトするために使用される。相同組換えは、ワクシニアプロモーターおよび目的のコード配列をコードする遺伝子をウイルスゲノムに挿入するように作用する。得られた TK 組換え体は、細胞を 5 - プロモデオキシウリジンの存在下で培養し、そして 5 - プロモデオキシウリジンに耐性のウイルスブランクを選び取ることによって選択され得る。

#### 【0226】

あるいは、アピボックスウイルス (例えば、鶏痘ウイルスおよびカナリア痘ウイルス) は、遺伝子を送達するためにもまた使用され得る。組換えアピボックスウイルス (哺乳動物病原由来の免疫原を発現する) は、非鳥類種に投与される場合、保護免疫を付与することが公知である。アピボックスベクターの使用は、特に、ヒトおよび他の哺乳動物種において望ましい。なぜなら、アピボックス属のメンバーは、感受性の鳥類種においてのみ、生産的に複製し得、従って、哺乳動物細胞では感染性ではない。組換えアピボックスウイルスを産生するための方法は、当該分野で公知であり、そしてワクシニアウイルスの産生に関して上記されるような遺伝的組換えを使用する。例えば、WO91/12882号; WO89/03429号; およびWO92/03545号を参照のこと。

## 【0227】

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

## 【0228】

アルファウイルス属のメンバー（例えば、シンドビウイルス、セムリキ森林ウイルス、およびベネズエラウマ脳髄膜炎ウイルス由来のベクターであるが、これらに限定されない）はまた、本発明のポリヌクレオチドを（例えば、合成Gag-ポリペプチドコード発現カセット）送達するためのウイルスベクターとしての用途を見出す。本発明の方法の実施のために有用なシンドビスウイルス由来ベクターの記載については、Dubenskyら、*J. Virol.* (1996) 70:508-519；および国際公開第WO95/07995号およびWO96/17072号；ならびにDubensky, Jr., T.W.ら、米国特許第5,843,723号（1998年12月1日に発行された）、およびDubensky, Jr., T.W., 同第5,789,245号（1998年8月4日に発行された）を参照のこと。好ましい発現系としては、真核生物層状（layered）ベクター開始系（例えば、米国特許第6,015,686号、同第5,814,482号、同第6,015,694号、同第5,789,245号、EP1029068A2号、WO9918226A2/A3号、EP00907746A2号、WO9738087A2号）が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0229】

ワクシニアベースの感染/トランスフェクション系は、宿主細胞中で目的のコード配列の誘導性の一過性の発現を提供するために便利に使用され得る。この系において、細胞は、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組換体を用いてインビトロでまず感染される。このポリメラーゼは、これがT7プロモーターを保持するテンプレートだけを転写するという点で優れた特異性を示す。感染後、細胞は、目的のポリヌクレオチドで感染され、このポリヌクレオチドは、T7プロモーターによって駆動される。ワクシニアウイルス組換体から、細胞質において発現されるポリメラーゼは、トランスフェクトされたDNAをRNAに転写し、このRNAは、次いで、宿主翻訳機構によってタンパク質へと翻訳される。この方法は、多量のRNAおよびその翻訳産物の、高レベルな一過性の細胞質産生を提供する。例えば、Elroy-SteinおよびMoss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:6743-6747；Fuersたら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:8122-8126を参照のこと。

## 【0230】

ワクシニアウイルス組換体またはアピボックスウイルス組換体での感染あるいは他のウイルスベクターを使用する遺伝子の送達に対する、代替的アプローチとして、宿主細胞への導入後に高レベルの発現を誘導する増幅系が、使用され得る。具体的には、T7 RNAポリメラーゼについてのコード領域に先行するT7 RNAポリメラーゼプロモーターが、遺伝子操作され得る。このテンプレート由来のRNAの翻訳によって、T7 RNAポリメラーゼが産生され、このT7 RNAポリメラーゼが、次いで、テンプレートをより転写する。同時に、T7プロモーターの制御下で発現されるcDNAが存在する。従って、増幅テンプレートRNAの翻訳から産生されるT7 RNAポリメラーゼのいくらかは、所望の遺伝子の転写を導く。いくらかのT7 RNAポリメラーゼが、増幅を開始するために必要とされるので、T7 RNAポリメラーゼは、テンプレートと共に細胞中に導入され、転写反応を開始し得る。このポリメラーゼは、タンパク質として、またはRNAポリメラーゼをコードするプラスミド上に導入され得る。T7系および細胞を形質転換するためのこれらの用途のさらなる考察については、例えば、国際公開第WO94/26911号；StudierおよびMoffatt, *J. Mol. Biol.* (1986) 189:113-130；DengおよびWolff, *Gene* (1994) 143:2

10

20

30

40

50

45 - 249 ; Gaoら、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 200 : 1201 - 1206 ; GaoおよびHuang, Nuc. Acids Res. (1993) 21 : 2867 - 2872 ; Chenら、Nuc. Acids Res. (1994) 22 : 2114 - 2120 ; ならびに米国特許第5,135,855号を参照のこと。

【0231】

本発明の発現カセットの送達はまた、CMV由来のエレメントを含む真核生物発現ベクターを使用して達成され得、このようなベクターとしては、以下：pCMVKm2、pCMV-link pCMVPLEdhfr、およびpCMV6a(全て上記される)が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0232】

目的の合成発現カセットはまた、ウイルスベクターなしに送達され得る。例えば、合成発現カセットは、被験体または被験体由来の細胞へと送達される前に、リボソーム中にパッケージングされ得る。脂質カプセル化は、一般的に、リボソームを使用して達成され得、このリボソームは、核酸を安定に結合または閉じ込め、そして保持し得る。濃縮DNAの脂質調製物に対する比は、変化し得るが、一般的に、約1:1(mg DNA:μmol脂質)であるか、または脂質がより多い。核酸の送達のためのキャリアとしてのリボソームの使用の概説については、HugおよびSleight, Biochim. Biophys. Acta. (1991) 1097 : 1 - 17 ; Straubingerら、Methods of Enzymology (1983), 第101巻, 512頁~527頁を参照のこと。

20

【0233】

本発明における使用のためのリボソーム調製物としては、カチオン性(正に荷電した)調製物、アニオン性(負に荷電した)調製物、および中性調製物が挙げられ、カチオン性リボソームが特に好ましい。カチオン性リボソームは、プラスミドDNA(Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84 : 7413 - 7416) ; mRNA(Maloneら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86 : 6077 - 6081) ; および機能的形態の精製された転写因子(Debsら、J. Biol. Chem. (1990) 265 : 10189 - 10192)の細胞内送達を媒介することが示されている。

30

【0234】

カチオン性リボソームは、容易に入手できる。例えば、N[1-2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリエチルアンモニウム(DOTMA)リボソームは、GIBCO BRL, Grand Island, NYから、Lipofectinの商標名で入手可能である(Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84 : 7413 - 7416もまた参照のこと)。他の市販の脂質としては、(DDAB/DOPE)およびDOTAP/DOPE(Boerhinger)が挙げられる。他のカチオン性リボソームは、当該分野で周知の技術を使用して、容易に入手可能な材料から調製され得る。例えば、Szokaraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75 : 4194 - 4198 ; DOTAP(1,2-ビス(オレイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)リボソームの合成の記載については、PCT公開第WO90/11092号を参照のこと。

40

【0235】

同様に、アニオン性リボソームおよび中性リボソームは、例えば、Avanti Polar Lipids(Birmingham, AL)から容易に入手可能であるか、または容易に入手可能な材料を使用して容易に調製され得る。このような材料としては、とりわけ、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)が挙げられる。これらの材料はまた、DOTMA出発材料およびDOTAP出発材料と適切な比で混合され

50

得る。これらの材料を使用してリポソームを作製する方法は、当該分野で周知である。

【0236】

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

10

【0237】

DNAおよび/またはタンパク質抗原はまた、Papahadjopoulosら、Biochim. Biophys. Acta. (1975) 394: 483-491によって記載されるものに類似する渦巻型脂質組成物で送達され得る。米国特許第4,663,161号および同第4,871,488号もまた参照のこと。

20

【0238】

目的の合成発現カセットはまた、粒子状キャリアに被包され得るか、それに吸着され得るか、またはそれと結合され得る。このようなキャリアは、複数コピーの選択された抗原を免疫系に示し、局所的なリンパ節中で、抗原の捕捉および保持を促進する。粒子は、マクロファージによって食作用され得、そしてサイトカイン放出を介して抗原提示を強化し得る。粒子状キャリアの例としては、ポリメタクリル酸メチルポリマーに由来するキャリアならびにポリ(ラクチド)およびポリ(ラクチド-コ-グリコリド) (PLGとして公知) に由来する微粒子が挙げられる。例えば、Jefferyら、Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; McGee JPら、J. Microencapsul. 14(2): 197-210, 1997; O'Hagan DTら、Vaccine 11(2): 149-54, 1993を参照のこと。適切な微粒子はまた、荷電界面活性剤(例えば、アニオン性界面活性剤またはカチオン性界面活性剤)の存在下で製造され、正味の負電荷または正味の正電荷を有する表面を有する巨大粒子を得ることができる。例えば、アニオン性界面活性剤(例えば、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB)) を用いて製造された巨大粒子(すなわち、CTAB-PLG巨大粒子)は、例えばDNAのような負に荷電した巨大粒子を吸着する。(例えば、国際出願番号PCT/US99/17308を参照のこと)。

30

40

【0239】

さらに、他の粒子状系およびポリマーは、目的の遺伝子のインビボまたはエキソビボでの送達のために使用され得る。例えば、ポリマー(例えば、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジン、およびこれらの分子の結合体)は、目的の核酸を移入するために有用である。同様に、DEAEデキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、他の不溶性無機酸塩(例えば、リン酸ストロンチウム、ケイ酸アルミニウム(ペントナイトおよびカオリンを含む)、酸化クロム、ケイ酸マグネシウム、タルクなどを使用する沈殿)は、本方法に関する用途を見出す。遺伝子移入に有用な送達系の概説については、例えば、Felgner, P. L., Advanced Drug Delivery Reviews (1990) 5: 163-187を参照

50

のこと。ペプチド（1998年11月3日に発行された、Zuckerman, R.N.ら、米国特許第5,831,005号）もまた、本発明の構築物の送達のために使用され得る。

#### 【0240】

さらに、粒子状キャリア（例えば、金およびタングステン）を使用する遺伝子銃を使用する（biolistic）送達系は、本発明の合成発現カセットを送達するために特に有用である。粒子は、送達されるべき合成発現カセットでコーティングされ、「遺伝子銃」からのガンパワー放電を使用して、一般的に還元雰囲気下で高速度まで加速される。従って、このような技術の記載および有用な装置については、例えば、米国特許第4,945,050号；同第5,036,006号；同第5,100,792号；同第5,179,022号；同第5,371,015号；および同第5,478,744号を参照のこと。また、針無し注射系も使用され得る（Davis, H.L.ら、Vaccine 12:1503-1509, 1994；Bioject, Inc., Portland, OR）。

10

#### 【0241】

本発明の合成発現カセットを保有する組換えベクターは、脊椎動物被験体への送達のための組成物中に処方される。これらの組成物は、予防的（感染を予防するため）または治療的（感染後に疾患を治療するため）のいずれかであり得る。この組成物は、「治療有効量」の目的の遺伝子を含み、それによって、ある量の抗原がインピボで産生され、その結果、免疫応答が抗原が投与される個体中で惹起される。正確な必要量は、他の因子の中でも、処置される被験体；処置される被験体の年齢および一般的状態；抗体を合成する被験体の能力；所望される保護の程度；処置される状態の重篤度；選択された特定の抗原およびその投与様式、に依存して変化する。適切な有効量は、当業者によって容易に決定され得る。従って、「治療有効量」は、慣用的な試行によって決定され得る、比較的広い範囲に入る。

20

#### 【0242】

組成物は、一般的に、1つ以上の「薬学的に受容可能な賦形剤またはビヒクル」（例えば、水、生理的食塩水、グリセロール、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、エタノールなど）を含む。さらに、補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質など）は、このようなビヒクル中に存在し得る。核酸の取り込みおよび/または発現の特定の促進剤（例えば、プピバカイン、心臓毒およびスクロースが挙げられるがこれらに限定されない）はまた、組成物中に含まれ得るかまたは同時投与され得る。

30

#### 【0243】

一旦処方されると、本発明の処方物は、（例えば、上記されるように）被験体に直接投与され得るか、あるいは、例えば、上記される方法を使用して、被験体に由来する細胞にエキソピボで送達され得る。例えば、エキソピボ送達および形質転換された細胞を被験体に再移植するための方法は、当該分野で公知であり、そしてこれには、例えば、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、リポフェクタミン媒介性トランスフェクションおよびLT-1媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチド（対応する抗原を含むかまたは含まない）のリポソーム中での被包化、ならびにDNAの核への直接的微量注入が挙げられ得る。

40

#### 【0244】

合成発現カセット組成物のインピボでの直接の送達は、一般的に、上記されるように、ウイルスベクターを使用してかまたは使用せずに、従来のシリンジまたは遺伝子銃（例えば、Accell（登録商標）遺伝子送達系（Powderject Technologies, Inc., Oxford, England））のいずれかを使用する注射によって達成される。この構築物は、皮下的、表皮的、皮内的、粘膜内的（例えば、鼻内的、直腸的および膣的）、腹腔内的、静脈内的、経口的または筋内的のいずれかで注射され得る。DNAの表皮細胞への送達は、特に好ましい。なぜならこの投与様式は、皮膚関連リ

50

ンパ細胞への接近を提供し、そしてレシピエントにおけるDNAの一過性の存在を提供するからである。投与の他の様式としては、経口投与および肺投与、坐剤、針無し注射、経皮的 (transcutaneous) 適用および経皮的 (transdermal) 適用が挙げられる。投薬処置は、単一用量スケジュールまたは複数用量スケジュールであり得る。核酸の投与は、ペプチドまたは他の物質の投与ともまた組み合わせられ得る。

【0245】

例示的な免疫原性研究は、実施例4、5、6、9、10、11、および12において示される。

【0246】

(2.4.2 本発明の合成発現カセットのエキソピボ送達)

1つの実施形態において、T細胞および関連する細胞型(抗原提示細胞(例えば、マクロファージ、単球、リンパ球、樹状細胞、B細胞、T細胞、幹細胞、およびこれらの前駆細胞を含むがこれらに限定されない))は、本発明の合成発現カセットのエキソピボ送達に使用され得る。T細胞は、当業者に公知の種々の手順によって、末梢血リンパ球(PBL)から単離され得る。例えば、T細胞集団は、PBLの集団からアクセサリ細胞およびB細胞を除去することによって「富化」され得る。特に、T細胞富化は、抗MHCクラスIIモノクローナル抗体を使用する非T細胞の除去によって達成され得る。同様に、他の抗体は、非T細胞の特定の集団を枯渇させるために使用され得る。例えば、抗Ig抗体分子は、B細胞を枯渇させるために使用され得、そして抗MacI抗体分子は、マクロファージを枯渇させるために使用され得る。

10

20

【0247】

T細胞は、当業者に公知の技術によって多くの異なる部分集団にさらに分画され得る。2つの主要な部分集団は、これらの細胞表面マーカーCD4およびCD8の差示的な発現に基づいて、単離され得る。例えば、上記のようなT細胞の富化の後、CD4<sup>+</sup>細胞は、CD4に特異的な抗体を使用して富化され得る(Coliganら(上述)を参照のこと)。抗体は、磁気ビーズのような固体支持体と結合され得る。逆に、CD8<sup>+</sup>細胞は、CD4に特異的な抗体(CD4<sup>+</sup>細胞を除去するため)の使用によって濃縮され得るか、または固体支持体に結合されたCD8抗体の使用によって単離され得る。HIV-1感染者由来のCD4リンパ球は、Wilsonら、(1995) J. Infect. Dis. 172:88によって記載される形質導入の前または後に、エキソピボで増殖され得る。

30

【0248】

T細胞の精製の後、当業者に公知の種々の遺伝的改変の方法は、本明細書中に記載されるように構築された、非ウイルスベースの遺伝子移送ベクターまたはウイルスベースの遺伝子移入ベクターを使用して実施され得る。例えば、1つのこのようなアプローチは、ベクター産生細胞に由来する培養物のベクター含有上清を用いて精製されたT細胞の導入を包含する。第2のアプローチは、精製されたT細胞との、照射された単層のベクター産生細胞の同時培養を包含する。第3のアプローチは、類似する同時培養アプローチを含むが、精製されたT細胞は、種々のサイトカインで前刺激され、そして照射されたベクター産生細胞との同時培養の前に48時間培養される。このような導入の前の前刺激は、効率的な遺伝子移入を増大させる(Noltaら、(1992) Exp. Hematol. 20:1065)。増殖のためのこれらの培養物の刺激はまた、患者への再注入のための細胞集団の増加を提供する。同時培養の後、T細胞は、ベクター産生細胞単層から回収され、増殖され、そして液体窒素で凍結される。

40

【0249】

遺伝子移入ベクター(本発明の1つ以上の合成発現カセット(単離されたT細胞への送達のための適切な制御エレメントを伴う)を含む)は、公知の方法を使用して、そして本明細書の指針に従って、構築され得る。

【0250】

選択マーカーはまた、遺伝子移入ベクターの構築において使用され得る。例えば、遺伝子移入ベクターで形質導入された哺乳動物細胞に、細胞傷害性剤に対する耐性を与えるマ

50

ーカーが、使用され得る。細胞傷害性剤は、ネオマイシン、アミノ配糖体、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、スルホンアミド、アクチノマイシン、ネトロブシン、ジスタマイシンA、アントラサイクリン、またはピラジンアミドであり得るが、これらに限定されない。例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼIIは、ネオマイシンアナログであるゲネチシン(G418)に対する耐性を付与する。

#### 【0251】

T細胞はまた、少なくとも1種類の増殖因子を含有する培地において維持され得、その後選択される。種々の増殖因子は、当該分野で公知であり、これらは特定の細胞型の増殖を維持する。このような増殖因子の例は、サイトカインマイトジェン(例えば、rIL-2、IL-10、IL-12、およびIL-15)であり、これらは、リンパ球の増殖および活性化を促進する。特定の細胞型は、ホルモン(ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)およびヒト成長ホルモンを含む)のような他の増殖因子によって刺激される。特定の細胞集団に対する適切な増殖因子の選択は、当業者によって容易に達成される。

10

#### 【0252】

例えば、白血球(例えば、分化した前駆細胞および幹細胞)は、種々の増殖因子によって刺激される。より具体的には、活性化 $T_H$ および活性化マクロファージによって産生される、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、GM-CSF、M-CSF、およびG-CSFは、骨髄性幹細胞を刺激し、この骨髄性幹細胞は、次いで、多能性幹細胞、顆粒球-単球前駆細胞、好酸球前駆細胞、好塩基球前駆細胞、骨髄巨核球、および赤血球前駆細胞に分化する。分化は、GM-CSF、IL-3、IL-6、IL-11、およびEPOのような増殖因子によって調節される。

20

#### 【0253】

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

#### 【0254】

顆粒球-単球前駆細胞は、単球、マクロファージ、および好中球に分化する。このような分化は、増殖因子であるGM-CSF、M-CSF、およびIL-8によって調節される。好酸球前駆細胞は、好酸球に分化する。このプロセスは、GM-CSFおよびIL-5によって調節される。

30

#### 【0255】

好塩基球前駆細胞の肥満細胞および好塩基球への分化は、GM-CSF、IL-4、およびIL-9によって調節される。骨髄巨核球は、GM-CSF、EPO、およびIL-6に反応して、血小板を産生する。赤血球前駆細胞は、EPOに反応して赤血球に分化する。

#### 【0256】

従って、CD-3結合因子による活性化の間、T細胞はまた、マイトジェン(例えば、IL-2のようなサイトカイン)と接触され得る。特に好ましい実施形態において、IL-2は、約50~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でT細胞の集団に添加される。CD-3結合因子を用いる活性化を、2~4日間実施し得る。

40

#### 【0257】

いったん適切に活性化されると、T細胞へのベクターのトランスフェクションを可能にする条件下で、T細胞を適切な遺伝子移入ベクターと接触させることによって、T細胞は遺伝的に改変される。T細胞集団の細胞密度が約 $0.1 \times 10^6$ と $5 \times 10^6$ との間、好ましくは約 $0.5 \times 10^6$ と $2 \times 10^6$ との間である場合、遺伝的改変が実施される。多くの適切なウイルスベースおよび非ウイルスベースの遺伝子移入ベクターが、本明細書で使用について記載されている。

#### 【0258】

形質導入後に公知の技術を用いて、形質導入細胞を、非形質導入細胞から選択する。例

50

えば、形質導入に用いられる遺伝子移入ベクターが細胞傷害性剤に対する耐性を付与する選択マーカを含む場合、細胞は適切な細胞傷害性剤に接触され得、これにより非形質導入細胞は、形質導入細胞から陰性に選択され得る。選択マーカが細胞表面マーカである場合、細胞は特定の細胞表面マーカに特異的な結合因子と接触され得、これにより、形質導入された細胞は、この集団から陽性に選択され得る。この選択工程はまた、蛍光活性化細胞分類 (FACS) 技術を含む (例えば、FACS が使用され、特定の細胞表面マーカを含む集団から細胞を選択する場合)、またはこの選択工程は、標的細胞捕捉および/またはバックグラウンド除去のための回収可能な支持体としての、磁氣的に応答性の粒子の使用を含む得る。

**【0259】**

より好ましくは、形質導入細胞の陽性選択を、FACSセルソーター (例えば、FACS Vantage<sup>TM</sup> Cell Sorter、Becton Dickinson Immunocytometry Systems、San Jose、CA) を用いて実施して、選択可能な細胞表面マーカを発現する形質導入された細胞を分類および回収し得る。形質導入に続いて、細胞を、特定の細胞表面マーカに対する蛍光標識抗体分子で染色する。それぞれの細胞に結合した抗体の量を、細胞を含有する液滴にセルソーターを通過させることによって測定し得る。染色された細胞を含む液滴に電磁氣的電荷を与えることによって、形質導入細胞を他の細胞から分離し得る。次いで、陽性に選択された細胞を、滅菌回収容器内に回収する。これらの細胞分類手順を、例えば、FACS Vantage<sup>TM</sup> Training Manual (項3-11~3-28および10-1~10-17を特に参照する) に詳細に記載する。

10

20

**【0260】**

形質導入細胞の陽性選択はまた、発現または特定の細胞表面マーカに基づく細胞の磁氣的分離を用いて実施され得る。このような分離技術において、陽性に選択される細胞は、まず特異的結合因子 (例えば、細胞表面マーカと特異的に相互作用する抗体または試薬) と接触される。次いで、細胞は、回収可能な粒子 (例えば、磁氣的に応答性の粒子) と接触される。この粒子は、(陽性細胞に結合した) 特異的結合因子と結合する試薬と結合されている。次いで、細胞結合因子-粒子複合体を、非標識細胞と物理的に分離し得る (例えば、磁場を用いて)。磁氣的に応答性の粒子を用いる場合、標識細胞は、磁場を用いて容器内に保持され得る一方、陰性細胞は除去される。これらおよび類似の分離手順は、当業者に公知である。

30

**【0261】**

選択された形質導入細胞におけるベクターの発現を、当業者に公知の多くのアッセイによって評価し得る。例えば、ウエスタンブロット分析またはノーザン分析を、目的の挿入ヌクレオチド配列の特性に依存して使用し得る。いったん発現が確立され、そして形質導入されたT細胞が選択された合成発現カセットの存在について試験されると、末梢血流を介した患者への注入の準備ができる。

**【0262】**

本発明は、初代哺乳動物細胞のエキソピボ集団の遺伝的改変のためのキットを含む。このキットは代表的に、1以上の容器に含まれる少なくとも1つの選択マーカおよび少なくとも1つの合成発現カセットをコードする遺伝子移入ベクター、付属の試薬またはハードウェア、およびキットの使用についての取扱説明書を含む。

40

**【0263】**

(2.4.3.さらなる送達レジメン)

本明細書中に記載される任意のポリヌクレオチド (例えば、発現カセット) またはポリペプチド (上記のいずれかの方法によって送達される) はまた、他のDNA送達系および/またはタンパク質送達系と組み合わせて使用され得る。非限定的な例としては、これらの分子の同時投与 (例えば、1以上の分子が「プライム」工程で送達され、その後1以上の分子が「ブースト」工程によって送達される、プライム-ブースト法) が挙げられる。特定の実施形態において、1以上の核酸含有組成物の送達後に、1以上の核酸含有組成

50

物および/または1以上のポリペプチド含有組成物(例えば、HIV抗原を含むポリペプチド)が送達される。他の実施形態において、(同じかまたは異なる核酸分子の)複数の核酸「プライマー」の後に、(同じかまたは異なるポリペプチドの)複数のポリペプチド「ブースト」が送達され得る。他の例としては、複数の核酸投与および複数のポリペプチド投与が挙げられる。

#### 【0264】

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

10

#### 【0265】

(3.0 改善されたHIV-1 Gag発現カセットおよびPol発現カセット)

20

いずれの特定のモデルにも理論にも仮説にも拘束されることを望まないが、以下の情報は、本発明のより完全な理解を提供するために示される。

#### 【0266】

世界保健機構(WHO)は、HIV-1に感染した世界中の人の数が、3610万人を超えると概算した。従って、安全かつ有効なHIVワクチンの開発が、現時点で不可欠である。最近の研究により、感染患者においてHIV-1複製を制御することにおけるCTLの重要性が実証された。さらに、複数のHIV抗原とのCTL反応性は、ウイルス複製の有効な制御に必要である。本発明を支持して実施された実験は、中和抗体の誘導のためのEnvに加えて、HIV-1 GagおよびPolをワクチンに含めることが有用であることを示唆する。

30

#### 【0267】

HIV-1ワクチン候補の効力を増大させるため、Gag単独またはGag+Polのいずれかについて、コドン改変されたGag発現カセットおよびPol発現カセットを設計した。発現および効力における潜在的な差異を評価するために、これらの構築物の発現を分析し、そして免疫原性研究をマウスにおいて実施した。

#### 【0268】

GagおよびPolをコードするいくつかの発現カセットを設計した。このカセットとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: Gagプロテアーゼ、フレームシフトしたGagPolインテグラーゼ(gagFSpol)およびインフレームのGagPolインテグラーゼ(gagpol)。減弱(Att)または非機能的プロテアーゼ(Ina)を有する、インフレームのGagPolインテグラーゼのバージョンもまた設計した。これらの核酸配列を、高度に発現されるヒト遺伝子のコドン用法に対応するようにコドン改変した。マウスを滴定したDNA用量で免疫し、そして体液性免疫応答および細胞性免疫応答をELISAおよび細胞内サイトカイン染色によって評価した(実施例10)。

40

#### 【0269】

マウスにおける免疫応答は、インビトロでの相対的発現レベルと相関することが観察されている。アカゲザルにおけるワクチン研究は、インビボでの免疫応答および発現レベルをさらに扱う。

#### 【0270】

50

(4.0 HIVに対する強力な中和抗体および細胞性免疫応答の誘導のための増強されたワクチン技術)

いずれの特定のモデルにも理論にも仮説にも拘束されることを望まないが、以下の情報は、本発明のより完全な理解を提供するために示される。

【0271】

HIV感染に対する保護は、おそらく、ウイルスチャレンジに曝露された、ワクチン接種された個体中に予め存在する、強力かつ広く反応性の中和抗体を必要とする。細胞性免疫応答は、感染した個体におけるウイルス血症を制御するために所望されるが、感染に対する保護は、これらの応答の誘導に排他的に依存するワクチンアプローチについては実証されていない。この理由のために、本発明を支持して実施された実験は、初代HIV単離体(例えば、R5サブタイプB(HIV-1<sub>SF162</sub>)株およびサブタイプC(HIV-1<sub>TVI</sub>)株)由来の新規V欠失エンベロープ抗原を使用する、プライム-ブーストアプローチを使用する。これらの抗原を、増強されたDNA[ポリアクチド(polyactide)co-グリコリド(PLG)微粒子処方物もしくはエレクトロポレーション]またはアルファウイルスレプリコン粒子ベースのワクチンアプローチ、その後のMF59アジュバント中のEnvタンパク質でのブースター免疫によって送達した。電気的透過化による、プラスミドにコードされた遺伝子のインピボの効果的な発現が記載されている(例えば、Zucchelliら(2000)J. Virol. 74:11598-11607; Bangaら(1998)Trends Biotechnol. 10:408-412; Hellerら(1996)FEB Lett. 389:225-228; Mathiesenら、(1999)Gene Ther. 4:508-514; Mirら(1999)Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 8:4262-4267; Nishiら(1996)Cancer Res. 5:1050-1055を参照のこと)。SF126株由来のネイティブおよびV欠失の両方のモノマー性形態(gp120)およびオリゴマー性形態(o-gp140)のタンパク質を、ブースターとして試験した。全てのタンパク質調製物を高度に精製し、そして生物物理学的方法論および免疫化学的方法論によって広範に特徴付けた。ウサギおよび霊長類の免疫原性研究の結果は、中和抗体応答は、親の非V2欠失SF162ウイルスに対して構成的に誘導され得るが、異種HIV株に対する応答の誘導は、この免疫原のV2ループの欠失によって改善されたことを示した。さらに、これらのプライム-ブーストワクチンレジメンを使用して、強力なHIV抗原特異的CD4+T細胞応答およびCD8+T細胞応答もまた実証した。

【0272】

これらの知見に基づいて、V2欠失エンベロープDNAおよびタンパク質のワクチンを、臨床的評価に進めるために選択した。免疫と類似のアプローチを、例えば、対応するHIV由来ポリペプチドブーストまたは異種のHIV由来ポリペプチドブーストと組み合わせる本発明の合成HIVポリヌクレオチドを使用する核酸免疫を用いて、使用し得る。

【0273】

本発明のこの局面の1実施形態を、以下に一般的に記載し得る。抗原を、ワクチン組成物のために選択する。Envポリペプチドを、代表的に、免疫応答を誘導するために使用される第一の抗原性組成物において使用する。さらに、Gagポリペプチドを、代表的に、免疫応答を誘導するために使用される第二の抗原性組成物において使用する。この第二の抗原性組成物は、HIV由来のポリペプチド配列(Pol配列、Tat配列、Rev配列、Nef配列、Vif配列、Vpr配列および/またはVpu配列を含むが、これらに限定されない)をさらに含み得る。DNAプライムワクチン接種を、代表的に、第一および第二の抗原性組成物を用いて実施する。1以上の抗原性組成物を用いるさらなるDNAワクチン接種もまた、選択された時間間隔に含まれ得る。このプライムの後に、代表的に、少なくとも1回のブーストが行われる。このブーストとしては、例えば、アジュバント化(adjuvant)したHIV由来のポリペプチド(例えば、DNAワクチン接種のために使用されるDNAに対応する)、ウイルスベクターによってコードされる、HIV由来ポリペプチド(例えば、DNAワクチン接種のために使用されるDNAに対応する)

のコード配列、さらなるワクチン接種および/または上記の組み合わせが挙げられ得る。  
 1 実施形態において、DNAプライムは、第一の抗原性組成物（例えば、エンベロープポリペプチドをコードするDNA構築物）および第二の抗原性組成物（例えば、Gagポリペプチド、Polポリペプチド、Tatポリペプチド、NefポリペプチドおよびRevポリペプチドをコードするDNA構築物）と共に投与される。プライムにおいて使用するためのDNA構築物は、例えば、ポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたCMVプロモーターを含み得る。このDNAプライムの後に、ブースト（例えば、アジュバント化したエンベロープポリペプチドブーストおよびウイルスベクターブースト（ここで、このウイルスベクターは、例えば、Gagポリペプチド、Polポリペプチド、Tatポリペプチド、NefポリペプチドおよびRevポリペプチドをコードする））が行われる。あるいは（またはさらに）、このブーストは、アジュバント化したGagポリペプチド、Polポリペプチド、Tatポリペプチド、NefポリペプチドおよびRevポリペプチドのブースト、ならびにウイルスベクターブースト（ここで、ウイルスベクターは、例えば、エンベロープポリペプチドをコードする）であり得る。このブーストは、DNAプライムにコードされた全てのポリペプチド抗原を含み得るが；これは必須でない。さらに、異なるポリペプチド抗原を、最初のワクチン接種に対してブーストにおいて使用し得るが、逆もまた行われ得る。さらに、最初のワクチン接種は、DNA構築物ではなくウイルスベクターであり得る。

10

## 【0274】

HIVエンベロープワクチン設計において考慮され得るいくつかの因子は、以下のとおりである。エンベロープベースのワクチンは、非ヒト霊長類モデルにおいて、感染に対する保護を実証している。受動的抗体研究は、ウイルスチャレンジストックに対して、中和抗体の存在下でHIV感染に対する保護を実証している。Envを排除するワクチンは、一般に、より低い保護効力を付与する。本発明を支持して実施された実験は、SF21ab株由来のモノマー性gp120タンパク質が、HIV-11ab株の中和および霊長類モデルにおけるウイルスチャレンジに対する保護を提供したことを実証している。Thai Eフィールド株由来の初代gp120タンパク質は、サブタイプ交差的な(cross-subtype)1ab株の中和を提供した。初代サブタイプBオリゴマー性o-gp140タンパク質は、サブタイプB初代(フィールド)単離体の部分的中和を提供した。初代サブタイプBのo-gp140V2DNAプライム+タンパク質ブーストは、多様なサブタイプB初代単離体の強力な中和、および霊長類モデルにおけるウイルスチャレンジに対する保護を提供した。初代サブタイプCのo-gp140およびo-gp140V2は、おそらく、サブタイプBについて記載された結果と類似の結果を提供する。

20

30

## 【0275】

強力で広範に反応性である中和抗体の誘導のためのワクチンストラテジーは、保存された中和エピトープを露出するエンベロープポリペプチド構造（例えば、可変領域の欠失および脱グリコシル化、エンベロープタンパク質-レセプター複合体、結晶構造に基づく合理的設計（例えば、 $\alpha$ -シート欠失）ならびにgp-41融合ドメインベースの免疫原）の構築によって補助され得る。

40

## 【0276】

エンベロープタンパク質産生のための安定なCHO細胞株が、最適化したエンベロープポリペプチドコード配列（gp120、o-gp140、gp120V2、o-gp140V2、gp120V1V2、o-gp140V1V2が挙げられるが、これらに限定されない）を使用して開発されている。

## 【0277】

さらに、以下のプライム-ブーストレジメン（例えば、上記のレジメン）は、感染した被験体におけるウイルス負荷を低減すること、そしておそらくHIV関連疾患の進行を（未処置の被験体と比較して）遅延または予防することを助けるために有利なようである。

## 【0278】

50

例示的な抗原性組成物および免疫原性研究を、実施例 9、10、11および12に示す。

【0279】

(実験)

本発明を実施するための特定の実施形態の例を以下に示す。これらの実施例は、例示の目的のみのために提供され、本発明の範囲を限定することを決して意図しない。

【0280】

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

【実施例】

【0281】

(実施例1)

(合成発現カセットの作製)

(A. 合成ポリヌクレオチドの作製)

本発明のポリヌクレオチド配列を、その遺伝子産物の発現を最大化するために操作した。以下の工程の順序は、変化し得る。

【0282】

第1に、HIV-1のコドン用法パターンを、得られる核酸コード配列が高度に発現されるヒト遺伝子において見出されるコドン用法に適合するように改変した。HIVコドン用法は、高含有量のヌクレオチドAまたはTのコドントリプレットを反映する。HIV-1コドン用法の効果は、DNA配列における高いAT含有量であり、これにより、RNAのAU含有量が高くなり、mRNAの翻訳能力が減少し、不安定になる。対照的に、高度に発現するヒトコドンは、ヌクレオチドGまたはCを好む。野生型配列を、高度に発現するヒト遺伝子において見出されるコドン用法に適合するように改変した。

【0283】

第二に、いくつかの遺伝子についての非機能的改変体を作製した。以下の表(表B)において、いくつかのHIV遺伝子の活性に影響を与える変異を開示する。

【0284】

10

20

【表 B】

表 B

遺伝子	「領域」	例示的変異
Pol	prot	Att = プロテアーゼの減弱により低減した活性 (Thr26Ser) (例えば、Konvalinka ら、1995, J Virol 69: 7180-86) Ina = 変異プロテアーゼ、非機能的酵素 (Asp25Ala)(例えば、Konvalinka ら、1995, J Virol 69: 7180-86)
	RT	YM = 触媒中心 (YMDD_AP; 配列番号 7) の欠失 (例えば、Biochemistry, 1995, 34, 5351, Patel ら) WM = プライマーグリップ領域 (WMGY_PI; 配列番号 8)) の欠失 (例えば、J Biol Chem, 272, 17, 11157, Palaniappan, ら、1997)
	RNase	直接的な変異なし、RnaseH は、RTにおける「WM」変異によって 影響を受ける。
	インテグラーゼ	1) HHCC ドメインの変異, Cys40Ala (例えば、 Wiskerchen ら、1995, J Virol, 69: 376). 2.) 触媒中心の不活化, Asp64Ala, Asp116Ala, Glu152Ala (例えば、Wiskerchen ら、1995, J Virol, 69: 376). 3) 最小のDNA結合ドメイン (MDBD) の不活化, Trp235 の欠失 (例えば、Ishikawa ら、1999, J Virol, 73: 4475). 構築物 int.opt.mut.SF2 および int.opt.mut_C (南アフリカ TV1) は共に、これら全ての変異を含む (1, 2, および 3)
Env	切断部位における変異 (例えば、mut1-4, 7)  グリコシル化部位における変異 (例えば、GM 変異体(例えば、 V1 および/または V2 中の Q 残基の、N 残基への変化) はまた、配列中の変更された残基によっても命名され得る)	
Tat	トランス活性化ドメインにおける Tat の変異体 (例えば、Caputo ら、1996, Gene Ther. 3:235) cys22 変異体 (Cys22Gly) = TatC22 cys37 変異体 (Cys37Ser) = TatC37 cys22/37 二重 変異体 = TatC22/37	

10

20

30

40

【表 B A】

遺伝子	「領域」	例示的変異
Rev		Revドメインにおける変異(例えば、Thomas ら、 1998, <i>J Virol.</i> 72:2935-44) RNA 結合核局在 ArgArg38,39AspLeu における変異 = M5 活性化ドメイン LeuGlu78,79AspLeu における変異 = M10
Nef		ミリストイル化シグナルおよびオリゴマー化ドメインにおける変異 1. 単一点変異のミリストイル化シグナル: Gly から Ala へ = -Myr 2. N末端の最初の18アミノ酸(サブタイプB, 例えば、SF162) または19アミノ酸(サブタイプC, 例えば、南アフリカクローン) の欠失: -Myr18 または -Myr19 (それぞれ)  (例えば、Peng および Robert-Guroff, 2001, <i>Immunol Letters</i> 78: 195-200) 単一点変異のオリゴマー化 (例えば、Liu ら、2000, <i>J Virol</i> 74: 5310-19) Asp125Gly (sub B SF162) または Asp124Gly (sub C 南アフリカクローン)  (1) HIVビリオンの感染性(複製)および/または(2) CD4 ダウンレギュレーションに影響を与える変異(例えば、Lundquist ら、(2002) <i>J Virol.</i> 76(9):4625-33)
Vif		Vifの変異: 例えば、Simon ら、 1999, <i>J Virol</i> 73:2675-81
Vpr		Vprの変異: 例えば、Singh ら、 2000, <i>J Virol</i> 74: 10650-57
Vpu		Vpuの変異: 例えば、Tiganos ら、 1998, <i>Virology</i> 251: 96-107

10

20

30

## 【0286】

これらの変異のいくつかを含む構築物が、本明細書中に記載される。Vif、vprおよびvpuの合成構築物が記載される。関連する遺伝子産物の機能を低減または排除することは、本明細書の教示を考慮して、上記の表に示される教示を使用して達成され得る。

## 【0287】

本発明の1実施形態において、Gagポリメラーゼ配列の全長コード領域は、合成の最適化されたGag発現カセットによって発現されるウイルス様粒子についてのエピトープの数を増加させるために、合成Gag配列に含まれる。合成HIV-1 Gagポリメラーゼは、(構造タンパク質およびプロテアーゼに加えて)部分的に欠失した機能的酵素である逆転写酵素(RT)およびインテグラーゼ(INT)を発現するので、RT機能およびINT機能を不活化することが重要である。RTおよびINTのリーディングフレームにおけるいくつかのインフレーム欠失は、RT活性およびINT活性に関して、触媒的に非機能的な酵素を達成するために作製され得る。

40

## 【0288】

## 【数 8】

{Jay. A. Levy (Editor) (1995) *The Retroviridae*, Plenum Press, New York. ISBN 0-306-45033X. Pages 215-20; Grimison, B. and Laurence, J. (1995), *Journal Of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 9(1):58-68; Wakefield, J. K., et al., (1992) *Journal Of Virology* 66(11):6806-6812; Esnouf, R., et al., (1995) *Nature Structural Biology* 2(4):303-308; Maignan, S., et al., (1998) *Journal Of Molecular Biology* 282(2):359-368; Katz, R. A. and Skalka, A. M. (1994) *Annual Review Of Biochemistry* 73 (1994); Jacobo-Molina, A., et al., (1993) *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America* 90(13):6320-6324; Hickman, A. B., et al., (1994) *Journal Of Biological Chemistry* 269(46):29279-29287; Goldgur, Y., et al., (1998) *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America* 95(16):9150-9154; Goette, M., et al., (1998) *Journal Of Biological Chemistry* 273(17):10139-10146; Gorton, J. L., et al., (1998) *Journal of Virology* 72(6):5046-5055; Engelman, A., et al., (1997) *Journal Of Virology* 71(5):3507-3514; Dyda, F., et al., *Science* 266(5193):1981-1986; Davies, J. F., et al., (1991) *Science* 252(5002):88-95; Bujacz, G., et al., (1996) *Febs Letters* 398(2-3):175-178; Beard, W. A., et al., (1996) *Journal Of Biological Chemistry* 271(21):12213-12220; Kohlstaedt, L. A., et al., (1992) *Science* 256(5065):1783-1790; Krug, M. S. and Berger, S. L. (1991) *Biochemistry* 30(44):10614-10623; Mazumder, A., et al., (1996) *Molecular Pharmacology* 49(4):621-628; Palaniappan, C., et al., (1997) *Journal Of Biological Chemistry* 272(17):11157-11164; Rodgers, D. W., et al., (1995) *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America* 92(4):1222-1226; Sheng, N. and Dennis, D. (1993) *Biochemistry* 32(18):4938-4942; Spence, R. A., et al., (1995) *Science* 267(5200):988-993.}

10

20

30

## 【0289】

さらに選択されたB細胞エピトープおよび/またはT細胞エピトープが、RTコード配列またはINTコード配列の欠失の内側のGag-ポリメラーゼ構造に付加され、RTおよびINTの機能的改変により欠失される任意のエピトープと置き換えられ、そして増強され得る。代替的に、選択された、RTおよびINT由来のB細胞エピトープおよびT細胞エピトープ(CTLエピトープを含む)は、上記で記載した合成Gagカセットまたは合成GagProtカセットの発現により形成される最小のVLP中に含まれ得る(既知のHIV B細胞エピトープおよびT細胞エピトープについての記載については、HIV Molecular Immunology Database CTL Search Interface; Los Alamos Sequence Compendia, 1987~1997; Internet address: <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/index.html> を参照のこと)。

40

## 【0290】

別の局面において、本発明はEnvコード配列を含み、このEnvコード配列は以下のHIV-コードポリペプチド:gp160、gp140、およびgp120(例えば、HIV-1<sub>SF2</sub>(「SF2」)Envポリペプチドの記載については米国特許第5,79

50

2, 459号を参照のこと)をコードするポリヌクレオチド配列を含むが、これに限定されない。これらのポリペプチド間の関連を、図3(図中で:ポリペプチドは線で表わし、アミノ末端およびカルボキシ末端はgp160ライン上に示され;白丸はオリゴマー形成ドメインを表わし;白四角は膜貫通型架橋ドメイン(TM)を表わし;そして「c」は切断部位を表わし、gp140.mutにおいて、「X」は、切断部位がすでに切断部位として機能しないように改変されていることを示す)に概略的に示す。このポリペプチドgp160は、gp120およびgp41のコード配列を含む。このポリペプチドgp41は、オリゴマー形成ドメイン(OD)および膜貫通型架橋ドメイン(TM)を含む、いくつかのドメインから構成される。天然のエンベロープにおいて、オリゴマー形成ドメインは、gp41トリマー(およびそれ自体)との共有的な相互作用を介して、3つのgp41ポリペプチドがトリマー構造を形成するための非共有結合に必要とされ、gp120ポリペプチドはまた、トリマー構造内で組織化される。1つの切断部位は、およそgp120のポリペプチド配列とgp41に対応する配列ポリペプチド配列との間に存在する。この切断部位は、改変されて、その部位での切断を妨害し得る。生じたgp140配列ポリペプチドは、gp41の膜貫通型架橋ドメインが欠失している、gp160の短縮形態に一致する。このgp140ポリペプチドは、gp41内のオリゴマー形成ドメインの存在の利点により、単量体およびオリゴマー(例えば、トリマー)の両形態で存在し得る。切断部位が改変されて切断を防止し、そしてgp41の膜貫通部分が欠失している状況において、生じたポリペプチド生成物は、所望の「変異」gp140(たとえば、gp140.mut)である。当業者に明らかであるように、切断部位は、様々な方法で改変される。(WO 00/39302も参照のこと)。

#### 【0291】

野生型HIVコード配列(例えば、Gag、Env、Pol、tat、rev、nef、vpr、vpu、vifなど)をコードするは、既知のあらゆるHIV単離物から選択され得、そしてこれらの配列を操作して、本発明の教示に従うそれらの遺伝子産物の発現を最大にする。野生型コード領域は、おそらく以下の一つ以上の方法で改変される。1つの実施形態において、Env、特にV1および/またはV2の超可変領域をコードする配列が欠失された。他の実施形態において、改変は、例えば、Env内の切断部位をコードする配列中に誘導され、オリゴマーgp140が酵素的に切断されてgp120となるのを抑制する(例えば、Earlら、(1990)PNAS USA 87:648~652;Earlら、(1991)J.Virology 65:31~41を参照のこと)。さらに他の実施形態において、超可変領域が欠失され、N-グリコシル化部位は除去され、そして/または切断部位が改変された。上記で記載したように、異なる改変が、異なる遺伝子のコード配列内に誘導され得る(例えば、表Bを参照のこと)。例えば、Tatコード配列は、本明細書の教示に従って改変され、例えば、遺伝子産物のトランス活性化ドメイン(例えば、22位のグリシン残基とシステイン残基との置き換え、Caputoら、(1996)Gene Therapy 3:235)に影響を及ぼした。

#### 【0292】

本発明の合成コード配列を作製するために、遺伝子カセットは目的の全コード配列を含むように設計される。合成遺伝子カセットは、オリゴヌクレオチド合成およびPCR増幅によって構築され、遺伝子フラグメントを生成する。プライマーは、サブクローニングに便利な制限部位を提供するように選択される。次いで、生じたフラグメントをライゲーションし、次いで、適切なベクターにクローニングされる所望の全配列を作製する。最終的な合成配列は、(i)制限エンドヌクレアーゼ消化および分析によってスクリーニングされ、(ii)所望の配列が得られることを確かめるためにDNA配列決定に供され、そして(iii)SDS-PAGEおよびウェスタンブロットにより、発現タンパク質の同定および整合性を確認した。合成コード配列は、Chiron Corp.(Emeryville, CA)でか、またはMidland Certified Reagent Company(Midland, Texas)により構築される。

#### 【0293】

10

20

30

40

50

本発明の合成配列に対する同一％は、例えば、Smith-Waterman検索アルゴリズム (Time Logic, Incline Village, NV) を用いて、以下の模範的なパラメータ：重量マトリックス = nuc 4 x 4 hb ; ギャップオープニングペナルティ (gap opening penalty) = 20、ギャップエクステンションペナルティ (gap extension penalty) = 5、報告義務のある閾値 (reporting threshold) = 1 ; アライメント閾値 (alignment threshold) = 20 で決定され得る。

【0294】

本発明の異なる実施形態 (例えば、構成) の、様々な形態が合わせられ得る。

【0295】

本発明の合成ポリヌクレオチドの例示的な実施形態は、表 C に表される配列を含むが、これらに限定されない。

【0296】

【表 C】

表 C

C型合成によるコドン最適化ポリヌクレオチド

名称	図番号	説明 (コード化)
GagComplPolmut_C (配列番号 9)	6	完全な Gag, Pol, 変異 RT ; 全てインフレーム
GagComplPolmutAtt_C (配列番号 10)	7	完全な Gag, Pol, 変異 RT, 減衰したプロテアーゼ ; 全てインフレーム
GagComplPolmutIna_C (配列番号 11)	8	完全な Gag, Pol, 変異 RT, 非機能プロテアーゼ ; 全てインフレーム
GagComplPolmutInaTatRevNef_C (配列番号 12)	9	完全な Gag, Pol, 変異 RT, 非機能プロテアーゼ, 変異 tat, 変異 rev, 変異 nef ; 全てインフレーム
GagPolmut_C (配列番号 13)	10	Gag, Pol, 変異 RT ; 全てインフレーム
GagPolmutAtt_C (配列番号 14)	11	Gag, Pol, 変異 RT, 減衰した プロテアーゼ; 全てインフレーム
GagPolmutIna_C (配列番号 15)	12	Gag, Pol, 変異 RT, 非機能 プロテアーゼ; 全てインフレーム

【0297】

10

20

30

40

【表 C A】

名称	図番号	説明(コード化)
GagProtInaRTmut_C (配列番号 16)	13	Gag, 非機能プロテアーゼ, 変異 RT
GagProtInaRTmutTatRevNef_C (配列番号 17)	14	Gag, 非機能プロテアーゼ, 変異 RT, 変異 tat, 変異 rev, 変異 nef; 全てインフレーム
GagRTmut_C (配列番号 18)	15	Gag, 変異 RT ; 全てインフレーム
GagRTmutTatRevNef_C (配列番号 19)	16	Gag, 変異 RT, 変異 tat, 変異 rev, 変異 nef; 全てインフレーム
GagTatRevNef_C (配列番号 20)	17	Gag, 変異 tat, 変異 rev, 変異 nef ; 全てインフレーム
gp120mod.TV1.del118-210 (配列番号 21)	18	TV1.c8.2由来 gp120, V1/V2ループおよびシステムの欠失
gp120mod.TV1.delV1V2 (配列番号 22)	19	TV1.c8.2由来 gp120, V1/V2ループの欠失
gp120mod.TV1.delV2 (配列番号 23)	20	TV1.c8.2由来 gp120, V2ループの欠失
gp140mod.TV1.del118-210 (配列番号 24)	21	TV1.c8.2由来 gp140, V1/V2ループおよびシステムの欠失
gp140mod.TV1.delV1V2 (配列番号 25)	22	TV1.c8.2由来 gp140, V1/V2ループの欠失
gp140mod.TV1.delV2 (配列番号 26)	23	TV1.c8.2由来 gp140, V2ループの欠失
gp140mod.TV1.mut7 (配列番号 27)	24	TV1.c8.2由来 gp140, 変異プロテアーゼ切断部位
gp140mod.TV1.tpa2 (配列番号 28)	25	TV1.c8.2由来 gp140, tpa2リーダー配列
gp140TMmod.TV1 (配列番号 29)	26	TV1.c8.2由来 gp140, 膜貫通領域を含む
gp160mod.TV1.del118-210 (配列番号 30)	27	TV1.c8.2由来 gp160, V1/V2ループおよびシステムの欠失

【 0 2 9 8 】

10

20

30

40

【表 C B】

名称	図番号	説明(コード化)
gp160mod.TV1.delV1V2 (配列番号 31)	28	TV1.c8.2由来gp160, V1/V2ループの欠失
gp160mod.TV1.delV2 (配列番号 32)	29	TV1.c8.2由来gp160, V2ループの欠失
gp160mod.TV1.dV1 (配列番号 33)	30	TV1.c8.2由来gp160, V1ループの欠失
gp160mod.TV1.dV1- gagmod.BW965 (配列番号 34)	31	TV1.c8.2由来gp160, V1ループの欠失,BW965由来 Gag ;全てインフレーム
gp160mod.TV1.dV1V2- gagmod.BW965 (配列番号 35)	32	TV1.c8.2由来gp160, V1/V2ループの欠失, BW965由来Gag ;全てインフレーム
gp160mod.TV1.dV2- gagmod.BW965 (配列番号 36)	33	TV1.c8.2由来gp160, V2ループの欠失,BW965由来 Gag ;全てインフレーム
gp160mod.TV1.tpa2 (配列番号 37)	34	TV1.c8.2由来gp160, tpa2 リーダー配列;全てインフレーム
gp160mod.TV1-gagmod.BW965 (配列番号 38)	35	TV1.c8.2由来gp160, BW965由来Gag ;全てインフレーム
int.opt.mut_C (配列番号 39)	36	変異インテグラーゼ
int.opt_C (配列番号 40)	37	インテグラーゼ
nef.D106G.-myr19.opt_C (配列番号 41)	38	変異 nef
p15RnaseH.opt_C (配列番号 42)	39	p15 RNase H;全てインフレーム
p2Pol.opt.YMWM_C (配列番号 43)	40	p2 Pol, RT 変異YM WM ;全てインフレーム
p2Polopt.YM_C (配列番号 44)	41	p2 Pol, RT 変異YM ;全てインフレーム
p2Polopt_C (配列番号 45)	42	p2 Pol ;全てインフレーム

10

20

30

40

【表 C C】

名称	図番号	説明(コード化)
p2PolTatRevNef opt C (配列番号 46)	43	p2 Pol, 変異 RT, 非機能プロテアーゼ, 変異 tat, 変異 rev, 変異 nef ; 全てインフレーム
p2PolTatRevNef.opt.native_C (配列番号 47)	44	p2 pol, tat <sup>ネイティブ</sup> , rev <sup>ネイティブ</sup> , nef <sup>ネイティブ</sup> ; 全てインフレーム
p2PolTatRevNef.opt_C (配列番号 48)	45	p2 Pol, 変異 RT, 非機能プロテアーゼ, 変異 tat, 変異 rev, 変異 nef; 全て インフレーム; 全てインフレーム
protInaRT.YM.opt_C (配列番号 49)	46	非機能プロテアーゼ, 変異 RT, 変異 YM; 全てインフレーム
protInaRT.YMWM.opt_C (配列番号 50)	47	非機能プロテアーゼ, RT 変異 YM WM; 全てインフレーム
ProtRT.TatRevNef.opt_C (配列番号 51)	48	変異 RT, 非機能プロテアーゼ, 変異 tat, 変異 rev, 変異 nef ; 全てインフレーム
rev.exon1_2.M5-10.opt_C (配列番号 52)	49	変異 rev エキソン1 および 2 ; 全てインフレーム
tat.exon1_2.opt.C22-37_C (配列番号 53)	50	変異 tat エキソン1 および 2 ; 全てインフレーム
tat.exon1_2.opt.C37_C (配列番号 54)	51	変異 tat エキソン1 および 2 ; 全てインフレーム
TatRevNef.opt.native_ZA (配列番号 55)	52	tat <sup>ネイティブ</sup> , rev <sup>ネイティブ</sup> , nef <sup>ネイティブ</sup> ; 全てインフレーム
TatRevNef.opt_ZA (配列番号 56)	53	変異 tat, 変異 rev, 変異 nef ; 全てインフレーム
TatRevNefGag C (配列番号 57)	54 , Gag	変異 tat, 変異 rev, 変異 nef, Gag ; 全てインフレーム
TatRevNefgagCpollna C (配列番号 58)	55	変異 tat, 変異 rev, 変異 nef, 完全な Gag, pol, 変異 RT, 非機能プロテアーゼ, ; 全てインフレーム

10

20

30

40

【 0 3 0 0 】

【表 C D】

名称	図番号	説明(コード化)
TatRevNefGagProtInaRTmut C (配列番号 59)	56	変異 tat, 変異 rev, 変異 nef, Gag, 非機能プロテアーゼ, 変異 RT, ; 全てインフレーム
TatRevNefProtRT opt C (配列番号 60)	57	変異 tat, 変異 rev, 変異 nef, 非機能プロテアーゼ, 変異 RT, ; 全てインフレーム
gp140modTV1.mut1.dV2 (配列 番号183)	104	TV1由来の、gp120/gp41間の 細胞内プロテアーゼ切断部位に おいて変異 envした(切断を妨害 し得、そしてタンパク質精製を 容易にし得る)  第2の可変領域(V2)の欠失
gp140modTV1.mut2.dV2 (配列 番号184)	105	TV1由来の、gp120/gp41間の 細胞内プロテアーゼ切断部位に おいて変異 envした(切断を妨害 し得、そしてタンパク質精製を 容易にし得る)  第2の可変領域(V2)の欠失
gp140modTV1.mut3.dV2 (配列 番号185)	106	TV1由来の、gp120/gp41間の 細胞内プロテアーゼ切断部位に おいて変異 envした(切断を妨害 し得、そしてタンパク質精製を 容易にし得る)  第2の可変領域(V2)の欠失
gp140modTV1.mut4.dV2 (配列 番号186)	107	TV1由来の、gp120/gp41間の 細胞内プロテアーゼ切断部位に おいて変異 envした(切断を妨害 し得、そしてタンパク質精製を 容易にし得る)  第2の可変領域(V2)の欠失

10

20

30

40

【表 C E】

名称	図番号	説明(コード化)
gp140modTV1.GM161 (配列番号187)	108	TV1由来の、Env の161位アミノ酸でのグリコシル化部位変異(GM)したenv (NからQへの置換)
gp140modTV1.GM161-195-204 (配列番号 188)	109	TV1由来の、Env の161位、195位および204位アミノ酸でのグリコシル化部位変異(GM)したenv (NからQへの置換)
gp140modTV1.GM161-204 (配列番号189)	110	TV1由来の、Env の161位および204位アミノ酸でのグリコシル化部位変異(GM)したenv (NからQへの置換)
gp140mod.TV1.GM-V1V2 (配列番号190)	111	TV1由来の、様々な位置のアミノ酸でのグリコシル化部位変異(GM)したenv (NからQへの置換)(図114も参照のこと)
gp140modC8.2mut7.delV2.Kozmod.Ta (配列番号 191)	112	TV1由来の、gp120/gp41間の細胞内プロテアーゼ切断部位において変異したenv(切断を妨害し得、そしてタンパク質精製を容易にし得る)  第2の可変領域(V2)の欠失  5' Kozak 配列および3' TAAA 末端配列
Nef-myrD124LLAA (配列番号203)	115	ミリストイル化部位に変異を有するNef
gp160mod.TV2 (配列番号 205)	117	TV2由来env

## 【0302】

(B. 本発明の合成ポリヌクレオチドを含む発現カセットの作製)

本発明の合成DNAフラグメントは、以下の発現ベクターにクローニングされる：一時的な発現アッセイおよびDNA免疫研究のためのpCMVKm2 (pCMVKm2は、pCMV6a (Chapmanら、Nuc. Acids Res. (1991) 19:3979~3986) から誘導され、そしてカナマイシン選択マーカー、ColE1複製起点、CMVプロモーターエンハンサーおよびイントロンA、次いで、下記に記載される合成配列のための挿入部位、次いで、ウシ成長ホルモン由来のポリアデニル化シグナルを含む - - pCMVKm2ベクターは、pCMV-linkを生成するためにポリリンカー部位

10

20

30

40

50

が pCMVKm2 に挿入されたという点においてのみ、pCMV-link ベクターとは異なる) ; チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞における発現のための pESN2 dhfr および pCMVPLEdhfr (pCMVIIII としても公知である) ; およびバキュロウイルス発現系において用いるための pAcc13 シャトルベクター (pAcc13 は、Munemitsu S. ら、Mol Cell Biol. 10 (11) : 5977 ~ 5982、1990 に記載される pAcc12 由来であった)。これらのベクターの説明については、共有に係る WO 00/39303、WO 00/39302、WO 00/39304、WO 02/04493 も参照のこと。

#### 【0303】

簡単に、pCMVPLEdhfr (pCMVIIII) の構築を下記に示した。DHFR カセットを構築するために、EMCV IRES (内部リボソーム侵入部位 (internal ribosome entry site)) リーダーを、pCite-4a+ (Novagen, Inc., Milwaukee, WI) から PCR 増幅し、そして Xba-Nco フラグメントとして pET-23d (Novagen Inc., Milwaukee, WI) に挿入し、pET-EMCV を得た。dhfr 遺伝子を、pESN2 dhfr から増幅し、翻訳終止コドンに代わって Gly-Gly-Gly-Ser スペーサーを有する産物を得、そして Nco-BamH1 フラグメントとして挿入され、pET-E-DHFR を得た。次に、弱められた neo 遺伝子を、pSV2Neo (Clontech, Palo Alto, CA) 誘導體から PCR 増幅し、そして pET-E-DHFR の独自の BamH1 部位に挿入し、pET-E-DHFR/Neo (m2) を得た。次いで、pCDNA3 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) 由来のウシ成長ホルモターミネターを、neo 遺伝子の下流に挿入し、pET-E-DHFR/Neo (m2) BGHt を得た。EMCV-dhfr/neo 選択マーカーカセットフラグメントを、pET-E-DHFR/Neo (m2) BGHt の切断により調製した。CMV エンハンサー/プロモーター+イントロン A を、HindIII-SalI フラグメントとして、pCMV6a (Chapman ら、Nuc. Acids Res (1991) 19 : 3979 ~ 3986) から pUC19 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) に移した。Nde1 部位から Sap1 部位までを、pUC19 のベクター骨格から欠失させた。上記に記載した DHFR カセットを、EMCV IRES が CMV プロモーターの次に来て最終構築体を作製するように、この構築物に加えた。このベクターはまた、amp<sup>r</sup> 遺伝子および SV40 複製開始起点を含んだ。

#### 【0304】

本発明の発現ベクターは、本明細書中に開示される (例えば、図で示される) 一つより多いの合成コード配列を含む。発現カセットが 1 つ以上のコード配列を含む場合、コード配列はすべてインフレームであって、1 つのポリタンパク質を生成し得るか ; あるいは、1 つより多いポリペプチドコード配列は、ポリシストロンのメッセージを含み得、ここで例えば、IRES は、それぞれのポリペプチドコード配列に対して、5' に位置する。

#### 【0305】

(実施例 2)

(合成コード配列についての発現アッセイ)

野生型配列は、合成 HIV 由来の配列がクローニングされるベクターと同じ特徴を有する発現ベクターにクローニングされる。

#### 【0306】

野生型 (任意の公知の単離体) および対応する合成配列を有する様々なベクターについての発現効率を、以下のように評価する。いくつかの哺乳動物細胞株 (293、RD、COS-7、および CHO ; 全て American Type Culture Collection、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 から入手される) 由来の細胞を、トランスフェクション試薬 LT1 (Panvera Corporation、545 Science D

10

20

30

40

50

r.、Madison、WI)中の2 $\mu$ gのDNAを用いてトランスフェクトする。これらの細胞を、縮小(reduced)血清培地(Opti-MEM、Gibco-BRL、Gaithersburg、MD)中で5時間インキュベートする。次いで、培地を以下のように標準培地と入れ換える；293細胞(IMDM 10%ウシ胎仔血清、2%グルタミン(BioWhittaker, Walkersville, MD))；RD細胞およびCOS-7細胞(D-MEM、10%ウシ胎仔血清、2%グルタミン(Opti-MEM、Gibco-BRL、Gaithersburg、MD))；ならびにCHO細胞、Ham's F-12、10%ウシ胎仔血清、2%グルタミン(Opti-MEM、Gibco-BRL、Gaithersburg、MD)。これらの細胞を、48時間か60時間のいずれかの時間にわたりインキュベートする。上清を収集して、0.45 $\mu$ mシリンジフィルターを通して濾過し、そして必要に応じて-20で保存する。

10

#### 【0307】

上清を、HIV抗原に対する適切なモノクローナル抗体(例えば、HIVコア抗原に対するマウスモノクローナル)でコーティングした96ウェルプレートを用いたCoulter p24-アッセイ(Coulter Corporation、Hialeah、FL、US)を用いて評価する。最適なHIV抗原は、コーティングされたウェルに結合し、HIVに対するビオチン化抗体は、この結合した抗原を認識する。結合体化ストレプトアビジン(streptavidin)-セイヨウワサビペルオキシダーゼはビオチンと反応する。ペルオキシダーゼとTMB基質との反応により、発色する。反応を、4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の添加により停止させる。色の強度は、サンプル中のHIV抗原の量に、直接的に比例する。

20

#### 【0308】

チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞をまた、製造業者の指導書に従って、Mirus TransIT-LT1ポリアミントランスフェクション試薬(Pan Vera)を用いて、本明細書中に記載される合成HIVポリペプチドをコードするプラスミドDNA(例えば、pESN2dhfrまたはpCMVIEIベクター骨格)でトランスフェクトし、そして96時間インキュベートする。96時間後、培地を選択培地(250 $\mu$ g/mlのG418を含む特別なF12)に換え、細胞を1:5に分け、さらに48時間インキュベートする。コロニーが形成されるときにコロニーの形成が開始するまで培地を5~7日ごとに入れ換え、96ウェルにプレートにプレートし、そしてCapture ELISAによりスクリーニングする。ポジティブクローンを24ウェルプレートに広げ、上に記載のように、Capture ELISAによってHIVタンパク質産生について数回スクリーニングする。24ウェルプレート内がコンフルーエンスに達した後、ポジティブクローンをT25フラスコ(Corning、Corning、NY)に広げる。コンフルーエンス後、これらを数回スクリーニングし、ポジティブクローンをT75フラスコに広げる。

30

#### 【0309】

ポジティブT75クローンをLN2中で凍結し、最も発現の高いクローンを、様々な濃度の0~5 $\mu$ Mメトトレキセート(MTX)で増幅させ、100mm培養皿中にプレートする。プレートをコロニー形成についてスクリーニングし、そして全てのポジティブクローズド(closed)を、上記に記載のように再び広げる。クローンを広げ、捕捉ELISAによって各工程で増幅およびスクリーニングする。ポジティブクローンを、各メトトレキセートレベルで凍結する。最も多く生成されるクローンを、より大きなバイオリアクターにスケールアップするように低血清懸濁培地条件に広げ、そして適応させるように、灌流バイオリアクター(3L、100L)中で増殖させる。

40

#### 【0310】

本発明を支持して実施された実施例からのデータは、多様な細胞株において発現する場合、合成HIV発現カセットが、ネイティブの(野生型)配列に関連して、それらのタンパク質産物の生成の劇的な増加を提供し、そして、所望のHIVポリペプチドを発現する、安定トランスフェクトされたCHO細胞株が生成され得ることを示す。CHO細胞を

50

用いたHIVポリペプチドの生成は、(i)正しいグリコシル化形パターンおよびタンパク質高次構造(MAbのパネルへの結合により決定される場合);(ii)CD4レセプター分子への正しい結合;(iii)非哺乳動物細胞混入の非存在(例えば、昆虫ウイルスおよび/または昆虫細胞);および(iv)容易な精製を提供する。

#### 【0311】

(実施例3)

(発現のウエスタンブロット分析)

本明細書中に記載されるHIV発現カセットをトランスフェクトした細胞のウエスタンブロット分析を、共有に係るWO 00/39302に記載されるように本質的に実施する。ヒト293細胞を、実施例2に記載されるように、ネイティブまたは合成のHIV発現カセットを含む、pCMV6のベースのベクターでトランスフェクトする。細胞を、トランスフェクション後、60時間培養する。上澄みを記載したように調製する。細胞溶解物を、以下のように調製する。細胞を、リン酸緩衝生理食塩水で1回洗浄し、界面活性剤[0.1M Tris-HCl(pH7.5)中の1% NP40(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)]で溶解し、そして溶解物を新しいチューブに移す。SDS-ポリアクリルアミドゲル(前もって調製した(pre-cast)8~16%;Novex, San Diego, CA)に、20 $\mu$ lの上清または12.5 $\mu$ lの細胞溶解液を充填する。タンパク質スタンダードもまた、充填する(5 $\mu$ l、広いサイズ範囲のスタンダード;BioRad Laboratories, Hercules, CA)。電気泳動を行い、BioRad Transfer Chamber(BioRad Laboratories, Hercules, CA)を用いて、製造業者(Millipore)によって推奨される転写緩衝液を用いて、100ボルトで90分間、転写を実施し、タンパク質をImmobilon P膜(Millipore Corp., Bedford, MA)に転写させる。この膜を、HIV-1-ポジティブヒト患者血清にさらし、そしてo-フェニレンジアミンジヒドロクロリド(OPD;Sigma)を用いて免疫染色する。

10

20

#### 【0312】

イムノブロッティング分析の結果を用いて、合成HIV発現カセットを含む細胞が、ネイティブな発現カセットを含む細胞よりも、1細胞当り高い濃度で、期待されるHIV-ポリペプチドを生成することを示す。

30

#### 【0313】

(実施例4)

合成HIV発現カセットのインビボ免疫原性

A. 免疫

合成HIV発現カセットの免疫原性を評価するために、マウス研究を実施し得る。プラスミドDNA(例えば、本発明の合成配列を含む発現カセットを有するpCMVKM2)を、100 $\mu$ lの総注射容量において以下の最終濃度まで希釈する:20 $\mu$ g、2 $\mu$ g、0.2 $\mu$ gおよび0.02 $\mu$ g。希釈DNAの起こり得るネガティブな希釈効果を克服するために、各サンプル中の総DNA濃度を、ベクター(pCMVKM2)単独を使用して、20 $\mu$ gまで上昇させる。コントロールとして、ネイティブな対応するポリペプチドをコードする発現カセットを含むプラスミドDNAを、同様に扱う。4匹のBalb/cマウス(Charles River, Boston, MA)の12群に、種々の投薬量を使用して筋肉内免疫する(50 $\mu$ l/肢、前脛骨筋中に筋肉内注射)。

40

#### 【0314】

B. 体液性免疫応答

体液性免疫応答を、マウス血清の適切な抗HIV抗体ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)を用いて、免疫後0および4週目(群5~12)、そしてさらにそれぞれ免疫後6および8週目、2回目の免疫後2および4週目(群1~4)に検査する。

#### 【0315】

血清の抗体価を抗HIV抗体ELISAにより決定する。簡潔には、免疫マウス由来の

50

血清を、適切なH I Vタンパク質（例えば、G a gについてはH I V p 5 5）に対する抗体についてスクリーニングした。E L I S Aマイクロタイタープレートを、1ウェルあたり0.2 μgのH I Vタンパク質で一晩コートし、4回洗浄する；続いて、ブロッキングを、P B S - 0.2% T w e e n ( S i g m a )で2時間行う。ブロッキング溶液の除去後、100 μlの希釈マウス血清を加える。血清を1/25希釈で試験し、その後3倍系列希釈で試験する。マイクロタイタープレートを4回洗浄し、そしてペルオキシダーゼ結合抗マウスI g G二次抗体（P i e r c e , R o c k f o r d , I L）とともにインキュベートする。E L I S Aプレートを洗浄し、そして100 μlの3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（T M B ; P i e r c e）を1ウェルあたりに加えた。各ウェルの光学密度を15分後に測定する。報告した力価は、最大半値光学密度（O . D .）を与えた血清の希釈率の逆数である。 10

#### 【0316】

プラスミド-DNAでのマウス免疫の結果を使用して、合成発現カセットが、ネイティブな発現カセットと比較して、免疫原性の向上を提供することを示す。また、2回目のブースト免疫は、2週間後に二次免疫応答を誘導する（グループ1~3）。

#### 【0317】

##### C. 細胞性免疫応答

特異的細胞傷害性Tリンパ球（C T L）の頻度を、ペプチドをパルスしたB a l b / cマウスC D 4細胞の標準的なクロム放出アッセイにより評価する。H I Vタンパク質発現ワクシニアウイルスに感染したC D - 8細胞を、ポジティブコントロールとして使用する（v v - タンパク質）。簡潔には、脾臓細胞（エフェクター細胞、E）を、（上記のように免疫した）B A L B / cマウスから得る。細胞を培養し、再刺激し、そして例えば（D o e , B . およびW a l k e r , C . M . , A I D A 10 ( 7 ) : 7 9 3 - 7 9 4 , 1 9 9 6に）記載されたG a gペプチドでパルスした標的細胞に対するC T L活性についてアッセイする。細胞傷害活性を、標準的な<sup>51</sup>Cr放出アッセイにおいて測定する。標的（T）細胞をエフェクター（E）細胞とともに種々のE : T比で4時間培養し、そして複製ウェルからの平均c p mを使用して%特異的<sup>51</sup>Cr放出（%）を算出する。 20

#### 【0318】

細胞傷害性T細胞（C T L）活性を、本明細書中で記載したH I V DNA構築物で免疫したマウスから回収した脾細胞において測定する。DNA免疫動物由来のエフェクター細胞は、C T L応答を示す、H I VペプチドでパルスしたS V - B A L B（M H Cが一致した）標的細胞の特異的溶解を示す。ペプチドでパルスされ、そしてM H Cが一致しないマウス系統（M C 5 7）に由来する標的細胞は、溶解されない。C T Lアッセイの結果を使用して、DNA免疫による、細胞傷害性Tリンパ球（C T L）応答の誘導についての合成H I V発現カセットの増加した効力を示す。 30

#### 【0319】

##### （実施例5）

合成H I V発現カセットのインビボ免疫原性

##### A. 一般的な免疫方法

合成H I V発現カセットの免疫原性を評価するために、モルモット、ウサギ、マウス、マカクアカゲサル、およびヒヒを使用する研究を行う。研究を代表的には以下のように構築する：DNA免疫単独（単回または複数回）；DNA免疫に続いてタンパク質免疫（ブースト）；DNA免疫に続いてシンドビス粒子免疫；シンドビス粒子単独による免疫。 40

#### 【0320】

##### B. モルモット

実験を、以下のように、モルモットを使用して実施し得る。各6匹のモルモットを含む群を、0、4および12週目に、本明細書中に記載される1以上の配列を含む発現カセットをコードするプラスミドDNAで、筋肉内または粘膜にて免疫する。続いて、約18週目に、単一用量の、プラスミドブーストの配列によってコードされるH I Vタンパク質および/または他のH I Vタンパク質で、動物をブーストする（筋肉内、皮内または粘膜） 50

。抗体力価（相乗平均力価）を、3回目のDNA免役の2週間後およびタンパク質ブーストの2週間後に測定する。これらの結果を使用して、免役応答の生成のための合成構築物の有用性、およびDNA免役後の免役応答を増強するためにタンパク質ブーストを提供することの利点を証明する。

#### 【0321】

##### C. ウサギ

実験を、以下のように、ウサギを使用して実施し得る。ウサギを、本明細書中に記載されるHIVタンパク質をコードするプラスミドDNAで、筋肉内、粘膜、または皮内にて（Biojectニードルレスシリンジを使用して）免疫する。核酸免役に、初回免役後のタンパク質ブーストが続く。代表的には、本発明の合成HIVポリペプチドコードポリヌクレオチドを含む構築物は、ウサギにおいて、高度に免疫原性であり、そしてわずか2回の免役後に実質的な抗原結合抗体応答を生成する。

10

#### 【0322】

##### D. 体液性免役応答

任意の免役動物モデルにおいて、体液性免役応答を、免役動物由来の血清標本において、免役後の種々の時間で、抗HIV抗体ELISA（酵素結合免役吸着アッセイ）を用いて検査する。血清の抗体力価を、上記のように抗HIV抗体ELISAによって決定する。簡潔には、免役動物由来の血清を、その動物を免疫するために使用したDNAおよび/またはポリペプチドによってコードされるHIVポリペプチド/タンパク質に対する抗体についてスクリーニングする。ELISAマイクロタイタープレートのウェルを、選択したHIVポリペプチド/タンパク質で一晩コートし、4回洗浄する；その後、ブロッキングを、PBS-0.2% Tween（Sigma）で2時間行う。ブロッキング溶液の除去後、100 $\mu$ lの希釈マウス血清を加える。血清を、1/25希釈率で試験し、そしてその後3倍系列希釈により試験する。マイクロタイタープレートを4回洗浄し、そしてペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG二次抗体（Pierce, Rockford, IL）とともにインキュベートする。ELISAプレートを洗浄し、そして100 $\mu$ lの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB; Pierce）を1ウェルあたりに加えた。各ウェルの光学密度を15分後に測定する。力価を、最大半値光学密度（O.D.）を与えた血清希釈率の逆数として代表的に報告した

20

細胞性免疫応答もまた評価し得る。

30

#### 【0323】

##### （実施例6）

本発明の合成HIVポリヌクレオチドを含む発現カセットを使用する、ヒヒおよびマカクアカゲサルのDNA免役

##### A. ヒヒ

4匹のヒヒを、本明細書中に記載の遺伝子送達ベクターを使用して、3回（0、4および8週目）、四頭筋への筋肉内にて両側性に、または粘膜にて免役する。各免役の2週間後に動物から採血し、そしてHIV抗体ELISAを単離した血漿で実施する。ELISAを、二次抗体結合体が、1:500の希釈率で使用される抗ヒトIgG、g-鎖特異的ペルオキシダーゼ結合体（Sigma Chemical Co., St. Louis, MD 63178）であることを除き、本質的には上記のように実施する。50 $\mu$ g/mlの酵母抽出物を、ヒヒの既存の酵母抗体に起因する非特異的バックグラウンドを低減させるために、血漿サンプルおよび抗体結合体の希釈物に加え得る。4回目の免役の2週間後（14週目）に、ヒヒにおいて、リンパ球増殖応答が観察され、そしてHIVポリペプチドでのブースト後（44週目および76週目）に実質的に増強される。このような増殖結果はT-ヘルパー細胞機能の誘導を示す。

40

#### 【0324】

##### B. マカクアカゲサル

本発明の合成コドン改変HIVポリペプチドコードポリヌクレオチドの向上した効力は、発現プラスミド中に構築される場合、マカクアカゲサルにおいて確認され得る。代表的

50

には、マカクは、2または3回の1mg用量の改変HIVポリヌクレオチドの後、検出可能なHIV特異的CTLを有する。まとめると、これらの結果は、合成HIV DNAが非ヒト霊長類において免疫原性であることを証明する。中和抗体もまた検出され得る。

【0325】

(実施例7)

(モノシストロン性およびマルチシストロン性構築物の同時トランスフェクション)

本発明は、マルチ、モノシストロン性発現カセットでの同時トランスフェクション、ならびに1以上のマルチシストロン性発現カセットでの同時トランスフェクション、またはその組合せを包含する。

【0326】

このような構築物は、種々の組合せで、一過性トランスフェクション研究のために293T細胞中にトランスフェクトされ得る。

【0327】

例えば、ニシストロン性(bicistronic)構築物が作製され得る。この構築物では、異なるHIVポリペプチドのためのコード配列が単一CMVプロモーターの制御下にあり、そして2つのコード配列の間に、IRES(internal ribosome entry site (EMCV IRES); Kozak, M., Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 27(45): 385-402, 1992; Witherell, G. W.ら Virology 214: 660-663, 1995)配列が、第1のHIVコード配列の後で第2のHIVコード配列の前に導入される。

【0328】

細胞培養物から集めた上清を、HIVタンパク質の存在について試験し、そして上清は、適切なタンパク質がトランスフェクト細胞において発現されることを示す(例えば、Envコード配列が存在した場合、対応するEnvタンパク質が検出された; Gagコード配列が存在した場合、対応するGagタンパク質が検出された、など)。

【0329】

これらの細胞株によるキメラVLPの産生は、電子顕微鏡分析を使用して決定され得る(例えば、共有に係るWO 00/39302を参照)。

【0330】

(実施例8)

(HIV-1ワクチンの付属遺伝子成分: 変異型Tat、RevおよびNefのC型抗原の機能分析)

HIV-1調節および付属遺伝子は、ウイルスの病原性における役割、高度に保存されたCTLエピトープの高い割合、およびウイルスのライフサイクルにおける早期の発現に起因して、HIVワクチンの成分として大きな注目を受けた。これらの遺伝子の様々な所望されない特性に起因して、ワクチン成分としてのそれらの安全性および安定性に関する疑問が生じる。本発明に支持して実行された実験は、効率的な発現および潜在的な有害な機能の不活性化について、候補HIV-1サブタイプC tat変異体、rev変異体およびnef変異体を分析した。他のHIVサブタイプの付属遺伝子は、同様に評価され得る。

【0331】

南アフリカHIV-1サブタイプCのコンセンサスなTatタンパク質、Revタンパク質およびNefタンパク質をコードする、配列改変された変異体tat遺伝子、rev遺伝子およびnef遺伝子は、重複合成オリゴヌクレオチドおよびPCRベースの部位特異的変異誘発を使用して構築された。それぞれのコンセンサス配列とよく似ている単離体の野生型遺伝子の構築物もまた、PCRによって作製した。構築物のインビトロ発現を、ウェスタンブロットによって分析した。Tat変異体のトランス活性化の活性およびRev変異体の核RNA輸送活性を、レポーター遺伝子ベースの機能的アッセイを使用した様々な細胞株のトランスフェクションの後に研究した。

10

20

30

40

50

## 【0332】

全ての構築物のインビトロでの発現を、Tat、RevまたはNef発現プラスミドを用いたマウスのDNAワクチン接種によって生成された抗原特異的マウス血清を使用して、ウェスタンブロットによって実証した。配列改変遺伝子の発現レベルは、野生型遺伝子よりも有意に高かった。

## 【0333】

サブタイプB Tat cDNAおよびサブタイプC Tat cDNAを、Tat C22、Tat C37およびTat C22/37を得るために変異させた。Tat活性は、3つの細胞株(RD、HeLaおよび293)においてアッセイする。サブタイプCコンセンサスなTatの背景において、C22での単一変異は、LTR依存CAT発現を不活性化するために不十分であった。対照的に、この活性は、単一変異(C37)または二重変異(C22C37)を使用して、RD細胞、293細胞およびHeLa細胞において有意に損なわれた(表Bを参照のこと)。一致する結果を、サブタイプB株由来のTat変異体から得た。

10

## 【0334】

例示的な結果を、293細胞中のLTR-CATプラスミドでのTat変異体のトランス活性化について図4に示す。3つの独立したアッセイを、各構築物で行った(図4、説明文(1)、(2)、(3))。

## 【0335】

サブタイプCの構築物Tat C22 Prot RT Tat Rev NefおよびProt RT Tat C22 Rev Nefは、Tat C22単独と比較した場合、減少したTat活性を示した。これは、おそらく融合タンパク質によって生じた構造の変化に起因する。

20

## 【0336】

Rev構築物について、機能の損失について試験するために、ネイティブなRevまたは変異したRevを含むレポータープラスミドを用いたCATアッセイを、使用した。図5に示されるように、野生型Revと比較すると、二重変異(M5M10)を有するサブタイプC RevのmRNA輸送機能は、有意に低かった(表Bを参照のこと)。バックグラウンドレベルは、「偽(mock)」データおよびRevを含まないpDM128レポータープラスミドデータにおいて示される。2つの独立したアッセイを、各構築物について行った(図5、説明文(1)、(2))。

30

## 【0337】

Nef特異的機能を測定するためのアッセイもまた行った(Nef変異体は、表Bにおいて記載される)。例えば、FACS分析を使用して、細胞表面上のMHC1およびCD4の存在を探す。細胞を、Nef発現の存在および不在(コントロールため)下で、ならびにネイティブなnefタンパク質および変異したnefタンパク質をコードする本発明の合成ポリヌクレオチドを使用してアッセイした。MHC1発現およびCD4発現の下方制御は、nef遺伝子産物が、機能的でないことを示す(すなわち、nefが非機能的である場合、これらは下方制御でない)。

## 【0338】

これらのデータは、tat DNA免疫原およびrev DNA免疫原の損なわれた機能が多成分HIV-1サブタイプCワクチンの一部を形成し得ることを実証する。他のグループによって以前に公開されたデータと対照的に、C22変異は、Tatのトランス活性化機能を有意に不活性化しなかった。C37変異は、サブタイプC Tatタンパク質およびサブタイプB Tatタンパク質の不活性化に必要であるようである。

40

## 【0339】

(実施例9)

(プラスミドをコードする様々なHIVポリペプチドの免疫原性の評価)

上記のように、本明細書中に記載される任意のポリヌクレオチドまたは発現カセットの免疫原性を、容易に評価する。以下の表(表D)は、ウサギ中で、エレクトロポレーションを使用して、独立して、そして混合サブタイプ(mixed-subtype)ワクチ

50

ンとしての両方でサブタイプBエンベローププラスミドおよびサブタイプCエンベローププラスミドの免疫原性の比較に関する例示の手順である。このような方法は、任意の他のHIVポリペプチドに等しく適用可能であることが明らかである。

【0340】

(表D)

【0341】

【表D】

Grp	動物	Imm'n #	アジュバント	免疫原	全用量	Vol/ 部位	部位/ 動物	経路
1	1-4	1, 2	-	pCMV 160 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
		3	-	pCMV 160 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
			MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	0.5ml	2	IM/Glut
2	5-8	1, 2	-	pCMV 160 dV2 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
		3	-	pCMV 160 dV2 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
			MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	0.5ml	2	IM/Glut
3	9-12	1, 2	-	pCMV 160 dV1/V2 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
		3	-	pCMV 160 dV1/V2 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
			MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	0.5ml	2	IM/Glut
4	13-16	1, 2	-	pCMV 140 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
		3	-	pCMV 140 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
			MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	0.5ml	2	IM/Glut
5	17-20	1, 2	-	pCMV140dV2TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)

10

20

30

40

【0342】

【表 D A】

Grp	動物	Imm'n #	アジュバント	免疫原	全用量	Vol/ 部位	部位/ 動物	経路
		3	-	pCMV140dV2TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
			MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	0.5ml	2	IM/Glut
6	21-24	1, 2	-	pCMV 140 dV1/V2 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
		3	-	pCMV 140 dV1/V2 TV1 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
			MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	0.5ml	2	IM/Glut
7	25-28	1, 2	-	pSIN140dV2SF162 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
		3	-	pSIN 140 dV2 SF162 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
			MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	0.5ml	2	IM/Glut
8	29-32	1, 2	-	pCMV 140 dV2 SF162 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
		3	-	pCMV 140 dV2 SF162 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
			MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	0.5ml	2	IM/Glut
9	33-36	1, 2	-	pCMV 140 Q154 SF162 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
		3	-	pCMV 140 Q154 SF162 DNA	1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)
			MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	0.5ml	2	IM/Glut

10

20

30

40

【表 D B】

10	37-40	1, 2	-	pCMV 140 dV2 SF162 DNA pCMV 140 dV2 TV1 DNA	1.0mg 1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)	
		3	-	pCMV 140 dV2 SF162 DNA pCMV 140 dV2 TV1 DNA	1.0mg 1.0mg				
		MF59C	プロテイン TBD	0.05mg	IM/Glut				
11	41-44	1, 2	-	pCMV 140 dV2 SF162 DNA pCMV 140 dV2 TV1 DNA	1.0mg 1.0mg	0.5ml	2	IM/Quad (エレクトロ)	
		3	MF59C	プロテイン TBD	0.05mg				IM/Glut

10

20

30

## 【0344】

MF59Cアジュバントは、5%スクアレン、0.5% Tween 80、0.5% スパン85を含有する10mMクエン酸(pH6)のマイクロフルイダイズされたエマルジョンであり、10mLアリコート中で4にて貯蔵される。

## 【0345】

免疫原を、様々なグループにおいて動物に投与するために、以下の表(表E)に記載されるように調製する。濃度は、例えば、使用される配列および/またはタンパク質に起因して、表に記載される濃度から変化し得る。

## 【0346】

## 【表 E】

表 E

群	調製
1~9	<p>免疫1~3：生理食塩水中のpCMVおよびpSINベースのプラスミドDNA+エレクトロポレーション</p> <p>サブタイプBおよびCのプラスミドは、滅菌0.9%生理食塩水中1.0mg/mlの濃度で凍結させて提供される。使用するまで-80℃で保存される。DNAを室温で融解させる；この物質は、透明かまたはわずかに不透明であり、粒子状の物体を含まない。動物を、Ketamine-Xylazine（80mg/ml-4mg/ml）の1×IP用量（動物の体重）の鎮静下で免疫する前に剃毛する。各ウサギを、動物一匹当たり1.0ml、各側面に0.5mlずつのDNA混合物（IM/Quadriceps）で免疫する。続いて、1cm直径、1cm針長を有する6針環状アレイを用いたエレクトロポレーションでDNAを注射する。エレクトロポレーションパルスは、20V/mm、50msパルス長、1パルス/sで与えた。</p> <p>免疫3：タンパク質免疫</p> <p>タンパク質は、クエン酸緩衝液中に0.1mg/mlで提供される。使用するまで-80℃で保存される。室温で融解させる；この物質は、透明かまたはわずかに不透明であり、粒子状の物体を含まない。融解したタンパク質に等量のMF59Cアジュバントを添加し、そしてチューブを反転させて十分に混合した。各ウサギを、動物1匹当たり総量1.0mlのIM/Glut、各側面に0.5mlずつのアジュバント化タンパク質で免疫する。物質を、アジュバントの添加の1時間以内に使用する。</p> <p>免疫1~3：生理食塩水中で合わせたサブタイプBとCのプラスミドDNA</p> <p>免疫原は、滅菌0.9%生理食塩水中で2.0mg/mlの総DNA（1mg/mlの各プラスミド）で提供される。使用するまで-80℃</p>

10

20

30

【0347】

【表 E A】

	<p>で保存される。DNAを室温で融解させる；この物質は、透明かまたはわずかに不透明であり、粒子状の物体を含まない。動物を、Ketamine-Xylazine (80mg/ml-4mg/ml) の1×IP用量 (動物の体重) の鎮静下で免疫する前に剃毛する。各ウサギを、動物一匹当たり1.0ml、各側面に0.5mlずつのDNA混合物 (IM/Quadriceps) で免疫する。続いて、1cm直径、1cm針長を有する6針環状アレイを用いたエレクトロポレーションでDNAを注射する。エレクトロポレーションパルス、20V/mm、50msパルス長、1パルス/s与えた。</p>	10
10~11	<p><b>免疫3：タンパク質免疫</b></p> <p>タンパク質は、クエン酸緩衝液中に0.1mg/mlで提供される。使用するまで-80℃で保存される。室温で融解させる；この物質は、透明かまたはわずかに不透明であり、粒子状の物体を含まない。融解したタンパク質に等量のMF59Cアジュバントを添加し、そしてチューブを反転させて十分に混合した。各ウサギを、動物1匹当たり総量1.0mlのIM/Glut、各側面に0.5mlずつのアジュバント化タンパク質で免疫する。物質を、アジュバントの添加の1時間以内に使用する。</p>	20

【0348】

免疫化 (表 F) および採血 (bleeding) (表 G) スケジュールは、以下の通りである：

【0349】

【表 F】

表 F

免疫化: 週群	1	2	3
0	0	4	16
1	pCMV 160 TV1 DNA	pCMV 160 TV1 DNA	タンパク質 + MF59C
2	pCMV 160 ΔV2 TV1 DNA	pCMV 160 ΔV2 TV1 DNA	タンパク質 + MF59C
3	pCMV 160 ΔV1/V2 TV1 DNA	pCMV 160 ΔV1/V2 TV1 DNA	タンパク質 + MF59C
4	pCMV 140 TV1 DNA	pCMV 140 TV1 DNA	タンパク質 + MF59C
5	pCMV 140 ΔV2 TV1 DNA	pCMV 140 ΔV2 TV1 DNA	タンパク質 + MF59C
6	pCMV 140 ΔV1/V2 TV1 DNA	pCMV 140 ΔV1/V2 TV1 DNA	タンパク質 + MF59C
7	pSIN 140 ΔV2 SFI62 DNA	pSIN 140 ΔV2 SFI62 DNA	タンパク質 + MF59C
8	pCMV 140 ΔV2 SFI62 DNA	pCMV 140 ΔV2 SFI62 DNA	タンパク質 + MF59C
9	pCMV 140 Q154-SFI62 DNA	pCMV 140 Q154-SFI62 DNA	タンパク質 + MF59C
10	pCMV 140 ΔV2 SFI62 DNA + pCMV 140 ΔV2 TV1 DNA	pCMV 140 ΔV2 SFI62 DNA + pCMV 140 ΔV2 TV1 DNA	タンパク質 + MF59C
11	pCMV 140 ΔV2 SFI62 DNA + pCMV 140 ΔV1/V2 TV1 DNA	pCMV 140 ΔV1/V2 TV1 DNA	タンパク質 + MF59C

表 G

採血: 週	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
-3	血清のため の凝固血	TBD									
0	血清のため の凝固血										
容量:	20cc 各々										
方法:	AA/MEV	CP									

10

20

30

40

【 0 3 5 0 】

( 実施例 1 0 )

( G a g および P o l 構築物でのマウス免疫化研究 )

マウスにおいて、以下の構築物：G a g、G a g プロテアーゼ (+ F S) ( G P 1、プロテアーゼ、コドン至適化および I N S の不活性化；G P 2、プロテアーゼ、I N S の不活性化のみ)、フレームシフトを有する G a g P o l インテグラーゼ ( g a g F S p o

50

1)、および Gag Pol インテグラーゼインフレーム (Gag Pol) (図 118 を参照のこと) について、細胞性免疫反応および体液性免疫反応を評価した (実施例 4 に実質的に記載される)。弱力化プロテアーゼ (Gag Pol Att) または非機能性プロテアーゼ (Gag Pol Ina) を有する Gag Pol インテグラーゼインフレームの変形もまた、設計した。

【0351】

インビトロ発現データは、Gag 単独、Gag プロテアーゼ (+FS)、Gag FSpol、および Gag Pol Ina を使用した、p55 Gag および p66 RT の同等の発現を示した。完全に機能的なプロテアーゼまたは弱力化プロテアーゼ (Gag Pol または Gag Pol Att) を備える構築物は、p55 Gag および p66 RT の発現において、おそらくプロテアーゼの細胞毒性効果に起因して有効性がより小さかった。

10

【0352】

pCMV ベクター中の Gag 対 GP1 および Gag 対 GP2 を使用したマウスの DNA 免疫化を、前脛骨筋において筋肉内に実施した。研究の開始時 (0 週) および 4 週間後に、マウスを免疫した。0 週、4 週、6 週において、採血を実施した。使用した DNA 用量は、以下のとおりであった: 20 μg、2 μg、0.2 μg、および 0.02 μg。

【0353】

pCMV ベクター中の Gag 対 gag FSpol を使用したマウスの DNA 免疫化を、前脛骨筋において筋肉内に実施した。研究の開始時 (0 週) に、マウスを免疫し、そして 4 週間後に、Gag (rVV gag) をコードする組換えワクシニアウイルスでチャレンジした。0 週および 4 週において、採血を実施した。使用した DNA 用量は、以下のとおりであった: 20 μg、2 μg、0.2 μg、および 0.02 μg。

20

【0354】

pCMV ベクター中の Gag 対 gag FSpol および Gag 対 gag pol を使用したマウスの DNA 免疫化を、前脛骨筋において筋肉内に実施した。研究の開始時 (0 週) に、マウスを免疫し、そして 4 週間後に、Gag (rVV gag) をコードする組換えワクシニアウイルスでチャレンジした。0 週および 4 週において、採血を実施した。使用した DNA 用量は、以下のとおりであった: 2 μg、0.2 μg、0.02 μg および 0.002 μg。

【0355】

Gag に対する細胞性免疫反応は、試験した全ての改変体について同等であった (例えば、Gag、Gag プロテアーゼ、gag FSpol および Gag Pol Ina はすべて、同等の有効性を有した)。

30

【0356】

Gag に対する体液性免疫反応もまた、GP1 および特に GP2 を除いて同等であった。体液性免疫反応は、機能的なプロテアーゼまたは弱力化プロテアーゼを含む構築物において、より弱かった。このことは、過剰に活性な (overactive) プロテアーゼによって引き起こされる p55 Gag のあまり有効でない分泌に起因し得る。

【0357】

インビトロ実験およびインビボ実験 (本発明の支持で実施した) は、Gag の発現および免疫原性が全ての構築物で同等であることを示唆した。例外は、機能的なプロテアーゼまたは弱力化プロテアーゼを有する Gag Pol インフレームである。これは、プロテアーゼの細胞毒性の影響の結果であり得る。マウスにおける免疫反応は、インビボ発現の相対的レベルと相関した。

40

【0358】

(実施例 11)

(C 型由来エンベロープポリペプチドを使用したタンパク質発現、免疫原性、および中和抗体の産生)

南アフリカ人の個体から回収された C 亜型初代単離体、TV1 に由来するエンベロープ (Env) ワクチンを、以下のようにウサギで試験した。遺伝子カセットを、可変ループ

50

領域、V2およびV1V2の欠失があるHIV-1エンベロープおよび欠失がないHIV-1エンベロープのポリタンパク質のgp120形態(表面抗原)、gp140形態(表面抗原+膜貫通タンパク質、gp41のエクトドメイン)、および全長(gp120+gp41)gp160形態を発現するように設計した。全ての遺伝子を配列改変して、Rev非依存様式での、コードされるEnv糖タンパク質の発現を増強し、そしてそれらを、続いて上記のDNAワクチンおよびタンパク質産生適用のためのpCMVベースのプラスミドベクターにクローニングした。この配列を、本明細書中に記載されるようにコドン最適化した。簡潔には、すべての改変エンベロープ遺伝子を、Chiron pCMV Linkプラスミドベクターに(好ましくは、EcoRI/XhoI部位に)クローニングした。

10

## 【0359】

## (A. タンパク質発現)

TV1 Env抗原の全長(gp160)、短縮gp140(Envエクトドメインのみ)およびgp120のネイティブ型を、本明細書中に記載される発現カセットから産生した。gp140をコードする配列を、293T細胞に一過性にトランスフェクトした。遺伝子産物の発現レベルを、組織内(in-house)抗原捕捉ELISAによって評価した。TV001c8.2、TV001c8.5およびTV002c12.1のネイティブ配列から構築したエンベロープ遺伝子は、インビトロで正確なタンパク質を発現した。gp140TV001c8.2が、最高レベルの発現を示した。さらに、TV1由来クローン8.2から発現されたEnvタンパク質が、CD4レセプタータンパク質に結合すること(このことは、発現されたタンパク質のこの特性が、機能的配置で維持されていることを示す)を見出した。発現されたTV1 gp160タンパク質果のレセプター結合特性/機能性の結果もまた、細胞融合アッセイによって確認した。

20

## 【0360】

全発現は、合成gp140構築物について、ネイティブgp140遺伝子カセットと比較しておおよそ10倍に増加した。改変gp120改変体および改変gp140改変体の両方とも上清中に大量のタンパク質を分泌した。さらに、gp140のV2欠失型およびV1V2欠失型は、インタクトのgp140よりも、おおよそ2倍多いタンパク質を分泌した。概して、合成gp140遺伝子改変体の発現レベルは、ネイティブ配列を有するgp140遺伝子よりも10~26倍増加した。

30

## 【0361】

つまり、試験した各合成構築物は、ネイティブのコード配列を使用した構築物と比べて10倍より高い発現の増大したレベルを示した。さらに、全ての発現されたタンパク質は、推定された分子量のタンパク質であり、CD4に結合することが示された。安定なCHO細胞株を得、そして小規模タンパク質精製方法を使用して、ワクチン研究のためにこれらのタンパク質の少量の各非欠失オリゴマー形態およびV-欠失オリゴマー形態(o-gp140)を産生した。

## 【0362】

## (B. TV001ウイルス単離体およびTV002ウイルス単離体の中和特性)

一過性発現実験は、TV001ウイルス単離体およびTV002ウイルス単離体由来のエンベロープ遺伝子が所望のタンパク質産物を発現することを示した。これらの2つのウイルス株の、18人の感染した南アフリカ人(B垂型およびC垂型)からの血清を使用した相対的中和感度は、以下のとおりである。TV2株は、1:10血清希釈において、18血清中18血清で; 1:50血清希釈において、18血清中16血清で; 1:250血清希釈において、18血清中15血清で中和された。それに比べて、TV1単離体は、1:10血清希釈において、18血清中15血清で; 1:50血清希釈において、18血清中6血清のみで中和され; そして1:250血清希釈において、いずれの試料によっても中和されなかった。さらに、TV001患者血清は、試験したすべての希釈で、TV002単離体に対する中和活性を示した。対照的に、TV002は、1:10血清希釈においてのみ、TV001の中和を示した。これらの結果は、TV001単離体が、感染した宿

40

50

主において、TV002よりもより広範かつより強力な中和抗体反応を誘導し得ることを示唆する。

【0363】

(C.ウサギ研究における改変TV1EnvDNAおよびタンパク質抗原の免疫原性)  
TV1 Env DNA (合成発現カセットを含む)およびタンパク質ワクチンを、下の表Hに示すように投与した。

【0364】

【表H】

表 H

群	プラスミド DNA (0, 4, および 20 週 )	タンパク質追加免疫 (20 週 )
1	pCMVgp160.TV1	o-gp140.TV1
2	pCMVgp160dV2.TV1	o-gp140dV2.TV1
3	pCMVgp160dV1V2.TV1	o-gp140dV1V2.TV1
4	pCMVgp140.TV1	o-gp140.TV1
5	pCMVgp140dV2.TV1	o-gp140dV2.TV1
6	pCMVgp140dV1V2.TV1	o-gp140dV1V2.TV1
7	pCMVgp140dV2.SF162	o-gp140dV2.SF162

【0365】

一群あたり4匹の、7群のウサギを、示したプラスミドDNAおよびオリゴマーのEnvタンパク質抗原で免疫した。3つの用量のDNA(1免疫で1動物あたり1mgのDNA)を、0週目、4週目、および20週目において針注射、続いてエレクトロポレーションにより筋肉内に投与した。20週目に、別の部位にMF59アジュバント中の単回用量のEnvタンパク質100μgを、筋肉内に与えた。

DNA免疫には、C垂型配列改変遺伝子(TV1) - - gp160、gp160dV2、gp160dV1V2、gp140、gp140dV2およびgp140dV1V2 - - ならびにB垂型SF162配列改変gp140dV2を使用した。DNA免疫を、0週目、4週目および20週目に針注射により、筋細胞および常在の抗原提示細胞のトランスフェクションを促進するためにエレクトロポレーションを使用して筋肉内経路によって実施した。

【0366】

20週目に、離れた部位に単回のEnvタンパク質追加免疫(MF59アジュバント中で)を、筋肉内注射により施した。各連続した免疫化に次いで、ELISAにより抗体価を評価した。0週目、4週目、6週目、8週目、12週目、22週目および24週目に、血清試料を回収した。血清抗体価を、ELISAで測定した。96ウエルプレートを、1μg/mlの濃度のタンパク質でコーティングした。血清サンプルを、連続的に3倍に希釈した。ヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ結合体(1:20,000)を、検出に使用した。基質としてTMBを使用し、そして0.6OD(450nm)において抗体価を、読み取った。

PBMC-増殖R5 HIV-1株に対する中和抗体反応を、2つの異なる研究所における2つの異なるアッセイ(Chironにおける5.25レポーター細胞株ベースのアッセイおよびDuke大学におけるDavid MontefioriのPBMCベースのアッセイ)を使用して、免疫したマウスから回収した血清においてモニターした。結果を、図121、図122、および図123に示す。Chironアッセイを、基本的に以下のように実施した。PBMC-増殖C垂型TV001株およびPBMC-増殖C垂型TV002株に対する中和抗体反応を、5.25細胞株を用いる組織内レポーター細胞株アッセイを使用して測定した。この細胞は、その細胞膜上にCD4、CCR5、CXCR4およびBONZOレセプター/コレセプターを有する。親の(parental)CEM細

胞株は、急性リンパ芽球性白血病に罹患した4歳の白人の(Caucasian)女性に由来し、この細胞をヒトB細胞株721.174と融合して、CEMx174を作製した。CCR遺伝子(約1.1kb)を、pBABEpuroレトロウイルスベクターのBamH-I(5')およびSal-I(3')にクローニングし、それに次いでCEMx174に導入した後、LTR-GFPをこの細胞にトランスフェクトした。この細胞の緑色蛍光タンパク質(GFP)を、フローサイトメータ(FACScan)によって検出した。ウイルス中和アッセイについて、50ulの力価決定した(titrate)ウイルスおよび50ulの希釈免疫血清または免疫前血清を、室温で1時間インキュベートした。24ウエルプレートにプレートした、 $10^4$ 細胞/ml細胞を有するウエルに、この混合物を添加し、そして37で5~7日間インキュベートした。次いで、この細胞を、PBSで洗浄した後、2%ホルムアルデヒドで固定した。Cellquestソフトウェアを使用して、Becton Dickinson FACScanで各サンプルについて15,000事象(細胞)を収集した。示したデータは、3連のウエルの平均であった。以下の式： $\% \text{ウイルス阻害} = (\text{ウイルスコントロール} - \text{実験}) / (\text{ウイルスコントロール} - \text{細胞コントロール}) \times 100$ 、を使用して、ウイルスコントロールと比較して、%中和を算出した。採血前に観察された任意のウイルス阻害を、各個々の動物について差し引いている。>50%の値を陽性とし、グレーで強調する。

10

## 【0367】

図122において、「#」は、動物が採血前血清において高いレベルのウイルス阻害(>20%ウイルス阻害)(観察した阻害の大きさ、およびいくつかの場合、有意な中和抗体活性(<50%阻害)の存在について、血清が陽性であるか、または陰性であるかスコアする本発明者らの能力に影響する)を有することを示す。

20

## 【0368】

図123に示すデータについて、単回のタンパク質の追加免疫の後(3回目の後(post-third))回収した血清サンプルを、ウイルスで1:8希釈(細胞添加後1:24)において3連でスクリーニングした。示した値は、対応する採血前コントロールサンプルにおけるp24合成に対する、p24合成の%減少である。0値は、陰性の値が測定されたか、または値が測定されなかったことを示す。NV、(有効でない(not valid))は、免疫前血清におけるウイルス阻害に起因する。p24が、少なくとも80%低減された場合、中和を陽性とし、これらのサンプルを、ダークグレーで強調する。より明るいグレーの陰影付けのサンプルは、p24の合成において少なくとも50%の減少を示した。

30

## 【0369】

図119は、プレートをモノマーのgp120.TV1タンパク質でコートした際のELISAデータを示す。このタンパク質は、免疫に使用したC型遺伝子に相同である。全ての免疫群が、2回目のDNA免疫の後、高い抗体価を産生した。gp140形態のDNAで免疫した群は、1回目のDNA免疫および2回目のDNA免疫の両方の後、gp160形態を使用した群と比べて、相対的により高い幾何平均抗体価を有する。gp140.TV1およびgp140dV1V2.TV1遺伝子の両方は、2回目のDNAの2週間において高い抗体価(約 $10^4$ )を産生した；gp140dV2.TV1プラスミドは、この時点および他のすべての時点で抗体の最高の力価(> $10^4$ )を得た。gp120.TV1タンパク質に対する結合抗体価は、相同のgp140dV2.TV1遺伝子で免疫した群において、約 $10^3$ の力価を示す、異種のgp140dV2.SF162遺伝子で免疫した群よりも高かった。2回目のDNA免疫の後、全ての群が、8週目までに抗体価におけるいくらかの下落を示した。20週でのDNA+タンパク質追加免疫の後、全ての群が、2回目のDNA免疫の後に以前に観察した力価より高い力価に到達した(0.5~1.0対数増加を観察した)。タンパク質追加免疫の後、gp140dV2.TV1DNAまたはgp160dV2.TV1DNAのいずれかによって初回抗原刺激された、o-gp140dV2.TV1タンパク質を受けた全ての動物は、最高の抗体価を示した。

40

50

## 【0370】

結合抗体価をまた、C亜型 o - g p 1 4 0 d V 2 . T V 1 タンパク質またはB亜型 o - g p 1 4 0 d V 2 . S F 1 6 2 タンパク質のいずれかでコートしたE L I S A プレートを使用して測定した(図120)。全てのT V 1 E n v 免疫化群について、オリゴマータンパク質、o - g p 1 4 0 d V 2 . T V 1 を使用して測定した抗体価は、モノマー(非V2欠損失)タンパク質、g p 1 2 0 . T V 1 を使用して測定した抗体価より高かった。実際、これらの群について、異種のB亜型 o - g p 1 4 0 d V 2 . S F 1 6 2 タンパク質で観察した力価は、C亜型T V 1 g p 1 2 0 で測定された力価と同等であるか、またはそれよりも高かった。それにもかかわらず、C亜型抗原で免疫した全ての群は、B亜型 g p 1 4 0 d V 2 . S F 1 6 2 に結合する力価よりも高い、C亜型 g p 1 4 0 d V 2 . T V 1 タンパク質に結合する力価を示した。逆に、g p 1 4 0 d V 2 . S F 1 6 2 免疫原で免疫した群は、オリゴマーB亜型タンパク質での、そのC亜型対応物より高い抗体価を示した。概して、3つのアッセイすべては、高い抗体交差反応抗体が、C亜型T V 1 ベースのD N A 免疫原およびタンパク質抗原によって産生されることを示した。

10

## 【0371】

これらの結果は、C亜型T V 1 由来のE n v D N A 抗原およびタンパク質抗原が、免疫されたウサギにおいて高い力価の抗体を誘導する免疫原であること、ならびにB亜型R5ウイルス株およびC亜型R5ウイルス株の両方に対する中和抗体の実質的な証拠であることを示す。特に、g p 1 4 0 d V 2 . T V 1 抗原は、B亜型S F 1 6 2 E n v D V 2 株およびC亜型T V 2 に株対する一貫した中和反応を誘導している。従って、T V 1 ベースのE n v D N A およびタンパク質ベースの抗原は、免疫原性であり、そしてC亜型H I V - 1 E n v 抗原およびB亜型H I V - 1 E n v 抗原の両方に反応性の高力価抗体反応を誘導する。2回のみD N A 免疫後、いくつかの群で中和感受性B亜型R5 H I V - 1 S F 1 6 2 D V 2 に対する中和抗体反応を観察した。E n v タンパク質での単回の追加免疫に次いで、T V 1 E n v のV2欠失形態を受けた群のウサギの大多数が、密接に関連するC亜型T V 2 初代株に対する中和活性を示した。

20

## 【0372】

(実施例12)

(Rhesus Macaquesにおける免疫学的応答)

表Iに示すように構成された免疫化研究において、細胞性免疫反応および体液性免疫反応を、3群のrhesus macaques(各群は、4匹の動物で構成された)で評価した。免疫化組成物についての投与経路は、いずれの場合においてもエレクトロポレーションであった。抗体価を、2回目の免疫の2週間後について表Iに示す。

30

## 【0373】

【表 I】

表 I

群	免疫化組成物の 処方 *	動物 #	力価
1	pCMVgag (3.5 mg) + pCMVenv (2.0 mg)	A	3,325
		B	4,000
		C (以前に HCVコアISCOMS、 rVVCコアE1 で免疫された)	1,838
		D (以前に HCVコアISCOMS、 rVVCコアE1 で免疫された)	1,850
2	pCMVgag (3.5 mg) + pCMVpol (4.2 mg)	A (以前に HCVコアISCOMS、 rVVCコアE1、 p55gag <sub>LAI</sub> (VLP) で免疫された)	525
		B	5,313
		C	6,450
		D	5,713
3	pCMVgag-pol (5.0 mg)	A (以前に HCVコアISCOMS、 rVVCコアE1、 pCMVgagSF2 で免疫された)	0
		B (以前に rVVC/E1、 pCMV Epo-Epi、 HIV/HCV-VLP、 pCMVgagSF2、 pUCgp120 SF2 で免疫された)	1,063
		C	513

10

20

30

40

【表 I A】

群	免疫化組成物の 処方 *	動物 #	力価
		D (以前に rVVC/E1、 HIV/HCV-VLP で免疫された)	713

\* pCMVgag = pCMVKm2.GagMod C型 ポツワナ  
 pCMVenv = pCMVLink.gp140env.dV2.TV1 ( C型 )  
 pCMVpol = pCMVKm2.p2Pol.mut.Ina C型 ポツワナ  
 pCMVgag-pol = pCMVKm2.gagCpol.mut.Ina C型 ポツワナ

## 【0375】

1回目の免疫の前0週において、免疫前血清を得た。0週において、1回目の免疫を実施した。4週目において2回目の免疫を実施した。1回目の採血を、2回目の免疫の2週後(すなわち、6週目)に実施した。3回目の免疫を8週目に、そして4回目の免疫を、16週目に実施する。動物2A、動物3A、動物3Bおよび動物3Dは、以前(おおよそ4年以上)に、gagプラスミドDNAまたはgagVLP(亜型B)でワクチン接種されている。

## 【0376】

バルクCTL、<sup>51</sup>Cr-放出アッセイ、およびフローセル細胞計測方法を使用して、表Jおよび表K中のデータを得た。gag特異的T細胞およびpol特異的T細胞を検出するために使用した試薬は、以下であった：(i)「gagCpol」抗原(n=377)に及ぶ合成重複ペプチドであって、代表的には、このペプチドは、11マーまでの重複を有する15マーのプールであり、このプールは、以下：プール1、n=1~82、プール2、n=83~164、プール3、n=165~271、プール4、n=272~377であり、従ってプール1およびプール2は、「gag」特異的であり、そしてプール3およびプール4は、「pol」特異的である、合成重複ペプチドならびに(ii)組換えワクシニアウイルス(rVV)(例えば、rVVgag965、rVVp2Pol975(p2p7gag975を含む)、およびVV<sub>wr</sub>親ウイルス)。

## 【0377】

2回目の免疫の後に、血液中のGag特異的IFN + CD8 + T細胞、Gag特異的IFN + CD4 + T細胞、Pol特異的IFN + CD8 + T細胞、およびPol特異的IFN + CD4 + T細胞を、上の表Iに記載の各動物について決定した。結果を、表Jおよび表Kに示した。表Kに示すpol特異的活性のうちいくつかは、p2p7gagに対して惹起された可能性がある。

## 【0378】

10

20

30

40

【表 J】

表 J  
Gag アッセイ結果

群/動物	免疫化組成物	Gag 特異的 CD4+ 反応				Gag 特異的 CD8+ 反応		
		LPA(SI)			フロー	CTL		フロー
		p55	プール1	プール2	IFN $\gamma$ +	プール1	プール2	IFN $\gamma$ +
1A	pCMVgag pCMVenv	3.3	5.9	3.8	496	マイナス	マイナス	225
1B	pCMVgag pCMVenv	11.8	4.4	1.5	786	マイナス	マイナス	160
1C	pCMVgag pCMVenv	5.7	1.1	2.4	361	プラス	プラス	715
1D	pCMVgag pCMVenv	6.5	3.1	1.6	500	プラス	?	596
2A	pCMVgag pCMVpol	4.8	4.8	1.6	405	プラス	マイナス	1136
2B	pCMVgag pCMVpol	12.5	6.8	3.3	1288	プラス	マイナス	2644
2C	pCMVgag pCMVpol	6.0	3.8	2.1	776	マイナス	マイナス	0
2D	pCMVgag pCMVpol	18.9	13.5	5.4	1351	マイナス	マイナス	145
3A	pCMV gagpol	12.2	7.0	1.5	560	プラス	プラス	3595
3B	pCMV gagpol	2.7	5.6	1.3	508	プラス	?	3256
3C	pCMV gagpol	11.6	5.0	1.2	289	マイナス	?	617
3D	pCMV gagpol	1.5	1.2	1.4	120	マイナス	マイナス	277

? = rVVp2Polにおいて陽性であり得る。

【 0 3 7 9 】

【表 K】

表 K  
Pol アッセイ結果

群 / 動物	免疫化組成物	Pol 特異的 CD4+ 応答			Pol 特異的 CD8+ 応答		
		LPA(SI)		フロー	CTL		フロー
		プール3	プール4	IFN $\gamma$ +	プール3	プール4	IFN $\gamma$ +
1A	pCMVgag pCMVenv	1	1.2	0	マイナス	マイナス	0
1B	pCMVgag pCMVenv	1	1	0	マイナス	マイナス	0
1C	pCMVgag pCMVenv	1	1.1	0	マイナス	マイナス	0
1D	pCMVgag pCMVenv	1.2	1.3	0	マイナス	マイナス	262
2A	pCMVgag pCMVpol	1.1	0.9	92	マイナス	マイナス	459
2B	pCMVgag pCMVpol	2.5	1.8	107	マイナス	マイナス	838
2C	pCMVgag pCMVpol	1.2	1.1	52	プラス	マイナス	580
2D	pCMVgag pCMVpol	2.5	2.7	113	プラス	プラス	5084
3A	pCMV gagpol	2.7	2.4	498	マイナス	マイナス	3631
3B	pCMV gagpol	1.1	1	299	マイナス	マイナス	1346
3C	pCMV gagpol	2.1	1.4	369	マイナス	マイナス	399
3D	pCMV gagpol	1.3	1.8	75	マイナス	マイナス	510

10

20

30

## 【0380】

これらの結果は、本発明の構築物が、選択された HIV ポリペプチド抗原に対する特異的細胞応答および体液性応答を生成し得ることを支持する。

40

## 【0381】

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

[ 1 A ]

8\_5\_ZA

1 TGGAAAGGGT AATTTACTCC AAGAAAGCC AAGAAATCTT TGATTTGGG GTCTATCACA  
61 CACAAGGGTT CTTCCTGTAT TGGCAAACT ACACACCGGG GCCAGGGCTG AGATATTCRC  
121 TGACCTTTGG ATGAGGCTAC ATGCTATGTC CAGTGTACCC AGGGAGGGTG GAAGAGGCCA  
181 AGGAGAGGAA AGACAACTGT TTGCTACACC CTATAGGCCA ACATGGAGCA GAGGATAGAG  
241 ATAGAGAAAT ATTAAGGTTG ATGTTTGGCA GCCTCTTAGC ACSCAGAGAC TGGCCCGG  
301 ACTPATACCT GGATGATATC AAGACTGTCT GACACAGAAG GSACTTTCGG CTGSGGACTT  
361 TGACTCGGGG CGTCCGCSGA ATGCTGCTCT GGCCCGGACT TGCGAGTGTG CACCCCTCAG  
421 ATGCTGTGTA TAAGCAGCTG CTTTGCGCTT GACTGGGGTG TCTCTGGGTA GACCAGATCT  
481 GAGCCTGGGA GCCCTCTGGC TATCTAGGGA ACCCACTGCT TAAGCCTCAA TAAAGCTTGC  
541 CTTGAGTGTCT TTAGTGTGTT TGTCGCCATC TGTTGTGTGA CTCTGGTAAC TAGAGATGCC  
601 TCAGAACCCTT TGTGTAGTGG TGGAARATCT CTAGCAGTGG GCSCCGAACA GGGACAGAA  
661 AGTGAAGATG AGACCAGAGG AGATCTCTCG ACCGAGGACT CGCTTGTCTG AAGTGCACAC  
721 GGCAAGAGGC GAGAGGGGGG GCTGGTGAGT AGCCCAATTT TACTTGACTA GCGGAGGCTA  
781 GAAGGAGAAG GATVGTGGCG AGAGCCTCAA TATTAAAGGG CGGAARATTA GATAAATGCG  
841 AAAGAAATAG GTTAAGGCCA GGGGAAAGA AACAATATAT GTTAAACATC CTAGTAGTGG  
901 CAAGCAAGGA GCTGGAAAAA TTTGCACTTA ACCCTGGCTT GTTAGAACA TCAGAAGGCT  
961 GTAACCAAAAT AAATAAACGC CTACACACCG CTCTCAGAC AGGAACAGAG GAACITAGAT  
1021 CATTATTCOA CACAGTAGCA ACCTCTATT GTTGACATAA AGGGATAGAG TAGGACAGCA  
1081 CCAGAGGAGC CTTAGCAGAG ATAGAGAGAG AAACAACAA ATGTGACAGA AAAGCACAAC  
1141 AGGCAAAAGC AGCTGACAAA AAGTGCAGTC AAATATCTCC TATATGATAG AAGTCCCAG  
1201 GGCAAAAGGT ACACAGACTT ATNTCACTTA GAACATTGAA TGCATGGATA AAGTAAATAG  
1261 AGGAAAGGCC TTTCACTCC AGGAATAAC CACTGTTTAC AGCATATACA GAAGAGGCCA  
1321 CCCCAAGA TAATAACA ATGTAAATA CAGTGGGGGG ACMTAANCA GCCATGCAA  
1381 TGTTAAAGA TACCCTACCT GRSAGGCTCG CAGAATGSGA TAAGACACAT CAGGTACATG  
1441 CAGGCGCTGT TCACCCGCGC CAGATAGAG AACCAAGGGG AAGTAGCTA SCAGCAACTA  
1501 TCTGTACCTC TCAGAGGACA ATAGCATGGA TGCAAGTAA TOCACTATT CCAGTAGAAG  
1561 ACATCTATTA AAGATAGTA ATTCGCGGTT TAAATAAAT AGTAAAGATG TATAGCCCTG  
1621 TTAGCTATTT GGACATAAA CARGGGCCAA AAGAACCCTT TAGAGACTAT GTAGACCGGT  
1681 TCTTTAAAC CTTAAGAGAG GACCAAGCTA CACAAGATGT AAAGATTTGG ATACAGAGCA  
1741 CTTGTTGGT CCARATYCG AACCCAGAT GTAGAGACTT TTTAGAGCA TTAGAACAGG  
1801 GGGCCTCAT AAGAGAAATG ATACAGATGT CTRAGGGACT GGGAGACTT AGCCATAAAG  
1861 CAAGATGTG GCTGAGGCA ATAGCCAGAG CAACAGTAA CACTACTAGT CAGAGAGCA  
1921 ATTTTAAAG CTCTACAGA ATATTAATG TTTTCAACTG TGGCAAACTG GGGCACAATG  
1981 CCAGAAATG CAGGCGCCT AGAANAAGG CCTGTGTGAA ATGTGTACAG GAAGGACACC  
2041 AAATGAAAG CTTGATAGAG AGGCAGGCTA ATTTTTTGG ARAAATTTGG CTTTCCACA  
2101 AGGGAGGCC AGGGAATTTT CTCCAGACA GACCAAGGCC AACCCCCA CCACAGRAC  
2161 CACAGCGCC ACCAGCAGAG AGCTTCAGGT TCGAGGAGAC AACCCCCGTC CCGAGGAGG  
2221 AGAAGAGAG GGAAGCTTTA ACTTCCCTCA ATCTCTCTT TGGCACGAC CCCTTGTCTC  
2281 AAATAAGAG TCTTCATCC TAALAGAGGTC TCTCTGATC ACACGAGAG ATGATAGAG  
2341 ATTAGAGAA ATAGMTTTC CAGGGAATG GAACCAAAA ATGATAGGGG GAATGGAGG  
2401 TTTATCAA GTAGACTAT ATGATCAAT ACTTATGAA ATTTGGGA ARAAGTACT  
2461 AGGTACAGTA TAGTAGGCGC TCACCCAGT CAACATAAT GGAAGAATG TGTTATCTCA  
2521 GCTTGGATG ACACATAAT TCCAAATAG TCTTATGAA ACNTGACCG TAAATPAAAG  
2581 ACCAGAATG GATGGCCCAA AGTCAACCA ATGGCCATTG ACAGAGAAA AAATAAAAG  
2641 ATTAGACGA ATTTGAGAG AAATGGAAA GGAAGGAAA ATTCAAAAA TTGGGCTGA  
2701 TAATCCAT ATACTCCAG TATTTCCAT AAAAAGAAA GACAGTATA CTGGAGAAA  
2761 ATTAGTATG TTAGGAGAG TCAATAAAG AACTCAAGAC TTTTGGGAG TTCAATTTGG  
2821 AATACACAC CCACAGGAT TAAAAAGAA AAATCAGTG ACAGTGTGGG  
2881 TGCAATATTT TCAGTCTCT TAGATAGAG CTTAGGAAA TATCTGCAT TCACCATACC

FIGURE 1A

[ 1 B ]

2941 TAGTATAAC AATGAAACAC CAGGGATTAG ATATCAATAT AATGCTGCTG CACAGGGATG  
3001 GAAGGAGTCA CCAGCAATAT TCCAGAGTAG CATTGACAAA ATCTTGGAGC CCTTCCAGGC  
3061 AAAAATAFCA GACATAGTGA TCTATCBATA TAGTGATGAG TTGATCTCTAG GATCAGACT  
3121 AAGAAATAGG CAACATAGAG CAATAATAGA AGATTTAAGG GAACCTTTAT TGAATTTGGG  
3181 ATTTACAACA CCAGACAAGA AACATCAAA AGAACCCCCA TTTCTTTGGA TGGGTTATGA  
3241 ACTCCACTCT GACAAATGGA CACTACAACC TATACTGCTG CCAGAAATGA ATGCTTGGC  
3301 TGTCATATAT ATACAGAAAT TAGTGGGAAA ATTAATCTGG GAAAGACTAA CAGCAATGAT  
3361 GATTAAAGTA AGCCACTCT GTAACTCTCT GTAACTCTCT GTAACTCTCT GAAAGACTAA  
3421 ACCACTACTT GAAGAGGAC AATTAGAAAT GGCAAGAAC AGGGAATTT TAAGAGAAC  
3481 AGTACATGGA GTATATTATG ATCCATCAA AGACTTGATA GCTGAATATC AGAAACAGG  
3541 GCATGAACAA TGACATATC AAATTATCA AGAACCTATT AAAATTTGTA AACAGGGAA  
3601 GTATGCAAA ATGAGGACTA CCCCACATA TGATTAATA CAGGGGGGGC AAGACTAAG  
3661 AAAATAGGCT ATGAAGACA TAGTAATATG GGAAGAGCT CTAATTTTA GACTCCCAT  
3721 CAAABAGGA ACATGGGAGA CATGTGGAC AGACTATGG CABGCCACT CAAGCCTTGA  
3781 GTGGAGTGT GTTATACCC CCCCCTAGT AAAATTTAGG TAACCACTAG AAAAAGATCC  
3841 CATAAGCAGA GTAGAARCT TCTATGAGA TGGGCAACT AATAGGGGAG CTAATAAGT  
3901 AAAGACAGG PATGTTACT ACAGAGGAG CAGAAAATTT GTTACTCTAA CTAACACAG  
3961 AAATCAGAG ACTSAGTTC AAGCAATCA CGACTCTGT GAGGACTTGC CAGCAAGCT  
4021 AACCATAGTA ACAGACTCAG ATGATGCTTT AAGGAATCATT CAGCAACAC CAGATAGAG  
4081 TGACTCAGAG ATATTTAAC AAATATAGA TGGGCAACT AATAGGGGAG CTAATAAGT  
4141 GTCAATGGTA CCAGCACATA AAGAAATGG GGGAAATGAA CAAGTAGATA AATAGTAGAG  
4201 TAGGGGAAT AGGAAATGTT THTTTTGA TACTAGTCTG TACTAGTCTG TAATGAGTTT  
4261 AAGGTACCAC AGCAATGTGA GAGCAATGGC TACTAGTCTG TAATGAGTTT AATCTCCAG  
4321 AAAGAAATA GTAGTAGCT GTGATAATG TCGATAAAT TCGATAAAT TCGATAAAT  
4381 AAGTACCCTGT AGTCCAGGGA TATGGCAAT TCGTAGCTA CHUGAGCA AGGTTATCC  
4441 CCGTAGACA GTCCATGAG TCTATGAGA TGGGCAACT AATAGGGGAG CTAATAAGT  
4501 AAGACAGAA ACAGCATATT TTTATTAAG ATTAGCAGA AGATGGCCAG TCMAAATAT  
4561 ACATACAG ACATGGAGTA ATTTTACC AGCAAGTATT GAATTCCTA CACTCCCAA  
4621 AAGTATCCAA CAGGAATTTG TACCAAGTTG AAATTCCTA CACTCCCAA  
4681 CATGAATAA GAATTAAGA AAATATGAG ACTATTTA CACTTTTAA CACTTTTAA  
4741 GACACAGTA CAATGGCAG TATCTATCA CACTTTTAA CACTTTTAA  
4801 GTACAGTGA GGGAAAGAA TAATAGACT AAAGCACTA AAAGCACTA  
4861 ACAAACAATA ATTAAGAA TTCAAATTT TCGGATTTAT TCGGATTTAT  
4921 TATTTGAAA GAACAGCCGC ACTACTCTG GAAAGTAAA GGGTATGAA  
4981 TAAGGTTAG ATAAAGTTG TACCAAGGAG CAAAGCAA AAATTAGTAA  
5041 ACAGATTGCA GTGTCTGAT GTGTGCGAG TGGAGAGAT TGGAGAGAT  
5101 TTTATGAAA GCACATAG TATATATCA TGGAGCAGT GAGATGGCT TACAGACTA  
5161 ATTTTGAAG CAGACATCA AAATAGATG CAGAGTACA TATCCATTA GGGAGTCTA  
5221 GTTTATAT AAAACATAT TGGGATTTG ACAGAGTGA AAGAAATTTG CAITTTGCTC  
5281 ATGAGTCT CATAGATGT AGACTAGAG ATATGACAC AAGATAGAC CACTGCTGG  
5341 CAGCACAGT AATTCATCT CAITTTTAC CAATTTTAC CAATTTTAC AAGAGACTA  
5401 CAATTTAG ACACATGTT TTTCTAGT TGTACTACA AGAGGACAT AAGAGACTA  
5461 GATCTTCCA ATACTTTGCA CTGACAGCT CTGAGAAACA CCCCCAGAG ACCAGGGCC  
5521 TGCTAGTGT TGAATAAT GTAGAGACT GGTAGAAC CCCCCAGAG ACCAGGGCC  
5581 GCAGAGGAA CCATACATA ATGGAGACT AGAATTTCA AGAATTTCA AGAATTTCA  
5641 CCGAGGAC TTTCTAGG CMTGGCTA TACTTAGA CAATATATT ATGAAACTA  
5701 TGCGGACT TGGCCGGAG TTTGAGCT ATTAAGATA CTGCAACAC TACTTTTCA  
5761 TCATTTTGA ATGAGACTG AACATAGAG ATTGGGACT TCCAGAGCA GAGAGCAG  
5821 AATTTGAGG AGTAACTCT AACTTAGC CCTGAGAA CTGAGGAGC CAACTTAAG  
5881 CAGCTGTCT TARTTCTTT TGCAACACT GTAGACTA TGTCTAGT TCTCTTAG

FIGURE 1B

[ 1 C ]

5941 CAAAGGGTT AGGCTTTCC TATGSCAGA AGAAGCGG ACAGGACGA AGCGCTCTC  
6001 CAGTGGTGA AGTACTCAA AATCTCTAT CAAAGCAGTA AGTACATATA GTAGATGTA  
6061 TGTAAGTAT AGTTTTATT AAAGAGTGA ATATPAGATT AGTATGAG CAATTTATAG  
6121 TAGCACTAAT CATAGCAATA ACTGTGGGA CCAATAGCTA TATGAATATT AGAAATTTG  
6181 TAGACAARA GAAANTAGAC TGTTTAAAT TAAGAATTAG GGAAGAGTAT GGTGATTTG  
6241 GCAATGGAG TGATGGGAC ACAGAGAAAT TGTCACCAAT GGTGCACTG CTACTATGG  
6301 GCGTCTCGA TGCTATAGT TTTAAGCAG GAGGACTTGT GGTGCACTG TACTATGG  
6361 GTACTGTGT GGAGAGAAG CCTAACACT CTATTCTGT CTTACAGTA CCCCACCA  
6421 GAGCAGAG TGCTATAGT CTGGCTACA CATGCTTGT TCCCCAGA TAACATTTGA  
6481 CAGAARATG TTTTGGAAA TGTAACAGAA ATTTTAAATA TGTAAGAAA ATGTTAGGA  
6541 CATGATGAT ATGAGGATAT AATCAGTTA TGGGATCAA GCTTAAAGG ATGTTAGG  
6601 TTGACCOCAC TCTGTSTAG TTAACAATG ACAGATACAA ATGTTACAGG TATAGAAT  
6661 GTTAGAGGTA ATACAAATG TACCATAAT GCAAAATGCTA CATTAAGATA ARAACATA  
6721 AAATATGCT TTTCAATGA AACCAAGAA TTAAGAGATA ARAACATA ARAACATA  
6781 CTTCTTTATA AACTTAGAT AGTACCATT AATGAAATA GTAACACTT TACATATGA  
6841 TATATAAAT GCATACTCT AACATAACA CAAGCCTGT CAAGGTCTC TTTGACCCG  
6901 ATCTATATC ATTAGCTGC TCCAGTAT TATGCGATC TAAAGTTAA TAATAGACA  
6961 TTTACTGGG CAGGACCAIT TTAATAGTC AGCACAGTAC AATGTACATA TGAATTTAG  
7021 CCAGTGGAT CACTCACT ACTTTAAAT GGTAGCTAG CAGAAGAAG GATAATATT  
7081 AGATCTGAA ATTTGACAGA GAATACCAA ACAATAATG TACATCTTA TGAATCTGT  
7141 GAGATTAAIT GTACAGGCC CACATAAT ACAGGAAAA GTATAGGAT AGGAAACAG  
7201 CAGACTTCT ATGCAACAA TCGCTTATA GGAACATAA GACACGACA TTTTAACATT  
7261 AGTACAGATA GATGAATAA ACTTTTACAA CGGTATAGA AAAATTTAG AGACATTT  
7321 CCTAATAAA CAATAAAAT TGAACCAAT GCAGGAGGG ATCTAGAA TACAATGAT  
7381 AGCTTTAAT GTAGAGGGA ATTTTCTAT TGCATATAT CAACCTTAT TAATAGTAA  
7441 TACTACCTA AGAATGGAT ATACAAATC ATGCTTTAT AATGCTTAT CAATCACTC  
7501 CAATGCAAAA TAAACAAAT TGTAGCATG TCGCAGGGG TAGGACAGC AATGTATGC  
7561 CCTCCCTTG CAGAAACAT AACATGAGA TCAAACATCA CAGGACTAT ATGACAGCT  
7621 GATGGGGAT TTAACAACAC AAACAACGAC ACAGAGGGA CRTTCAGC TGGAGGAGA  
7681 GATATAGGG ATAAGTGG AGTGAATTA TATAAATA AATGTTAG AATGAAATA  
7741 TTTGGAATAG CACCACATA GGCAAAAAGA AGAGTGTGC GAGCCTAT GGGCCAGG  
7801 GAAATAGGAG CTGTCTCT TGGTTCTT GGGAGCAG CATTGTCTG ATTAGTGA  
7861 TCAATAAOC TGAAGTACA GGCCAGACAA CTGTTCTG GTTAGTGA ACAGCAAC  
7921 AATTTGCTA AGGCTATAGA GGGCAGAC CAATGTCTG AACTCAGCT CTGGCCAT  
7981 AAGCAGCTC AGGCGAGAT CCTGGCTATA GAAGATACC TAAAGATCA ACAGCTCTA  
8041 GGAATTTGG GCTCTCTG AGAGCTACT TGCACACTG CTGTCCTT GAATCTTAT  
8101 TGGATTAATA AATCTGAGC AGATTTTGG GATAACATG CTTGATGCA GTGGATAGA  
8161 GAATTAATA ATTACAGA AACAATATC AGTGTCTG AAGACTGCA AAACCAGAG  
8221 CAAAGATAG AAAGAAAT ATTAAGATG GACAAGTGA ARAATCTGT GAATGTTG  
8281 CACTATCAA ACTGCTGT GTATATAAA ATATCATA TATATAGG AGGCTTGA  
8341 GGTTTAGAA TATTTTTC TGTCTCTC ATAGTGAATA GATTAGGCA GGGATCTA  
8401 CCTTTGCTT TTGACGCTT TACCCAGC CCGAGGGAC TCGACAGGCT CCGAGGATC  
8461 GAAGAGAG GTGGAGTCT GCGAGGCT TGCCTTCA CTAACCCCG CTTGAGAG  
8521 TGCTTTGCT GGCAGACT CCGAGGCT GCGAGTGA CTTCTGGAC CAGGAGTA  
8581 TCTATATA TTGACAGT TAAGTCTG GAGTCTGT TGCATATT GGTCTAGAG  
8641 CAGAGGGGT GGGATCTT TAAGTCTG TCCATGAC CCATGACA TAGCACTAG TAAAGAAC  
8701 CTAARAAGA GTCTATTG ACAAAGAT TATAGACT TCTCAACT ACCTAGGAG  
8761 GATAGATTA TAGAATGGT ACAAGAT TATAGACT TCAAAGT GCACATG CAAACGAG  
8821 ATAGACAGG CTTTGAAG AGCTTTGA TAAAATGGA GCAAGTGT CAAACGAG  
8881 CATAGTGA TGGCCTGAG TAAGAGAA AATGAGAA ACTGAGCA CAGCAGAG  
8941 AATAGAGCA GCTCTCAG ACTATAGAT ACATGAGCA CTAACAACA CAACACAC

FIGURE 1C

[ 1 D ]

9001 TGCTACTAAT GAAGCTTGT CTTGGCTGCA AGCAACAG GAGGACGGG ATGATGGCTT  
9061 TCCAGTACGA CCTCAGTAC CTTTACGAC AATGACTTAT TAGAGTCAG TAGATCTAG  
9121 CTCTTTTTA AAAGAAAAG GGGAGCTGA TAGGCTTAT TACTCTAGA AAAGGCAAGA  
9181 ATCCCTTGT TTGTGGCTT ATAACACACA AGGCTTCTTC CCTATGAC AACTACAC  
9241 ATCGGGGCA GGGTCCGAT TCCACAGT ACTTGGATG CTTTGGATG AACTGAGAGC  
9301 TACCCAGAG GAGGTTAAG AGGCAATGA AGAGAGAG CAGAGTATTA  
9361 GAGGCACAT GGAGCAGAG ATGAAGATG AAGATTTA TACCTCGAG  
9421 TCTAGCAC AGACAGATG CCGCGACT TACTGAGGAG CAGGACTG  
9481 CAGAGGGAC TTTCCGCTG GACTTTCA CTTGCGGTT CCGGAGGCT TGGTCTAC  
9541 GCGACTTGT AGTGTACCC CTGACTAG CAGATATG CAGATATG CTGCTGCT  
9601 GGTCTCTCT CCGTAGCA GCTTGAGC TGGCACTG TTGCTTACT CTGCTTACT  
9661 CTGCTAGG CTAAGTGG ATTCAGG CTTGAGCA GTGGCTTCT CACTGCTG  
9721 TGTACTGTG TAACTAGAG ATCCCTCAGA CCCTTGTGG TAGTCTGAA AATCTTACT  
9781 A

FIGURE 1D

【図 2 - 1】

↓: βシート欠損に対する領域

\*: リファレンス C TV1 および TV2 に対する N 連続グリッド化部位、可能性のある変異 (N → Q) または欠損が実施される。

SF162	(1)	1	50
TV1.8.2	(1)	1	50
TV1.8.5	(1)	1	50
TV2.12-5/1	(1)	1	50
コセンサス	(1)	1	50
...			
SF162	(47)	51	100
TV1.8.2	(51)	51	100
TV1.8.5	(51)	51	100
TV2.12-5/1	(51)	51	100
コセンサス	(51)	51	100
...			
SF162	(97)	101	150
TV1.8.2	(101)	101	150
TV1.8.5	(101)	101	150
TV2.12-5/1	(101)	101	150
コセンサス	(101)	101	150
...			
SF162	(139)	151	200
TV1.8.2	(151)	151	200
TV1.8.5	(151)	151	200
TV2.12-5/1	(151)	151	200
コセンサス	(151)	151	200
...			
SF162	(185)	201	250
TV1.8.2	(185)	201	250
TV1.8.5	(185)	201	250
TV2.12-5/1	(185)	201	250
コセンサス	(185)	201	250
...			
SF162	(235)	251	300
TV1.8.2	(249)	251	300
TV1.8.5	(249)	251	300
TV2.12-5/1	(235)	251	300
コセンサス	(251)	251	300
...			
SF162	(285)	301	350
TV1.8.2	(299)	301	350
TV1.8.5	(299)	301	350
TV2.12-5/1	(285)	301	350
コセンサス	(301)	301	350

FIGURE 2A

【図 2 - 2】

SF162	(335)	351	400
TV1.8.2	(349)	351	400
TV1.8.5	(349)	351	400
TV2.12-5/1	(335)	351	400
コセンサス	(351)	351	400
...			
SF162	(384)	401	450
TV1.8.2	(398)	401	450
TV1.8.5	(398)	401	450
TV2.12-5/1	(384)	401	450
コセンサス	(401)	401	450
...			
SF162	(427)	451	500
TV1.8.2	(445)	451	500
TV1.8.5	(445)	451	500
TV2.12-5/1	(427)	451	500
コセンサス	(451)	451	500
...			
SF162	(475)	501	550
TV1.8.2	(493)	501	550
TV1.8.5	(493)	501	550
TV2.12-5/1	(475)	501	550
コセンサス	(501)	501	550
...			
SF162	(525)	551	600
TV1.8.2	(543)	551	600
TV1.8.5	(543)	551	600
TV2.12-5/1	(525)	551	600
コセンサス	(551)	551	600
...			
SF162	(575)	601	650
TV1.8.2	(593)	601	650
TV1.8.5	(593)	601	650
TV2.12-5/1	(575)	601	650
コセンサス	(601)	601	650
...			
SF162	(625)	651	700
TV1.8.2	(643)	651	700
TV1.8.5	(643)	651	700
TV2.12-5/1	(625)	651	700
コセンサス	(651)	651	700
...			
SF162	(675)	701	750
TV1.8.2	(693)	701	750
TV1.8.5	(693)	701	750
TV2.12-5/1	(675)	701	750
コセンサス	(701)	701	750

FIGURE 2B

【図 2 - 3】

SF162	(725)	751	800
TV1.8.2	(743)	751	800
TV1.8.5	(743)	751	800
TV2.12-5/1	(725)	751	800
コセンサス	(751)	751	800
...			
SF162	(774)	801	850
TV1.8.2	(793)	801	850
TV1.8.5	(793)	801	850
TV2.12-5/1	(774)	801	850
コセンサス	(801)	801	850
...			
SF162	(818)	851	876
TV1.8.2	(843)	851	876
TV1.8.5	(843)	851	876
TV2.12-5/1	(818)	851	876
コセンサス	(851)	851	876

【図 3】

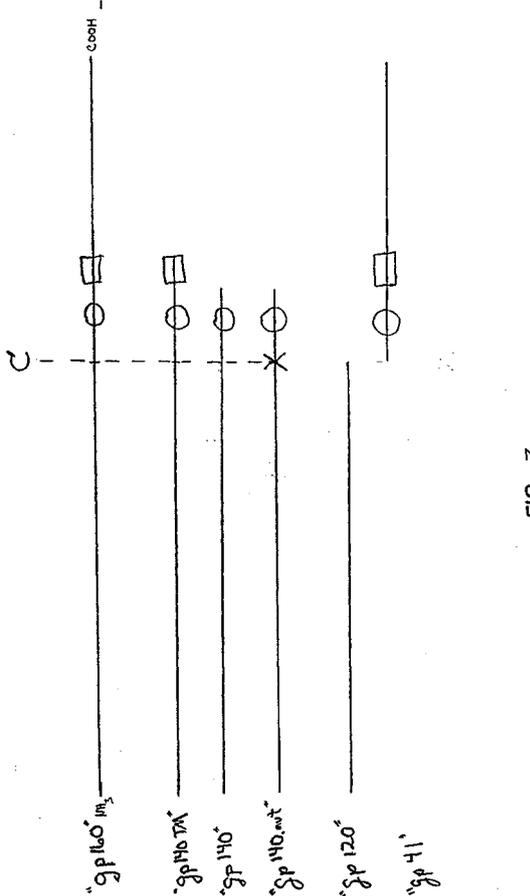


FIG. 3



【 図 7 - 2 】

Figure 7 (シート 2/2)

TCAGAACCTGAAGACCGGCAAGTACGCCAAAGATGGCCACCGGCCAACCAAGCAGCTG
AAGCAGCTGACCGAGGCGCTGCAGAAAGTTCGCCATGGAGAGCATCGTGATCTGGGGCAA
GACCCCAGATTCCGCGTGCACATCCAGAAAGGAGACCTGGGAGACCTGTTGGAGCCACTA
CTGGCAGGCCACCTGATCCCGGATGGGAGTTCGTGAACACCCCCTCGTGAAGCT
GTGGTACCAGCTGGAGAGGAGGCCATCATCGGCGCCGAGACCTTCTACGTGGACGGGCG
CGCCAACCCGAGACCAAGTTCGGCAAGGCCGCTACGTGACCGACCGGGCCCGGAG
AGATCGTGAGCCTGACCGAGACCACCAACAGAAAGACCGGACTGACGAGCCATCCAGCTG
GCCCTGCAGGACACGCGGACCGGATGAACATCGTGCAGCCAGACGAGTACGCCCTGG
CATCATCCAGGCCACGCCGACAAAGAGCGAGAGGACTGTTGAACAGATCATCGAGC
AGCTGATCAAGAAAGGAGAGGTTACTGAGCTGGTGCACCGCCCAAGGGCATTCGGC
GGCAACGAGCAGATCGACAAGCTGTGAGCAAGGGCATCCGCAAGGCTCGTTCCTGGAC
GGCCCTAGGATCGATTAAGAAGCTTCCCGGGCTAGCACCGTTCTAGA

【 図 8 - 1 】

Figure 8 (シート 1/2)

GagCompPolmutIna\_C

GCCACCATGGGGGGGGGGCCGAGCATCCTGCGGGGGGCAAGTGCAGCCCTGGAGGCCAT
ATCCGCGCTGCGCCCCGGGGCAAGAAGTGTACTGATGAAGAACCTGCTTGGGGCAGC
GGGAGCTGGAGAAGTTTCGCCCTGAACCCCGGGCTGCTGGAAGCAGGAGGGGTGCCAAG
CAGATCATCCCGCCAGCTCACCCTGCGCTGACAGCCCGGACCGAGCGAGGTGAAGAGCTGT
TTCAACACCTTGGCCACCCCTGACTCTGTGTCAACAGAAAGTCAAGTCCCGCCACCAAC
GAGGCCCTGGACAAGTTCAGGGGAGGACGAAGAATGTCAGCAAGAAATGTCAGCAGGC
GAGGGCCCGCACAAAGGGCAAGGTGAGCCAGAACTACCCCATCTGTGCAAGCCTGAGG
GCCAGATGTGCAACAGGCCATCAGCCCGCCACCTGAAAGCCCTGGGTGAAGGTGATCG
AGGAGAAGGCCCTTACGCCCGAGGTGTACCCCATGTTACCCGCTTGGAGGAGGCGGCCA
CCCCCAAGACCTGAACAGATGTGAAACCCCTGGGGCCCAACGGCCCGCATGCGA
TGTTGAAGGACACTCAACAGGAGAGCCCGCGAGTGGGACCGGTGTACCCTGTGAC
GGCGGCCATCGCCCCGGCAGATGGGCGAGCCCGCGAGCCAGCAATCGGCGGACCC
ACCAACCCCTGCAGAGGAGATGCTGCCTGGATGACCAAGCAACCCCACTCCCGTGGG
GACATCTACAAGGGTTGGATCATCTTGGGCGTGAACAAGATCGTGGGATGTACAGCCCG
GTGAGCATCTGGACATCAAGCAGGGGCCCAAGGAGCCCTTCCGCGACTACTGGACCGCC
TTCTTCAAAGCCCTGCGGGCCAGCAGAGCAACCAGAGAGGTAAGAAGATCGATGACCCAC
ACCTTGTGTGCAAGAACCCAGCCACTGCAAGACCATCTGCGCGCTCTCGGCCCC
GGCGCAGCCTGGAGGAGATGATACCGGCTGCCAGGGCGTGGGCGGCCCAAGCCAA
GGCCCGCTGCTGGCCAGGGGATGAGCCAGGCCAACCCAGCGGTGATGCAAGAA
GCAACTTCAAGGGCCCCCGCCCATCTCAAGTGTCTCAACTGGCCAAAGGGGCCACCA
TCGCCCCAACTGCCCCCCCCCAAGAAAGGCTGTGTGAAGTTCGGCAAGGAGGGG
CACCAAGATCAAGGATGACCGAGGCCCAAGCCAGCCAGCCAGGAGGATGTGGCCAGC
CAAAAGGGCCGGCCGCAACTCTCGCAGAGGCCCGGAGGCCACCGCCCCCGGCG
GAGAGCTTCGCTGAGGAGACCCCAGGCAAGAGCAGGAGGAGCAAGGACCGCGA
GACCCGACCCGCTGAAGAGGCTGTTGGCAACGACCCCTGAGCCAAAGATTCGCGGA
GGCCATGAGCCAGGCCACAGCCCAACATCTGTATGACAGCCAGCAACTCAAGGGCC
CAAGCCATCATCAAGTGTCAACTGGCCAAAGGAGGCCACATGCCCGCACTGGC
GGCCCCCGCAAAGGCGTGTGGAAAGTGGGCAAGGAGGGCCACCCAGATGAAGGACT
GACCCGAGCCCGAGGCACTCTTCCCGAGAGGACTTGGCTTCCCAAGGGAGGCCC
GGAGATTCGACAGGAGGAAAGACTGACAGCCAGCCAGCCAGGAGGATGTAGAG
GGGGCAACACCCCGCAGGAGGCGCGCCGAGGCCAGGGCACCTGAACTTCCCG
AGATCACCTGTGGCAGCCCGCTGTGTGAGCATCAAGTGGGGCCGACATCAAGGAGG
CCCTGTGGCCACCCGCGCCAGCAGCACCTGTGTGAGGAGATGAGCCTGCCCGCAAGT
GGAAAGCCAGATGATGCGGGCATGCGGGCTTCAAAAGTGCAGGATGACGACCA
TCCTGATGAGATCTGCGGCAAGAGGCCATCGGCAACGCTGTGATGCGCCCCACCCCG
TGAACATCATGCGCGCAACATGCTGACCCAGCTGGGTGCACCTGAACTTCCCAT
GCCCATTCAGACCTGCGCGTGAAGTGAAGCCCGGACTGGAGCCCAAGGTGTAAAGG
ATGTGGCCAGCAGCCGAGGAAAGACTGACAGCCCTGCAAGGATGTCAGGAGGATGTAG
AAGGAGGCCAAGATCACCAAGATGTGGCCCAAGAAACCCCTACAACAACCCGTGTTCCG
ATCAAGAAAGGAGCAGCAACAAGTGGCCAAAGCTGGTGTGACTTCGCGGACTGAAAC
GGCACCCAGGACTTCTGGGAGGTGCAGCTGGGCATCCCCACCCCGCCGCGTGAAGA
GAAGAAAGGCTGACCGTGTGGAGCTGGGGCAGGCTTCACTGAGGTCGCCCTGGACGA
GGACTTCCGCAAGTACACCCGCTTCAACTCAGCAGTCAACAAGAGACCCCGGAC
CCGCTACCAATCAAGTGTGCCCCAGGGCTGAAGGGCAGCCCAAGCATCTCCAGGA
CAGCATGACCAAGATCTGGAGCCCTTCCGCGCGCAACCCAGATCTGTGTATCTA
GGCCCCCTGTAGCTGGGACCGACTGAGATCTGGCCAGCAGCCCGCAAGATCGAGGA
GATCTGGCAAGACCTGTGTGGTGGGCAAGGAGCAACCGGCAAGGAGCAGTGGGAA
GGCCCCCTTCCGCAATCGAGCTGCACCCGCAAGAGGAGCTGCAGCCCATGAGCT
GCCCGAAGGAGGCTGGACCCGTAAGCAACATCCAGGACTGTGGCCAAAGCTGACT
GCCCAGCAGCATCTACCCGGCATCAAGTGTGGCCAGCTGTGAAAGTGTGCGGCGG
CAAAGGCCCTGACCGACATCGTGCCTGACCGAGGAGGCCAGCTGGAGCTGGCCGAGA
ACCGGAGATCTCCGCGAGCCGCTGACGGCGTGTACTACGACCCCAAGCAAGCCTGG
TGGCGAGATCCAGAGCAGGGGCAAGCAAGTGGACCTACCAAGTCTACCAAGAGCCCT
TCAAGAACCTGAAAGGCCGAAATGCCCAAGATGCGGCCAGCCGACCCCAACAGAGCTG

【 図 8 - 2 】

Figure 8 (シート 2/2)

AAGCAGCTGACCGAGGCGCTGCAGAAAGTTCGCCATGGAGAGCATCGTGATCTGGGGCAA
GACCCCAGATTCCGCGTGCACATCCAGAAAGGAGACCTGGGAGAGCTGTGGAGCAGCTA
CTGGCAGGCCACTGGATCCCGGATGGGAGTTCGTGAACACCCCCTCGTGAAGCT
GTGGTACCAGCTGGAGAGGAGGCCATCATCGGCGCCGAGACCTTCTACGTGGACGGGCG
GCCAACCCGAGACCAAGTTCGGCAAGGCCGCTACGTGACCGACCGGGCCCGGAG
AGATCGTGAGCCTGACCGAGACCACCAACAGAAAGACCGGACTGACGAGCCATCCAGCTG
GCCCTGCAGGACACGCGGACCGAGGTTGAAACATCGTGGACCGACAGCCATAGCCCTGG
CATCATCCAGGCCACGCCGACAAAGAGCGAGAGCGGACTGTTGAACAGATCATCGAGC
AGCTGATCAAGAAAGGAGAGGTTACTGAGCTGGTGCACCGCCCAAGGGCATTCGGC
GGCAACGAGCAGATCGACAAGCTGTGAGCAAGGGCATCCGCAAGGCTCGTTCCTGGAC
GGCATCGATGGCGGACCTGTGATCTACCAAGTACATGACAGCAGTGTACTGCTGGGACGGC
GGCCCTAGGATCGATTAAGAAGCTTCCCGGGCTAGCACCGTTCTAGA

【 図 9 - 1 】

Figure 9 (シート 1/2)

GagCompPolmutInaTatRevNef\_C

GCCACCATGGGGGGGGGGCCGAGCATCCTGCGGGGGGCAAGTGCAGCCCTGGAGGCCAT
ATCCGCGCTGCGCCCCGGGGCAAGAAGTGTACTGATGAAGAACCTGCTTGGGGCAGC
GGGAGCTGGAGAAGTTTCGCCCTGAACCCCGGGCTGCTGGAAGCAGGAGGGGTGCCAAG
CAGATCATCCCGCCAGCTCACCCTGCGCTGACAGCCCGGACCGAGCGAGGTGAAGAGCTGT
TTCAACACCTTGGCCACCCCTGACTCTGTGTCAACAGAAAGTCAAGTCCCGCCACCAAC
GAGGCCCTGGACAAGTTCAGGGGAGGACGAAGAATGTCAGCAAGAAATGTCAGCAGGC
GAGGGCCCGCACAAAGGGCAAGGTGAGCCAGAACTACCCCATCTGTGCAAGCCTGAGG
GCCAGATGTGCAACAGGCCATCAGCCCGCCACCTGAAAGCCCTGGGTGAAGGTGATCG
AGGAGAAGGCCCTTACGCCCGAGGTGTACCCCATGTTACCCGCTTGGAGGAGGCGGCCA
CCCCCAAGACCTGAACAGATGTGAAACCCCTGGGGCCCAACGGCCCGCATGCGA
TGTTGAAGGACACTCAACAGGAGAGCCCGCGAGTGGGACCGGTGTACCCTGTGAC
GGCGGCCATCGCCCCGGCAGATGGGCGAGCCCGCGAGCCAGCAATCGGCGGACCC
ACCAACCCCTGCAGAGGAGATGCTGCCTGGATGACCAAGCAACCCCACTCCCGTGGG
GACATCTACAAGGGTTGGATCATCTTGGGCGTGAACAAGATCGTGGGATGTACAGCCCG
GTGAGCATCTGGACATCAAGCAGGGGCCCAAGGAGCCCTTCCGCGACTACTGGACCGCC
TTCTTCAAAGCCCTGCGGGCCAGCAGAGCAACCAGAGAGGTAAGAAGATCGATGACCCAC
ACCTTGTGTGCAAGAACCCAGCCACTGCAAGACCATCTGCGCGCTCTCGGCCCCAAG
GGCCCATGAGCCAGGCCACAGCCCAACATCTGTATGACAGCCAGCAACTCAAGGGCC
CAAGCCATCATCAAGTGTCAACTGGCCAAAGGAGGCCACATGCCCGCACTGGC
GGCCCCCGCAAAGGCGTGTGGAAAGTGGGCAAGGAGGGCCACCCAGATGAAGGACT
GACCCGAGCCCGAGGCACTCTTCCCGAGAGGACTTGGCTTCCCAAGGGAGGCCC
GGAGATTCGACAGGAGGAAAGACTGACAGCCCTGCAAGGATGTCAGGAGGATGTAGAG
GGGGCAACACCCCGCAGGAGGCGCGCCGAGGCCAGGGCACCTGAACTTCCCG
AGATCACCTGTGGCAGCCCGCTGTGTGAGCATCAAGTGGGGCCGACATCAAGGAGG
CCCTGTGGCCACCCGCGCCAGCAGCACCTGTGTGAGGAGATGAGCCTGCCCGCAAGT
GGAAAGCCAGATGATGCGGGCATGCGGGCTTCAAAAGTGCAGGATGACGACCA
TCCTGATGAGATCTGCGGCAAGAGGCCATCGGCAACGCTGTGATGCGCCCCACCCCG
TGAACATCATGCGCGCAACATGCTGACCCAGCTGGGTGCACCTGAACTTCCCAT
GCCCATTCAGACCTGCGCGTGAAGTGAAGCCCGGACTGGAGCCCAAGGTGTAAAGG
ATGTGGCCAGCAGCCGAGGAAAGACTGACAGCCCTGCAAGGATGTCAGGAGGATGTAG
AAGGAGGCCAAGATCACCAAGATGTGGCCCAAGAAACCCCTACAACAACCCGTGTTCCG
ATCAAGAAAGGAGCAGCAACAAGTGGCCAAAGCTGGTGTGACTTCGCGGACTGAAAC
GGCACCCAGGACTTCTGGGAGGTGCAGCTGGGCATCCCCACCCCGCCGCGTGAAGA
GAAGAAAGGCTGACCGTGTGGAGCTGGGGCAGGCTTCACTGAGGTCGCCCTGGACGA
GGACTTCCGCAAGTACACCCGCTTCAACTCAGCAGTCAACAAGAGACCCCGGAC
CCGCTACCAATCAAGTGTGCCCCAGGGCTGAAGGGCAGCCCAAGCATCTCCAGGA
CAGCATGACCAAGATCTGGAGCCCTTCCGCGCGCAACCCAGATCTGTGTATCTA
GGCCCCCTGTAGCTGGGACCGACTGAGATCTGGCCAGCAGCCCGCAAGATCGAGGA
GATCTGGCAAGACCTGTGTGGTGGGCAAGGAGCAACCGGCAAGGAGCAGTGGGAA
GGCCCCCTTCCGCAATCGAGCTGCACCCGCAAGAGGAGCTGCAGCCCATGAGCT
GCCCGAAGGAGGCTGGACCCGTAAGCAACATCCAGGACTGTGGCCAAAGCTGACT
GCCCAGCAGCATCTACCCGGCATCAAGTGTGGCCAGCTGTGAAAGTGTGCGGCGG
CAAAGGCCCTGACCGACATCGTGCCTGACCGAGGAGGCCAGCTGGAGCTGGCCGAGA
ACCGGAGATCTCCGCGAGCCGCTGACGGCGTGTACTACGACCCCAAGCAAGCCTGG
TGGCGAGATCCAGAGCAGGGGCAAGCAAGTGGACCTACCAAGTCTACCAAGAGCCCT
TCAAGAACCTGAAAGGCCGAAATGCCCAAGATGCGGCCAGCCGACCCCAACAGAGCTG

【 図 9 - 2 】

Figure 9 (シート 2/2)

TACCTGAGCTGGTGGCCGCCCAAGGGGCACTGGCGGCAACGAGCAGATCGAAGCTGGTGGAGCAAG
GGCATTCGCAAGGTGCTGTTCCTGGAAGGCACTGATGGCGGCACTGGTGGTTCACAGTACATGAGAGC

【 図 1 0 】

Figure 10 (シート 1/1)

GagPolmut\_C

GCACCATGGGGCCCGGCCAGCATCTTGGCGGGGGGCACTGGAGCGCTTGGAGCGCTGGCCGCTG
GCCCGGGGGCAAGAGTGTACTATGATGAAGCACTTGGTGGCCAGCGTAGAGTGGAGTGTTC

【 図 1 1 】

Figure 11 (シート 1/1)

GagPolmutAtt\_C

GTGAGCGCCACATGGGGCCCGGCCAGCATCTTGGCGGGGGCAAGTGGACGCTGGAGCGCCATC
CGCTTGGCCCGGGCCAGGAAGTGTACTATGATGAAGCACTGGTGTGGCCAGCGCGAGCTGGAG

【 図 1 2 】

Figure 12 (シート 1/1)

GagPolmutIna\_C

GTGAGCGCCACATGGGGCCCGGCCAGCATCTTGGCGGGGGCAAGTGGAGCGCTTGGAGCGCCATC
CGCTTGGCCCGGGCCAGGAAGTGTACTATGATGAAGCACTTGGTGGCCAGCGTAGAGTGGAGTGTTC





【 図 2 3 】

Figure 23 (シート1/1)

gpl40mod.TV1.delV2

1 atgcctgtgga tgggcaacca gaagaaactgc cagcagctgtt ggtatctggg catctctggg
61 ttcttgatgc tgatgatctg caaacccggg aacctcttgg tgacctgtga ctacggctgg
121 cccgtgtggc gacagcccaa gccaccctgt ttctggccca gacagcccaa ggcctcaagg
131 accggtgtgc acaactgtgt ggcacaccaa gctatgtgtc caacagccaa gaaccocagg
241 gaaatctgtc tgggaaactg gacagcccaa ttcaactgtt ggaagaaaga catggccgac
301 cagatctcag agcagctgat cagctctgtg gacacagcc tgaagacctt gttgaaactg
361 accctctgtt gctgacctt gactctgccc gacacacag ttgacctgtt cccagcctgtg
421 accggaacca gcaacacaaa ccaacagccg accgacctct acacatctga ggtatgtgag
481 aactgcagct tcaacgcctg cccgcccgc ctgatcaact gcaacacagg caactcaaac
541 ccgctctgca ccaagtgtag ttctcaacca atcccctccc actactcggc ccccgccggc
601 taagcaatcc tgaagtgtca caaacagcc ttcaacggca cccgccccgt ctcaaacgtg
661 agccctgtgc agtcaacca cgtactaag cccgtgtgtg gcaaccogct gctgtgaaac
721 ggaactctgt cccagctggg actctatcct cggcagcaga aactctgccc gaacacagag
781 acactctgtc tgcactctga cgaagctgtt gactcaact gcccgcggcc caaacaaaac
841 accgcaaga gctgtgcat cggcccggc cagctctctt agcccaaaa cgaactgact
901 ggaacatcc gcaagcaca ctgcaactc agacagcag gctgaaacaa gacctctgag
961 ccagctgccc agaatgtgg cgaagctctt ccaacaaga cctaccgctt cgaagccaac
1021 cccgcccggc acctgagat caacatgac agttcaact cgcggcggca gttcttctac
1081 tgcacacaa gaaactgttt caacagacc taacacaga acaacgggac ctcaagatcc
1141 gaaagcaaa ccaagacctt caactcctgt caatcaaaa tcaagccgat ctgctcaagt
1201 tggcaggcgc tagcaccagc caactaagcc ccccactctg ccggcaaac caactcggcc
1261 agcaactcag ccggactctt ctgcaaccgc gacggctgtt tcaaccacaa caaacaaac
1321 gcaactctcc ccccggggg cgtgcaactg cggcccaact gggcagcga gttgtcaag
1381 taacaggttg tagatataa gccctctggc atcccccga ccaagcaga gccgctctg
1441 gtcagagcgc agaaagcgg ccggccgcat gacggctgtt tcttggctt cctgggccc
1501 cccggcagca ccaatggggc cgtgcaactg cctcaagcc actctgagc cccctctgtg
1561 agggctctgc tggcagcaga gacacactct ctgaagcga ccaagcaga cagccactat
1621 ctgacagcgc acgtctgggg actcaagagc ctgagccgc gctgtgtgac atagcagcgc
1681 taactctagg tgaagctggc ctgtggctga gggagctaca tcaatcggct cgaagactgt
1741 accgctgtgc cctggaaagc cagctctgag caaacagcgc agaaagcct ctgggacact
1801 atgacctgga tgcactgaga cccagagacc agcaactaca accgctctat ctcaaacctt
1861 ctggagcaga cccctctgga cccagagacc agcaactaca accgctctat ctcaaacctt
1921 tggcaacaaa tctgaaactt gttcagcact agcaactcgc cctgtactct ataa

【 図 2 4 】

Figure 24 (シート1/1)

gpl40mod.TV1.mut7

1 atgcctgtgga tgggcaacca gaagaaactgc cagcagctgtt ggtatctggg catctctggg
61 ttcttgatgc tgatgatctg caaacccggg aacctcttgg tgacctgtga ctacggctgg
121 cccgtgtggc gacagcccaa gccaccctgt ttctggccca gacagcccaa ggcctcaagg
131 accggtgtgc acaactgtgt ggcacaccaa gctatgtgtc caacagccaa gaaccocagg
241 gaaatctgtc tgggaaactg gacagcccaa ttcaactgtt ggaagaaaga catggccgac
301 cagatctcag agcagctgat cagctctgtg gacacagcc tgaagacctt gttgaaactg
361 accctctgtt gctgacctt gactctgccc gacacacag ttgacctgtt cccagcctgtg
421 accggaacca gcaacacaaa ccaacagccg accgacctct acacatctga ggtatgtgag
481 aactgcagct tcaacgcctg cccgcccgc ctgatcaact gcaacacagg caactcaaac
541 ccgctctgca ccaagtgtag ttctcaacca atcccctccc actactcggc ccccgccggc
601 taagcaatcc tgaagtgtca caaacagcc ttcaacggca cccgccccgt ctcaaacgtg
661 agccctgtgc agtcaacca cgtactaag cccgtgtgtg gcaaccogct gctgtgaaac
721 ggaactctgt cccagctggg actctatcct cggcagcaga aactctgccc gaacacagag
781 acactctgtc tgcactctga cgaagctgtt gactcaact gcccgcggcc caaacaaaac
841 accgcaaga gctgtgcat cggcccggc cagctctctt agcccaaaa cgaactgact
901 ggaacatcc gcaagcaca ctgcaactc agacagcag gctgaaacaa gacctctgag
961 ccagctgccc agaatgtgg cgaagctctt ccaacaaga cctaccgctt cgaagccaac
1021 cccgcccggc acctgagat caacatgac agttcaact cgcggcggca gttcttctac
1081 tgcacacaa gaaactgttt caacagacc taacacaga acaacgggac ctcaagatcc
1141 gaaagcaaa ccaagacctt caactcctgt caatcaaaa tcaagccgat ctgctcaagt
1201 tggcaggcgc tagcaccagc caactaagcc ccccactctg ccggcaaac caactcggcc
1261 agcaactcag ccggactctt ctgcaaccgc gacggctgtt tcaaccacaa caaacaaac
1321 gcaactctcc ccccggggg cgtgcaactg cggcccaact gggcagcga gttgtcaag
1381 taacaggttg tagatataa gccctctggc atcccccga ccaagcaga gccgctctg
1441 gtcagagcgc agaaagcgg ccggccgcat gacggctgtt tcttggctt cctgggccc
1501 cccggcagca ccaatggggc cgtgcaactg cctcaagcc actctgagc cccctctgtg
1561 agggctctgc tggcagcaga gacacactct ctgaagcga ccaagcaga cagccactat
1621 ctgacagcgc acgtctgggg actcaagagc ctgagccgc gctgtgtgac atagcagcgc
1681 taactctagg tgaagctggc ctgtggctga gggagctaca tcaatcggct cgaagactgt
1741 accgctgtgc cctggaaagc cagctctgag caaacagcgc agaaagcct ctgggacact
1801 atgacctgga tgcactgaga cccagagacc agcaactaca accgctctat ctcaaacctt
1861 ctggagcaga cccctctgga cccagagacc agcaactaca accgctctat ctcaaacctt
1921 tggcaacaaa tctgaaactt gttcagcact agcaactcgc cctgtactct ataa
2041 aactggacct gttacateta a

【 図 2 5 】

Figure 25 (シート1/1)

gpl40mod.TV1.tpa2

1 atggatgaaa tgaagagagg gctctctgtt gctctctgct tgtgtgggag agtctctgtt
61 tggcccaaga caaacaggga cctgtgggtt acgtctgat accgctgcca cgtgtgggga
121 gacgccaaga caactctgtt ctggcccagg gaccgcaagg ctacagggac caggtgtgac
181 aagctgtggg caaccacagc ctatgtgtcc accgcaacca acccccagga gatcgtctct
241 tgaagctgtc cccagaaact caactcctgt caagcaaaa tggcccagca gatcgtcagg
301 gacgtgtaca gctcttggga ccaagagctg aagcctctgq tgaagctgac cccctctgpc
361 gtaaccctga actgcaacga ccaacaagtg accgcaaac gaacatgac cggcaaacgg
421 acccaacaaa ccaacagggc cgtgcaactg aactcaagag agtatgaaga ctgaccttct
481 accgccaaca ccaagatgag cgaacaagag caacaagagt accctctgtt ctaccogctg
541 gactctgccc cctgaaaga gacagagccc aactctccc accgctctat caactgcaac
601 accgcaacca tcaaccagag cttgcccagg gtaagctctg acccctccc catctactac
661 tggcccggcc ccgcttggc calctctgag tgcacaacaa agsecttcaa cggcaccggc
721 cctctataca acgttggagc cgtgcaagtc acccaagga tcaagccggc gggcagacc
781 cagctctgag tgaagctggc ctgtggctga gggagctaca tcaatcggct cgaagactgt
841 accgcaaca cccagaccat calctctgac ctgaagcaga gctgtggat caactgcaac
901 cggcccacaa caaacacagc caagagctt cpatctggc cccgcccagg ctctctagcc
961 accaagcggc tgaagctgga catctccagc gaccacagca actctgagc accgctctg
1021 acaagagccc tggagagat gatgaaagag ctggcccagg actctccaaa caagcactat
1081 cagttcaagc cccagccggc cgtgcaactt gaaatcaaaa tgcacagctt caactcggcc
1141 gggcgtctct tctactgaaa caacagaaac ctgttcaaaa gbaacttcaa caagcaaac
1201 ggaactcaaa agtcaacagg caacagagc agccccttca cctgtgggtt caagctcaag
1261 cagatctgta gcatgtgaga gggctgtggc cagcccaact acccccacc catcggccc
1321 acaatcaact gctgcaagaa ctccaccggc atctctgtga cctgcccggc cggctctaac
1381 acccaacaaa caacagagc ctctgcccgc cggctgtggc actgtgcca caactgtgpc
1441 agcagactgt caaagtcaaa gttgtgtgag atcaacagcc tgggatgag ccccaacaag
1501 gccaaagccc gctgtgtgca ggggagagag cggccggggg gactctgccc gactgtctg
1561 ggttctctgg gggccggggc caaacactgt gggccggcca gactctgccc gactgtctg
1621 ccccagagcc tctatggag calctctgac cagcaagaca actctgtaa ggcctctgag
1681 gcccaagccc caactctgca gctgcaactt tgggcaatca accactgccc gcccogctgt
1741 ctgacctgtg agttactctt gaaagaccgc caactctgtt gactctgggt ctgcccggc
1801 cgtctgtact gcaaccagcc cgtgcccgtt acaagcagct gaaacacaaa gcccagagag
1861 gcaactctgg acaactgag ctggatggag tgggagctgg agatcagaaa ctcaaacctt
1921 ctgacttaca accctgtgga gggccagcag acccaagagg agaaagaa gaaagactgt
1981 ctggagctga caaagtgaa caactctgg accctgtgtt acatcagaa ctgcccctgg
2041 taactctaa

【 図 2 6 】

Figure 26 (シート1/1)

gpl40.TM.mod.TV1

1 atgcctgtgga tgggcaacca gaagaaactgc cagcagctgtt ggtatctggg catctctggg
61 ttcttgatgc tgatgatctg caaacccggg aacctcttgg tgacctgtga ctacggctgg
121 cccgtgtggc gacagcccaa gccaccctgt ttctggccca gacagcccaa ggcctcaagg
131 accggtgtgc acaactgtgt ggcacaccaa gctatgtgtc caacagccaa gaaccocagg
241 gaaatctgtc tgggaaactg gacagcccaa ttcaactgtt ggaagaaaga catggccgac
301 cagatctcag agcagctgat cagctctgtg gacacagcc tgaagacctt gttgaaactg
361 accctctgtt gctgacctt gactctgccc gacacacag ttgacctgtt cccagcctgtg
421 accggaacca gcaacacaaa ccaacagccg accgacctct acacatctga ggtatgtgag
481 aactgcagct tcaacgcctg cccgcccgc ctgatcaact gcaacacagg caactcaaac
541 ccgctctgca ccaagtgtag ttctcaacca atcccctccc actactcggc ccccgccggc
601 taagcaatcc tgaagtgtca caaacagcc ttcaacggca cccgccccgt ctcaaacgtg
661 agccctgtgc agtcaacca cgtactaag cccgtgtgtg gcaaccogct gctgtgaaac
721 ggaactctgt cccagctggg actctatcct cggcagcaga aactctgccc gaacacagag
781 acactctgtc tgcactctga cgaagctgtt gactcaact gcccgcggcc caaacaaaac
841 accgcaaga gctgtgcat cggcccggc cagctctctt agcccaaaa cgaactgact
901 ggaacatcc gcaagcaca ctgcaactc agacagcag gctgaaacaa gacctctgag
961 ccagctgccc agaatgtgg cgaagctctt ccaacaaga cctaccgctt cgaagccaac
1021 cccgcccggc acctgagat caacatgac agttcaact cgcggcggca gttcttctac
1081 acaagcaaga tcaacttcaa gcccccagcc gggcggagcc tggatctac ctgacagcc
1141 tcaactctgc aggtgtggtt ctctactg gaaacacaga acccttcaa caagactac
1201 caagcaaaa aggcaccta caatcaaac gaaacagca agcctccat caactctgac
1261 tgaagatca agcagctgtt gcatctgtg caggtgtgtg gggcggagcc ctgaccccc
1321 caactctgca gcaactaac ctgcccggc caactcaaac accctcccgt gactctgca
1381 gggcgttca caaacacaa caaacagag accctcccgc cccgcccggc agactctgac
1441 gaaactctgc gcaagagct gcaactgac aagttgtgt caggtgtgtg gggcggagcc
1501 gcccccacaa aggcctcaag cctgtctgag gpatctgtg agatctgag cctgtctgag
1561 ccgctcttcc tggcttctt tggcttctt gggcggagcc ggaacacaa agactcaaac
1621 ctaccctgtc aggcctcaag cctgtctgag gpatctgtg agatctgag cctgtctgag
1681 aagcctgag aggcctcaag gcaactctg cagctgagc tgggtgact caaacctgt
1741 cagcccggc tggctgcat cggcgtac ctgaagacc agcagctt aggtctgtg
1801 ctaccctgtc gcccctgac ctgctgag gpatctgtg agatctgag cctgtctgag
1861 aagcctgag aggcctcaag gcaactctg cagctgagc tgggtgact caaacctgt
1921 actcaacagc gctgtacta caactctgt gggcggagcc ggaacacaa agactcaaac
1981 gaaagagccc tggctgagct gaaactgtg acaactctgt gaaactgtg agatctgag
2041 aactggacct gttacateta a

【 図 2 7 】

Figure 27 (シート1/1)

gp160mod.TV1.del118-210

1 atgagcgtga tgggaccaca gaagaactgc cagcagtggt ggaatctggg catccctggc
61 tcttgatgac tgatgatctg caaacccag gaactctggg tgaacctgta ctacggctgg
121 cccgtgtggc gcaagcccaa gaccacctg tcttgccca gcagcccaa gcaactcaag
181 accgagtgtc acaactgtgt ggcaccacc cccctcgtgc ccccccagcc caaaccocag
241 gagatcgtgc tgggcaactg gaaccagaac ttaacatgt ggaagaaca catgcccagc
301 cagatgcaag aggaactgat cagctctggt gaccagagcc tgaagccctg cgtgggcgcc
361 ggcgccctgc ccaagtgtaa ctctgacc ccaccatcc actactgpc ccccgcggc
421 taacccatcc tgaagtga caaacagacc ttcaagccca cgggcccctg ctacaactg
481 agcaactgag agtgaccaca cggcabaag cccgtggtga gcaaccagct gctgtgtaac
541 gcaagctgag ccaagggagg cactcatcc cgaagcaga acctgacga gaaccacaag
601 accatcatcg tgaactgaaa cggagcgtgt gagaatcaat gcaccggccc caaacaacac
661 accgcaaga cgttgcgat cggccccgc cagccttct agcccaaca cgaactgatc
721 ggcaacatcc gcaagcgcga ctgcaaatc cccaagacc gctggaaaca gaacctcgag
781 cagtgatgca agaactgagg cgaagcatt ccacaaga caatccagtt caagcccacc
841 gccggggagg acctgagat caactgacc agcttcaact gcgcgggaga gtcttcttac
901 tgaacaacca gcaactctgt caaacagacc taaccagca caaaggacc ctacaagtac
961 aacggcaaca gcaagcagcc catcaacct cagtcaga taacagat cgtgagatg
1021 tggcagggag cgggcagcc cactacgcc cccctcagc ccggcaact cactctgccc
1081 agcaacata cggatctctc gctgaccgc gaggcggtt tcaaacacc caaacaaccc
1141 gagactctcc ccaagcgcga cgtgacatg cgcgacaact ggcgagcaga gctgtacaag
1201 taacaagtg tggagataaa gccctggg c atggccc caaaggccca gcgcgcgtg
1261 gtcgagcgg agaagcggcc cgttggact ttcccggctt tcccggctt ccagccgccc
1321 gccggagca caatggggc cgcagatcc acctgacc tgaagccgc cagctctgt
1381 agcgagcag tgcagcaga tgcgaactc ctgaaggcca gcaagcagc
1441 ctgagctgca cagtgtggg cactcaagc ctgcaagccc gctgctgca catgagcag
1501 taactgaag accagcagcc gctgggacc tggggctgca gggcgccct gatctgacc
1561 accgctgag cctgggacc cactgagc aaacagggc agaaagact ctgggcaac
1621 atgactgga tgcgttggca cggcagatc agcaactaca ccgctgatc ctacaacctg
1681 ctgagagca cgcagaaaca cgcagcgaag acaagaaag acctgtgga gctggacaag
1741 tgaacaacc cttgggaact gttgcagtc agcaactgccc cctgttact gatcattctt
1801 atcatgatg tggcgccctt ggcattcct tgcctgctc cagactctgt cagactctgt
1861 aaccgctgc gccagggcta cagccccct agcttcaaga cctgaccce cagccccgc
1921 ggcctggaac gactggggc cctggaggc atcgagag gagggcggc agcagagcc cgaccagc
1981 atccgctgg tgaagcgtt cctgagctg gctggaggc acctgccc cactgtgctg
2041 ttagctgag cactgagct cactatcct ctatcggcc gggagcagc gggcagcgg
2101 gccaacaga cccgctggc cctgagccc gctggaaga tccgaagta cctggcagc
2161 ctggtcagt actggggctt ggaactgaa aagagccca tccgctgct ggaacacct
2221 gcaatcaacc tggcggagg caccgccc atcatcagc tggctgagc catctgcgcc
2281 gcaatcctga acatcccc cgcactccg caggctctg agggccctc gctgtaa

【 図 2 8 】

Figure 28 (シート1/1)

gp160mod.TV1.del1V12

1 atgagcgtga tgggaccaca gaagaactgc cagcagtggt ggaatctggg catccctggc
61 tcttgatgac tgatgatctg caaacccag gaactctggg tgaacctgta ctacggctgg
121 cccgtgtggc gcaagcccaa gaccacctg tcttgccca gcagcccaa gcaactcaag
181 accgagtgtc acaactgtgt ggcaccacc cccctcgtgc ccccccagcc caaaccocag
241 gagatcgtgc tgggcaactg gaaccagaac ttaacatgt ggaagaaca catgcccagc
301 cagatgcaag aggaactgat cagctctggt gaccagagcc tgaagccctg cgtgggcgcc
361 accccctgt cgtgaccct gaactgacc caaccatcc actactgpc ccccgcggc
421 aagtgaggt tgaaccct ccccatccc ccaagccacc ggcctcgtgc ccaacgagcc
481 aagtgaaca caaagacct caagccacc ggcctcgtc acsaactgtg acsaactgtg
541 tgaaccacg catcaagcc cgtggtagc acccaagcc ctaagctgca ctaatctgtg
601 gaggagggca tcaactcgc cagcagagac ctgaccgaga acacaaagac ctaatctgtg
661 cactgagag agagcgtgga gatacactg accgcccca acacaacac cgcagaagc
721 gtcgcatcg cccccgcca ggccttacc gccaacaag acgtgatcg caactccg
781 cagggccact gcaactcag caaccagcc cctgcaaga cctgcagca gttgatgag
841 aagctggggc agacttccc caacaagac atcaacttca agccccagc cggggggag
901 ctggagata caatgcaag cttaactgc cggggaggt tcttctacty caaacagc
961 aactgttca ccgcaacta ccaagcaac accggccctt acsaactaca cgcacaagc
1021 agcagcccca tcaactgca gtcagatg aaagatgt gcgctggt gcagggctg
1081 gggcagcca ctaagcccc cccactcgc ggaacata cctgcagca caatacctc
1141 ggcactctgc tgaccgcga cggcgctt caacaacca caactccgc gaactccc
1201 cccggggcg gcagactgc gcaactgc cgcagcagc tgtaacaag caagtggtg
1261 gagatcaag cctggggct cggccccc aagcocaagc cgcgctgtg gcagcagc
1321 aagcggccc tgggcatcg cggcgttct cttggcttcc tggggcggc cgcagacc
1381 atggggccc cagatcac ctaagcctg cagcccgc agctctgag ggcctgag
1441 cagcagaga gcaactgct gaagcctc gaggccagc agcaactgt gcaactgacc
1501 gcttggggca tcaagcagc gaggccgc gctgtgcca tgaagccta cctgaagcc
241 gagactgca tcaagcagc gaggccgc gctgtgcca tgaagccta cctgaagcc
1561 cagcagcgc tgggcatct gggctcagc ggcctgca tctgaccca cctgaagcc
1621 tgaacaaga gctggagca caagcagag aggaactct ggaacaact gatctgtg
1681 cagtgggacc gcagatcag caactacc ccaactctt caaactctt ggaagcagc
1741 gaaacacag aggaagaca gaaagagac ctgtggagc tggacaagt gaacaacctg
1801 tgaactgag caactggcc tggatcaact aa

【 図 2 9 】

Figure 29 (シート1/1)

gp160mod.TV1.del1V2

1 atgagcgtga tgggaccaca gaagaactgc cagcagtggt ggaatctggg catccctggc
61 tcttgatgac tgatgatctg caaacccag gaactctggg tgaacctgta ctacggctgg
121 cccgtgtggc gcaagcccaa gaccacctg tcttgccca gcagcccaa gcaactcaag
181 accgagtgtc acaactgtgt ggcaccacc cccctcgtgc ccccccagcc caaaccocag
241 gagatcgtgc tgggcaactg gaaccagaac ttaacatgt ggaagaaca catgcccagc
301 cagatgcaag aggaactgat cagctctggt gaccagagcc tgaagccctg cgtgggcgcc
361 accccctgt cgtgaccct gaactgacc caaccatcc actactgpc ccccgcggc
421 accgcaaca ccaacaagc accggatct ccaacatgca ggaagatgag
481 aactgagct tcaagccgg cgcggcggc ctatcaact gcaaacacc accatcaacc
541 cagcctgccc caaggtgaa cttaaccoc atactgctc ccccgccggc
601 taagcactcc ccaagcgcga cgtgacatg cgcgacaact ggcgagcaga gctgtacaag
661 agcaactgag agtgaccaca cgcataca cccgtgtgga gcaaacagct gctctgcaac
721 ggcagcctg ccaagggagg catcaactc ctgagcggc acctgaccga caaaccaacc
781 accatcatcg tgaactgaaa cggagcgtgt gagaatctt agcccccacc caactgatc
841 accgcaaga cgtgagcag cggccccgc cagcctctct agcccaaca cgaactgagc
901 gcaacatccc gccagccca ctgcaaatc agcaaccacc gctggaaca gaactctgag
961 cagtgatgca agaactgagg cgaactctt ccaacaaga ccatcaact caaegcccac
1021 gcaagggagg acactgact caactgacc acctgacc gccgggccc gttcttctac
1081 tgaacaacca gcaactctgt caacagacc taaccagca acaagggacc ctacaactg
1141 accgcaaca cgaagcacc caactacct cagtgaaga tcaagcagat cgtgcaatg
1201 tggcagggcg tgggcagccc caactagcc ccccctcgc cggcaaacat cactgcgcc
1261 agcaacatca cggcctctct cgtgaccgc ctgagccgc ccccgccctg caacaacacc
1321 ggaactctcc ccccccggc cgcagcagc ggcagcaact ggcgacaga gctgtacaag
1381 taacaagtg tgaagataaa gccctggg atgcccacca ccaaggccca gcgcgctg
1441 gtaagcaggc agaagcggc cgtgggact gggcctgtgt tctgggctt cctggggccc
1501 gccagcaga ccttgggag cgcagcctc acctgaccg accctgaccg caactctgtg
1561 agcagcagc tgaagcaga gcaactcty ctgaagcga ctggagcca gcaactgagc
1621 ctgaactgca cctgtgggg catcaagcc cctgctgccc gctgtgccc ctagcaggc
1681 taactgaaag accagcagc cagctgcatc tggcctgca gggcggcct gatctgacc
1741 accgctgca cctggaacag cagctgagc acaactaca cccgctgat ctggaacaac
1801 atgactgag tgcactgaaa cgcgagatc agcaactaca cccgctgat ctggaacaac
1861 ctggagagca gccagaacca caggagaag aacgagaag acctgctgga gctgtgaca
1921 tggacaacac tctggaactg gttgcagtc agcaactgca cctgtaact caagatctt
1981 atcatgatg tggggcctt gatcggcty cgaatcaat tgcctgctc gagaactctg
2041 accgggagc gccaggact accatgacc acctgacc ccttgaacc cagccccgc
2101 ggcctgagc gcaactctgt caacagacc taaccagca acaagggacc ctacaactg
2161 atccgctgg cgaagcacc caactacct cagtgaaga tcaagcagat cgtgcaatg
2221 ttagcctacc accgctgag cactatccc cctgagccc cccgtgccc ctagcaggc
2281 gccaacaga cctgcggcg cctgagccc cctgagccc cctgagccc ctagcaggc
2341 ctggtcagt cctggggctt ggaactgaa aagagccca tccgctgct ggaacacct
2401 gcaatcaacc tggcggagg caccgccc atcatcagc tggctgagc catctgcgcc
2461 gcaatcctga acatcccc cgcactccg caggctctg agggccctc gctgtaa

【 図 3 0 】

Figure 30 (シート1/1)

gp160mod.TV1.dV1

1 atgagcgtga tgggaccaca gaagaactgc cagcagtggt ggaatctggg catccctggc
61 tcttgatgac tgatgatctg caaacccag gaactctggg tgaacctgta ctacggctgg
121 cccgtgtggc gcaagcccaa gaccacctg tcttgccca gcagcccaa gcaactcaag
181 accgagtgtc acaactgtgt ggcaccacc cccctcgtgc ccccccagcc caaaccocag
241 gagatcgtgc tgggcaactg gaaccagaac ttaacatgt ggaagaaca catgcccagc
301 cagatgcaag aggaactgat cagctctggt gaccagagcc tgaagccctg cgtgggcgcc
361 accccctgt cgtgaccct gaactgacc caaccatcc actactgpc ccccgcggc
421 aagtgaggt tgaaccct ccccatccc ccaagccacc ggcctcgtgc ccaacgagcc
481 agcaaoact tcaactaac cctgataca tgaacaaca gaaacatac caagctgca
541 ccaaggtag gcttgcagc catcccctc caactgca cccccccg ctagcggctc
601 ctgaagtga acaacaagac cttaaccgc accgcccct gatacaagt gagaacctg
661 cagtgcacc acgctatca cccgctggg agcaaccgc tgcctgta ggcgagcctg
721 gccagggag gaatacat cgcgagagc aactgacc agaaacaaca gaaactatc
781 gtcacctga acgagaggt ggaataca tgaaccgca caaacaaca caccgcaag
841 agctgccc tggcccgg cagccctc taagcaga acactgag cgaactgag cggcagctg
901 gccagggc actgaaact cagccagc cgttgaaca agcctctgca gcaactgag
961 aagagctgg cggagactt ccaacaag acatactga tcaagcccc cgcggcggc
1021 gactggaga taaccatga cagcttcaa tggccggcg agtttctta ctgaacacc
1081 agcaactct taacaagca ctaccaagc acactgca ccaactgca gcaactgag
1141 agcagacc caatcacct cagtgcaag atcaagca tctgctgat gtcagagc
1201 gtcggcagg caactcagc cccccctc ccccccagc ccaactgca ccaactgca
1261 accgctacc tgcagccc cgaagggcg tcaacaca caacaacac cgaactctc
1321 ccccggcg gggcgaact cgcagacc cgcagacc tgaaccgca caaacaaca caccgcaag
1381 gtagataa agccctgg cctgcccc accaagca agccggct gtagagagc
1441 gaaagggc cgtggaact cagccagc cgttggct tcttgagct tccctggct gggcggcg
1501 acaactggc ccgcagact accctgac gtcagccc gccactgct ggcgctgag
1561 gtcagcagc agcaactc gctgagccc atcagccc accagcaat gctgagctg
1621 accgttggg gatacaaga cgtgagccc cgtgctgg cactgagc ctactgag
1681 gaccagagc tctggggat cttgggctg agcggccc gactgagc acccctgag
1741 cctggaaca gaactggag caacaagag gegaagaca tctggcaaa catgactgg
1801 atgagtgag accgagag cagcaact accgctgca tctacaact gctggagagc
1861 agcagaacc agcaggaga caagcagag cactgtagc gctgtgga gtaggagc
1921 ctgggaact gttgcagc cagcaacty cactgtaa tcaagcagc gcaactgagc
1981 gtcggggcc tgaactgag cagcaacty cctggtagc taactgagc gtaggagc
2041 ccaagcct accgcccct gacttcaa agcctgacc caactgagc cccctggag
2101 cgtggggc gactgagga ggaagggcg gacagagcc cgcagcagc catccctg
2161 gtagggct tccagcct cccctggag gactgagc gactgagc gctgagc
2221 accgctgc gcaactcat cctgagcc gtcgcccgg tggactgt gggccagc
2281 agcctggcg cgtcagcag cgttgggg atcctgaag atcctgagc ggcctgagc
2341 taactggggc tggagctgaa gaagagccc atcagctgc tggacaact cccatcaac
2401 gtcggggc catcatag cttgtgagc agctgagc gactctgag gcaactctg
2461 acaatcccc ccgactccg caaggcttcc gaggcggc tggctgaa

【 図 3 1 - 1 】

Figure 31 (シート 1/2)

gpl60mod.TV1.dV1-gagmod.BW965

1 atgagcgtga tgggcaccga gaagaactgc cagcagtggg ggtctgggg catcctgggc
61 ttcttgatgc tbatgatctg caaacccctg gactctggg tgaacctgtg ctacggcgtg
121 cccgtgtggc gegaagccca gaccacccctg tcttggccca gogacgcca ggccctacag

【 図 3 1 - 2 】

Figure 31 (シート 2/2)

3181 catcccgctg cgcocccggc goaagaagtg ctacatgatg aabaaacctgg tfgtggccag
3241 ccgcagagtg gagaagtctg cccctgaacc cgcctcgtcg gagaccagcg agggctgcga
3301 gaagatcctc gcccagctgc acccccctct ggaagccgca agcgaggagc tgaagagcct

【 図 3 2 - 1 】

Figure 32 (シート 1/2)

gpl60mod.TV1.dV1V2-gagmod.BW965

1 atgagcgtga tgggcaccga gaagaactgc cagcagtggg ggtctgggg catcctgggc
61 ttcttgatgc tbatgatctg caaacccctg gactctggg tgaacctgtg ctacggcgtg
121 cccgtgtggc gegaagccca gaccacccctg tcttggccca gogacgcca ggccctacag

【 図 3 2 - 2 】

Figure 32 (シート 2/2)

3181 gatactccgc cagctgcaac cgcocctcga gacccgcagc gaggacttga agagcctggt
3241 caaacaccgtg gccacctctg actgctgctga cgaagaactg gaggctccgc acacaagaa

【 図 3 3 - 1 】

Figure 33 (シート 1/2)

gp160mod.TV1.dv2-gagmod.BW965

1 atgcgctgta tgggaacca gaagaactgc cagcagtgtt ggatctgggg catcctgggc
61 ttctgtagtc tgatgatctt caaacaccag gactctggg tgacctgtta ctaaggcgtt
121 cccgtgtggc ggaagcccaa gaccaccctt ttctggccca ggaagcccaa ggcctaacgg
181 accgagtgcc acaactgttt ggcacaacc gctctgtgpc gcaagccccc cagccccag

【 図 3 3 - 2 】

Figure 33 (シート 2/2)

gp160mod.TV1.dv2-gagmod.BW965

3181 ctggggagcgc atccgctgc gcccggggc caagaatgc tacatgatga agcaccctggt
3241 ttggggccagc cgcgagctgg aagaatttgc cctgaacccc ggcctcgtgg agaccagcga
3301 gggctgoaag cagataoatcc gccgcctgca ccccgcctgg agaccggcga gcgaggagct

【 図 3 4 】

Figure 34 (シート 1/1)

gp160mod.TV1.tpa2

1 atggatgcaa tgaagagagg gctctgtgtt gtctgtctgc ttgtttgggg agctcttggtt
61 tgcgccaaga acaccgagaa ctgttgggtg acgctgtta accgctgtga cgtatggggc
121 gacgcaaga ccaactcgtt ctgctcagc gacgcaagg cctcagagac cgaaggttccac
181 aacgtgttgg ccaccaccgc ctgctgtccc accgcaacca acccccagga gatcgtgtgt

【 図 3 5 - 1 】

Figure 35 (シート 1/2)

gp160mod.TV1-gagmod.BW965

1 atgcgctgta tgggaacca gaagaactgc cagcagtgtt ggatctgggg catcctgggc
61 ttctgtagtc tgatgatctt caaacaccag gactctggg tgacctgtta ctaaggcgtt
121 cccgtgtggc ggaagcccaa gaccaccctt ttctggccca ggaagcccaa ggcctaacgg

【 図 3 5 - 2 】

Figure 35 (シート 2 / 2)

3181 aaccacgggg acgtggtttt cetttggaaa acacgataat accatggggg cccgogccaa
3241 catcctgggg ggggggaagc tggagcctgt ggaagcgatc cgcctggccc cccggcgcaa
3301 gaagtgtact atgatgaagc caagcagggg ctgtagggag asactggccc agtctggccc
3361 gaaccctggc ctgtctggga ctgtctggga gacctgtgtt aaacccgtgg acctgtcaacc
3421 cgccttgcaag accgggaagc aggagctgaa gacctgtgtt aaacccgtgg acctgtcaacc
3481 ctgctgtgac gagaagatgc aggtctggca ccaacagggg gacctgtgtt aaacccgtgg
3541 ggaagcagaa aagtgcagc agaagatcca gcaagccggg gcctggcaaa agggcaagtt
3601 gaggcagaaa taacctatgc tgcagaaact gcagggccag atggtgcaac gcccacatag
3661 ccccgcaacc tgaacgact ggtggaaggt gatcgaggg aagcccttca gccccaggtt
3721 gatccactgc ttaaccgccc tgaagcaggg cgcacaccoc caggacttca acacagttgtt
3781 gaacacctgt tggggccacc agggcccaat gcagatgctg aaggacacca tcaacgagga
3841 gggcggccag tgggaaacgg tgaaccctgt gcaagccggc cccatgcccc ccggccaatg
3901 gggcgaagcc cggggcagcc acatgcggcg caccacacgc accctgcaag agcagatcgc
3961 ctggatgacc agcaaacccc ccatcccctt gggcgacatc tacaagcggt ggatcatcct
4021 gggcctgaac aagatcgtgc ggatgtacag ccccctgtag atcctggaca tcaagcaggg
4081 ccccaaggag ccccttcggc actaagtgga ccgcttcttc ccgcttcttc ccgcttcttc
4141 gaggcaccag gaggtaaga actgatgtag cgacaccctt ctggtgcaag agcgcacaacc
4201 cgaactgcaag accatcctgc gcgctctcgg ccccgggccc agcctggagg agctgatgac
4261 cgcctggcag gctgtggggt ccccgccaca caagggccgc gtgctggccc aggcgatgag
4321 caagcacaac accagctgta aggatggaga ggaacacttc aagggccccc gggcactggt
4381 caagtgcctt aactgggca cgaagggggc ccaacagagt aactgcccgt ccccgccgca
4441 gaagggctc tgsaagtccg gcaagggggc ccaacagagt aactgcccgt ccccgccgca
4501 ctggcaactt ctgggcaaga tctgcccag ccaacagagt aactgcccgt ccccgccgca
4561 gaggcgcacc gaggcaacc ccccccggc cgaagcttct cgcctggagg agcaaacccc
4621 cggcagaag caggagagca agaccggca gacctgacc agcttgaaga gctctgtcgg
4681 caacgaccct ctgagcaaat aa

【 図 3 7 】

Figure 37 (シート 1 / 1)

int.opt\_C (South Africa TV1)
TTCTTGGACGGCATCGACAAGGCCAAGGAGGACACGAGCGCTACCAACAGCACTGGCGGCCATGGCC
AACGATTTAACTGCCCCCATCGTGGCCAGGAGATCGTGGCCAGCTGCAACAGTGCAGCTGAAAG
GGCAGGCAATCCACGGCCAGGTGGACTGACGCCCCGATCTGGCAGCTGCACACCTCCAG
GGCAAGATCATCTGGTGGCGTGCACGTGGCCAGCGCTAATGAGGCGGAGGTGATCCGCCCGAG
ACCGCCAGGAGACCCTACTTTCATCTGAAAGCTGGCCGCCGCTGGCCCGTGAAGGTGATCCACCC
GACAAACGGCAGCACTTCCAGCAAGCCCGGTGAAGGCCGCTGCTGTGGCCGGCATCCAGCAGGAG
TTGGCATTCCCTACACCCCAAGGAGGCGGTGTGGAGGCTGAACAGAGGATGATCCACCAAC
ATTGCCACGGTGGCCGACAGCCGAGCAGCTGAAGCCGCTGAAGCTGGCTGATCCATCCCAAC
TTCAAGCCAGGCGGATCGGGGTACAGCCGCGCGGAGCCGCTATCCAGATTCATCGCCACCGAC
ATCCAGACCAAGGAGCTGCAAGCAGATCATCGCATCCAGAACCTCCCGCTGATACCGGCAGCAG
CGCAGCCCATCTGGAAGGGCCCCCGAGGCTGCTGTGGAAGGGCGAGGGCGTGTGATGAGCAGGAG
AAGGGCGCATCAAGTGGTGTGCCCGCCGAAAGGCAAGGATCATCCGATCCCGCAAGCAGATGGCC
GGCCCGCATCTCGTGGCCGGCCAGCAGGAGAC

【 図 3 6 】

Figure 36 (シート 1 / 1)

int.opt.mut\_C (South Africa TV1)
TTCTTGGACGGCATCGACAAGGCCAAGGAGGACACGAGCGCTACCAACAGCACTGGCGGCCATGGCC
AACGATTTAACTGCCCCCATCGTGGCCAGGAGATCGTGGCCAGGCGCAAGTGGCCAGCTGAAAG
GGCAGGCAATCCACGGCCAGGTGGACTGACGCCCCGATCTGGCAGCTGCACACAGTGCAGCTGAAAG
GGCAGATCATCTGGTGGCGTGCACGTGGCCAGCGCTGCAACAGTGCAGCTGAAAG
ACCGCCAGGCAAGCCCTTTCATCTGAAAGCTGGCCGCCGCTGGCCCGTGAAGGTGATCCGCCGAG
GCCAAAGGCAAGTTCACACACCCCGCTGAAGGCCGCTGCTGGTGGCCGCGCTCCAGCAGGAG
TTGGCATTCCTTACACCCCAAGGCGAGGCGGTGTGGCGCTGAAAGGAGTGCAGAAAGATC
ATGCCAGGCTGGCCGACACGAGCCGAGCATCTGAAGCCGCGCTGCAGATGGCCGCTGATCCACCAAC
TTCAAGCCAGGCGGCTGGCGGCTCACGCGCCGCGAGCCATCATGCATCCAGCCAGCCAGCAGC
ATCCAGACCAAGGAGCTGCAAGCAGGAGTATCCGATCCAGAACCTTCGCGTGTGATCATCCGCGAGC
CGCCACCCCATCAAGGGCCCCCGAGGCTGCTGTGGAGGGCGAGGCGTGGTGTGATGAGGACAAAG
GGCCGATCAAGGTGGTGGCCCGCCGAGGCCAAGGCAAGATCATCGCGACTAGCCCAAGCAGATGGCCGCG
GCCGATCTGCTGGCCGCGCCAGCAGGAGAC

【 図 3 8 】

(シート 1 / 1)

nef.D106G.-myr19.opt\_C (dbl.mutant)
ATGATCCGCGCACCGAGCCCGCCGAGGGCGGTGGCCGCCGCGCCAGCCAGGACCTGGACAAGCAGCCG
CGCTGACCCAGCAGCAACCCGCCAACACCGCCGCTGCGCCCTGGTGGAGCCCGCAGGAGGAGGAG
GAGGAGGTGGCTTCCCGTGGCCCGCCAGTGCCTTCCGCGCCATGACCTCAAGGCCGCTTCGCAC
CTGAGCTTCTTCCTGAGGAGGAGGCGGCTGGAGGGCTGATCTTCAAGCAAGAGCCGAGGATTC
CTGACCTTGGTGTACCAACCCAGGGCTTCTTCGCCGCTGGCAGACATACCCCGCCGCGCCGCG
GTGGCTAACCCCTGACTTCCGCTGTGCTTCAAGCTGGTGGCGCTGGACCCCGGAGAGGTGAGGAG
GCCAAAGGGCGAGAACAACTCGCTGTGACCCCATGACCCAGCAGCCGATGGAGGAGCAGGAGCCG
GAGTGTGAAAGTGAAGTTCAGCAGCAGCCCTGGCCCGCCGCAATGGCCCGAGCTGACCCCGAG
TACTCAAGGACTGGCCG

【 図 4 0 】

Figure 40 (シート 1 / 1)

p2Pol.opt.YMWM\_C
GCCACATGGCCGAGGCCATGAGCCAGGCCACCAAGCCCAACATCTGATGAGCCGACCACTTCAAG
GGCCCAAGCGCATCATCAATGCTTCACTGCGGCAAGGAGGCCACATGCCCGCAACTGCCCGCCG
CCCCCAAGAGAGGGCTCTCGAAGGTGGCCAGAGAGGCCACACAGATGAAGGACTGCCACGAGCGCAG
GCCAATCTCTCCGAGGAGCTGGCCCTCCCAAGGCCAAGCCCGCGAGTTCGCCAAGGAGGAGAAC
CGCCCAACAGCCCAAGCCGAGCTGCGAGCTGCAAGTGGCGGGGACACCCCGCAGCCAGCCCGCCG
AGGCCAGGAGCCCTGAAATCTCCCAAGATCACCTGTGGCAGCAGCCCGTGTGGAGCATCAAGGTG
GGCGGCAGATCAAGAGGCCCTGCTGCGCCGCGCAGCAGCCTGTGGAGGATGAGCGTCG
CCCGCCAAAGTGAAGCCCAAGAGATCGGCGGCATTCGCGGCCTTCAACAGTGGCCGATGACAGC
ATCTGTGATGAGATCTGCGCAAGAGGCCATCGCAGCCTGCTGATGGCCCAACCCCGTGAACATC
ATGGCCGCAACATCTGACCCAGCTGGCCCTGACCTTGAATCTTCCATCGCCGCTTCCAGCCATCGA
CCCGTGAAGCTGAGCCCGCCATGAGCAGCCGCCAAGGTGAAGCAGTGGCCGCTGACGAGAGGATTC
AAGGCCCTGAGCCCGCATCTGCGAGAGATGAGAGAGGAGGAGGCAAGATCACAGATGCGCCCGAGAAC
CCTTCAACACACCCCGCTGTGCGCATCAAGAGAGAGGAGAGCCAAAGTGGCCAGCTGGTGGACCTC
CGAGCTGAAGCAGCCAGCCAGGACTTCTGGAGAGTGTAGCTGGGCCATCCCGCAGCCCGCGCCTG
AAGAGAGAGAGAGCGTGGACTGTGGACTGTGGACTGAGCCGCTTCTAGCGTGCCTGGAGAGGAGC
TTCCGCAATGACAGCCGCTTCACTCCGCTCAACAGAGACCCCGGATTCGCTTCAAGATAC
AACCTGCTGCCCAAGGCTGGAAGGCCAGCCGAGCATTTCCAGAGCAGCAGTACCAAGATCTGGAG
CCCTTCCGCGCCGCAACCCCGAGATCTGATCTTACAGGCCCGCTGTAGCGGGCAGCAGCCGCGAG
ATGGCCAGCAGCCCGCCAGATGAGAGGAGCTGAGAGGAGGCGCAAGCTGCGCTGGGCTTCCAGCC
GACAGAGAGCCAGAGAGGCCCGCCCTTCTGCCATCGAGCTGACCCCGCAAGGTGGACCGTGGAC
CCCATCGAGCTGCCGAGAGGAGAGCTGAGCCCTGAAACAGATCCAGAGAGCTGGTGGCCAGCTGAAC
TGGCGAGCCAGATCTACCCCGCATCAAGTGGCCGAGCTGTGCAAGCTTGGCGGCCGCAAGCCG
CTGACGACTCTGTGCCCTTGAAGGAGGAGGCGGAGCTGGAGCTGGCCGAGAGACCGCGAGATCTGGCC
GAGCCCTGACCGGCTGTGACGCCACCCAGAGGAGCTGGTGGCTGAGGATCCAGAGCAGGAGCCAC
GACCACTGGACTTACAGATCTACAGAGGAGCTTCAAGATCTGAGAGAGCTGGAGTACGCCAAGATG
CGCAGCCCGCAGCCAGCCAGCAGCTGAGAGCAGCTGAGCAGGCCCTGAGAGAGTCCCTTGAAGCA
GTGATCTGGGCAAGACCCCAAGTCTGCGCTGCCATCGAGAGAGGAGCTTGGAGAGCCTGTGGAC
GACTACTGGAGGCCACTTGAATCCCGGAGTGGAGTCTGTGAAGCAGCCCGCCGCTGGTGAAGCTTGG
TACAGCTGGAGAGGAGCCATTCATGGCGCCAGGACTTCTAGTGGAGCCGCGCCGCAACCGCGAG
ACCAAGATGGCCAGGCGCTGAGTGGCCAGCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
ACCACAGAGAGAGCCAGAGTGCAGGCTTCCAGTGGCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
ATCCAGTCTACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
ATCGGCCAGCAGCAGATGACAGATCTGGTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
ATCGTGGCGGAGATCTGATCTTACAGTATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GATTTAAAGCTTCCCGGGCTAGCAGGCT

【 図 3 9 】

Figure 39 (シート 1 / 1)

p15RnaseH.opt\_C
TACGTGGACGGCCGCCCAACCGGAGACCAAGATCGGCAAGGCGGGCTACGTGACCGCA
CGCGGGCCGGCAGAAGATCGTGGCTGACCGGAGCCACCAACAGGAGCCAGCCAGCTGC
ACCCGATCCAGCTGGCCCTGACGAGCAGCGGCAAGGAGGATGAACCTGATGACAGCAGC
CATGACCTGCGGATCATCCAGCCGACAGCCGCAAGAGCGAGAGCGAGCTGTGAA
CCAGATCATCGAGCAGCTGATCAAGAGGAGGAGAGGTTACTGAGCTGGTGGCCCGCCCA
CAAGGGCATCGGCGCAACGAGAGATGCAAGAGCTGGTAGAGAGGGATCCCGCAAG
TGCTC

【 図 4 1 】

Figure 41 (シート 1 / 1)

p2Polopt.YM\_C
GTGAGCCACCATGGCCGAGCCATGAGCCAGGCCACCAAGCCCAACATCTGATGAGCCGACGAGAAC
TCAAGGGCCCAAGGCCATCATCAAGTGTCTCACTGGCGCAGGAGGAGCCATGCGCCGCAACTGC
CGCCCGCCGCAAGAGGGCTGTGGAAGTGGCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CCCGGCCCATCTTCTCCGCGAGCGCTGGCCCTCCCAAGGCCAAGCCCGCGAGTTCGCCAAGGAGAAC
CGCCCAACAGCCCAAGCCGAGCTGCGAGCTGCAAGTGGCGGGGACACCCCGCAGCCAGCCCGCCG
AGGCCAGGAGCCCTGAAATCTCCCAAGATCACCTGTGGCAGCAGCCCGTGTGGAGCATCAAGGTG
GGCGGCAGATCAAGAGGCCCTGCTGCGCCGCGCAGCAGCCTGTGGAGGATGAGCGTCG
CCCGCCAAAGTGAAGCCCAAGAGATCGGCGGCATTCGCGGCCTTCAACAGTGGCCGATGACAGC
ATCTGTGATGAGATCTGCGCAAGAGGCCATCGCAGCCTGCTGATGGCCCAACCCCGTGAACATC
ATGGCCGCAACATCTGACCCAGCTGGCCCTGACCTTGAATCTTCCATCGCCGCTTCCAGCCATCGA
CCCGTGAAGCTGAGCCCGCCATGAGCAGCCGCCAAGGTGAAGCAGTGGCCGCTGACGAGAGGATTC
AAGGCCCTGAGCCCGCATCTGCGAGAGATGAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CCTTCAACACACCCCGCTGTGCGCATCAAGAGAGAGGAGAGCCAAAGTGGCCAGCTGGTGGACCTC
CGAGCTGAAGCAGCCAGCCAGGACTTCTGGAGAGTGTAGCTGGGCCATCCCGCAGCCCGCGCCTG
AAGAGAGAGAGAGCGTGGACTGTGGACTGTGGACTGAGCCGCTTCTAGCGTGCCTGGAGAGGAGC
TTCCGCAATGACAGCCGCTTCACTCCGCTCAACAGAGACCCCGGATTCGCTTCAAGATAC
AACCTGCTGCCCAAGGCTGGAAGGCCAGCCGAGCATTTCCAGAGCAGCAGTACCAAGATCTGGAG
CCCTTCCGCGCCGCAACCCCGAGATCTGATCTTACAGGCCCGCTGTAGCGGGCAGCAGCCGCGAG
ATGGCCAGCAGCCCGCCAGATGAGAGGAGCTGAGAGGAGGCGCAAGCTGCGCTGGGCTTCCAGCC
GACAGAGAGCCAGAGAGGCCCGCCCTTCTGCCATCGAGCTGACCCCGCAAGGTGGACCGTGGAC
CCCATCGAGCTGCCGAGAGGAGAGCTGAGCCCTGAAACAGATCCAGAGAGCTGGTGGCCAGCTGAAC
TGGCGAGCCAGATCTACCCCGCATCAAGTGGCCGAGCTGTGCAAGCTTGGCGGCCGCAAGCCG
CTGACGACTCTGTGCCCTTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GAGCCCTGACCGGCTGTGACGCCACCCAGAGGAGCTGGTGGCTGAGGATCCAGAGCAGGAGCCAC
GACCACTGGACTTACAGATCTACAGAGGAGCTTCAAGATCTGAGAGAGCTGGAGTACGCCAAGATG
CGCAGCCCGCAGCCAGCCAGCAGCTGAGAGCAGCTGAGCAGGCCCTGAGAGAGTCCCTTGAAGCA
GTGATCTGGGCAAGACCCCAAGTCTGCGCTGCCATCGAGAGAGGAGCTTGGAGAGCCTGTGGAC
GACTACTGGAGGCCACTTGAATCCCGGAGTGGAGTCTGTGAAGCAGCCCGCCGCTGGTGAAGCTTGG
TACAGCTGGAGAGGAGCCATTCATGGCGCCAGGACTTCTAGTGGAGCCGCGCCGCAACCGCGAG
ACCAAGATGGCCAGGCGCTGAGTGGCCAGCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
ACCACAGAGAGAGCCAGAGTGCAGGCTTCCAGTGGCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
ATCCAGTCTACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
ATCGGCCAGCAGCAGATGACAGATCTGGTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
ATCGTGGCGGAGATCTGATCTTACAGTATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GATTTAAAGCTTCCCGGGCTAGCAGGCT

【 図 4 2 】

Figure 42  
(シート 1 / 1)

p2Polopt\_C
GCCACCATGCGGCGCCATGAGCCAGCCACAGCCGGAACATCTCTGAGTCAGCGCGCAACTTCAAG
GSCCCCAAGCGCATATCAAAATGCTTCACTTCGCGCAAGAGGCGCCACATTCGGCCCACTGCCCCG

【 図 4 3 】

Figure 43  
(シート 1 / 1)

p2PolTatRevNef.opt\_C
GTGCGCCGCACCAATGGAGCCCGTGGACCCCAACTGGAGCCCTGGAACCCGCCCGCCAGCCGCCAAC
ACGGCCGGCAACAAGTGCCTCTCAGAGCACTGGACGTCACACCTGCCTGGATGGTTCAGACCAAGGCG

【 図 4 4 】

Figure 44  
(シート 1 / 1)

p2PolTatRevNef.opt.native\_C
GCCACCATGCGGCGCCATGAGCCAGCCACAGCCGGAACATCTCTGAGTCAGCGCGCAACTTCAAG
GSCCCCAAGCGCATATCAAAATGCTTCACTTCGCGCAAGAGGCGCCACATTCGGCCCACTGCCCCG

【 図 4 5 】

Figure 45  
(シート 1 / 1)

p2PolTatRevNef.opt\_C
GTGCGCCGCACCAATGGAGCCCGTGGACCCCAACTGGAGCCCTGGAACCCGCCCGCCAGCCGCCAAC
ACGGCCGGCAACAAGTGCCTCTCAGAGCACTGGACGTCACACCTGCCTGGATGGTTCAGACCAAGGCG







【 図 5 9 】

FIGURE 59 (配列番号 62)

atgagagtgatggggacatgagaagaattgcaacaatggtggaatggggcatcttaggc
ttctggatgctaatgatttgcacagcaggacctgtgggtcacagctcctactgggggta
cctgtgggagagaagcaaaactactctatcttctgtcactcagatgctaagaacatagag
acagaagtgcaataatgtctccactcactagctgtggttaccocacagccccaacccaca
gaaaatgtcttgggaaatgcaacaagaaatcttaataatggtgaaaaaataacatggcagat
cagaagcaaggagataaactcagtttattgggatacaaaccttaagccatggttgaagtgtg
acccactcctgtctcacttcaactgtgcagaatacaaaatgacaggtataagaactggtt
acaggttaatacaaatgatacaaaatgttcaaatgttcaaggtataagaactgaa
aatgtctctcaatgcaacacacagaaattaaagataagaacaataagagatgacctc
tcttaacaactgatactgacacacttaagaaatgtaaacacttcaatataagata
ataaattgcaatcctcaacaatacaacagctgtccaaaggtcttcttggaccgatt
cotatacattactgtctcactgattgacaggtataaaggtgtaataataagaacctc
aatgggacagcagcattgtaataatgctgcaacagcagcactgtaacaatggaaatgaagca
ctgggtatcaactcaactgcttaaaatggtatgtcagcagaagaaggatataataataga
ctggaanaattgacagagaaatccaacaacatataagatcaactctaaatgaaatgtagag
atataatgtaacagcccacaacataaacaagaaaagtgtgaagtaggacccggacaa
goatctcagcaacaatgagaaataaggaaataagcaagcacatgtaaacatagc
acagatagatggaataaaacttacaacaggttaagaaaaataggagagcattccct
aaataacaataaaatttgaacccactgcaagggggatggaatacaaatgcatagc
tttaattgtagagaggaatttctcactgcaatacactcaaacctgttataatgatac
taacctaaagattggtacatcaacaatacaactcaacgttaccactcaaccccaat
tgcaaaaataacaataatgtaacagctgtggcaaggggtaggacaagaactgtagccct
ccactgcaagaaacatacaactgtagatcaaacatcaacaggaatacttggacacgtg
ggggatctcaacaacaacaacgacacagagagagactccagactggagggagagat
atgagggataaacctggagagatgcaatacaataaataaagtggtgaaatgaagcattg
ggaatgcaacccactaaagcaaaatgaaggtggtcggagaaataaagaacagcagtgga
atagagctgtgtcttgggtcttgggacagcaggaagcaactatggcgagagcgtca
ataacgctgcaggtcagggcccagcaactggtgcttggatagtgcaacagcaagaana
ttgtgaaggtcattagggcccagcagactatgctgaacactcaacgtctggggcaatga
cagctccagcggagctctggctgataagaaatgatacaagatacaacagcactgaag
atftggggctgtctggagcaactcctgcaacactcgtctgcttggaaactccagttg
agtaataaactggaagcaatattgggatacaactcactgtagctgagtggtataga
atataaatacaacagaaacaaatcaggtgctggaagactgcaaacacagcagaa
aaagatgaaanaagatttattgaaatggcaaacggtggaatacttggaaatggttga
atatacaactgctggtgataaataaataatcaaatgacttaggagggctgtagaggt
taagaataaatttggctgctcactcactagatgaaatagattaggcagggactcaactc
tgtcattcagaccctaccacaagccagcagggactcgaacagcctggagaaatcgaa
gaagaaggtgagagcaagaacagagacactcaatagctgtgtagagcagctctgctg
ctgctgggacgattgcgaggtgctgctcctcagctaccaccgctgtagagactc
atataatgacagtagggcaggtgaaactcctgggacacagcagctcaggggactca
agggggtggagactccttaagtctcggaaagctgctgcagatattgggtctagagcta
aaaaaggtgctatagtcogctgatacactgcaactgaaatgacagtagctgaaagaa
agatataagaattgtagaagaattttagtagactcctcaacatcctaggagaaata
agcaggggttgaagcagcttgcctataa

【 図 6 0 】

FIGURE 60 (配列番号 63)

atgagagcagggggactgagaatctgacacactggtggaatggggcatcttaggc
tttggatgctaatgatttgcacagcaggacctgtgggtcacagctcactacagcgggta
cctgtgggagagaagcaaaactactctatcttctgtcactcagatgctaagaacatagag
aaagaagtgcaataatgtctgggctacacatgctgtgttaccocacagccccaaccca
gaagtgttctgggcaatgtaacagaanaatttcaactgtgaaanaatgacatggtggat
cagatgcaaggaagataaactcagtttattgggatacaaaccttaagccatggttgaagtgtg
acccactcctgtgctcacttcaaacgtcaaaatgcaactgttaactacaataactcct
aaagacatgaaaaatgtctcttctatgtaaccacagaanaatgaagataagaaaaagaa
gaaaatgcaacttcttataagactgatactgacacctaataataggagaagatggaat
atcaacaactatagataataaattgtaatacctgcaactcaacacagcctgcaaaa
gctctcttgaacccactcactaactatattgtgctccagctggtttagcgcctcaaaa
tgaataataagaanaatcaatgggaataggaccattgagataatgcaagcagcaaatgt
acacatggaattaaagcagtggttcaactcaactactggttaattggtagctagcagaa
gaagagataaataatgatactgaaacttgcacaacacatgtaacaacataatagtagcat
cttaagtaactataagataataatgtaacaacactggaataatacaagaaagagtggtg
gaataggacagcagacagcactctatgcaacagggagacataataggagataaaagaaa
gcacattgtaacttagtaaaaatgaatggaatcaacttacaaggtgaaatcaaaa
tacaagaactctccctatagtagcagggataaaaattgcccacactcagagggggac
tagaaaattactacaactagcttaattgtagggagagaaatttctcattgcaatacaaca
gacctgttaataatgatacagactgaatgtaactgcaactaattgtaactgactccta
aatcagagcgcaactcaactcactcgaagaataaacaacataatgcaactggcggcag
gttaggcagcaatgtagccctccactgcaaggaacataactatgatacaacttctcaga
cttaggactactatacaactgttagggagataataataactgaaacagagacatcaga
cctggaggagagacatgagggaacattggagaaatgaatataaatacaaggtggtg
gaaatcaacactaggtagtagccactgctcacaagaagagaggtgggagagagaa
aaagagcagtaggaataggagcgtggtccttgggtcttgggacagcaggaagcact
atgggcccagcactcaataacgctgaacgctacagcccaagaacatattgctggtataatg
caacagaaatatttgcagggctatagggcgcacaacagcactgctgcaactcagc
gtctgggcaataagcagctccagcagagctcctgggcaatagagagatacctcagact
caacagctcctaggactggggctgcttggaaactcactgcaacacttaattgctgctt
tggaaactagttggagtaataaacactcaaaagtatatttgggatacaactgacctggatg
cagtggttagggaaattagtaataatacaacacactgcaacactcagctggatg
caagcagcaggaagaataatcaaggttctactagacttggcagcagctgggaactcgtg
tggaaatggtttagcaatacaaaattggctgtggtatataaaaattcctaataatgtagt
gagggcttagtaggttaagaataaatttggctgctcctctagtaataatagattagg
cagggataactccctgtcattgcaacacttaccocacactcagcagccagccagcagc
ctcggaggaatcgaaagaagaggtggagcaagaacagcagcagcactcctgtagattg
agcggaattctgcaactgctgggacgactcagcaagcctgctgctcctgctacac
cagtagtagaactcctaattttagtagtagagcaggtgaaactctgggacagcagtagt
ctcaggggactcagaggggggtggggaaccttaagtatttgggaggtctgtagcaat
tggggtctagagtt.aaaaagaggtgctataactcctgtagactgataatagcaatagca
gctgaagaaacagataggattctagataatcaacaacactttagtaggtagtccgcaac
gtacctagaagaataagacagggcttgaagcagctttagcaataa

【 図 6 1 】

FIGURE 61 (配列番号 64)

atgagagtgaggggactgaggaattggcaacaatggtggaatggggcatcttaggc
tttggatgctaatgatttgcacagcaggacctgtgggtcacagctcctactgggggta
cctgtgggagagaagcaaaactactctatcttctgtcactcagatgctaagaacatagag
agagagaagtgcaataatgtctgggctacacatgctgtgtgcccacagccccaaccccg
caagaanaatttgggaaatgtaacagaaatattcaacatggtgaaanaatgatatggtg
gacagatgcaatgagatataatgaaatggcaaacggtggaatacttggaaatggttga
tggaccacactcctgctcacttagaggtgtaataagcttaatacactcaaatgaaatgaca
aatgctcttcaatgcaacacagcagcaagagataagaacaagagaggtgctgcaatt
tcttagactgataatgtaacacttaataagaaatacaaatgaaatccagaagatagata
ttataaagttgcaatacactcagacttaaacacagcctcctaaggtcactttagcaact
atcctatacactactgactcagctggttattgcaactcctaaggtgtaataataagaca
ttcaatgggacagccactgcaacttaattgacagcagctcctaaggtcactttagcaact
ccagtagtacaactcaactactattagcttagcttagcagaagaagagataaactat
agactgaaatctgcaacaactgcaaaaataataatgatacacttaataaactgta
gaaattggtgtagcagcagcccaactaaatacaagaaaagataaagataggaccgggga
caactctctgcaacaataatgcaataatgagaaaataagacaagcaacttagcaactggt
agtagagagagatggaacaaacttcaacagaggtggaanaaattagcaagcacttcc
ctataaaaacaataaagtttagaacctcctcagggggagcttagaataactacaact
agcttctaaattgtagggagaaatttcttattgcaactcactcagcctgtttaaagtaca
taactcaactacagagagatgtaatacaactcaactcactccctcagagataaaga
caaatataaacatgctggcggagagtaggacagcactgtagctcctccactgcaagga
aacatcaactgtaaaatacaatacagagatcactatagtgctgtgagggagaaagc
aatgactcagacaacaactcagatattcgaagcctggagggagagatagaggaagcaat
cggagaaatgaattataaataataaggtggaanaatgaagcattgggaaatagacc
actggggcaaaaaggagaggtgtagggagagaaaagagcagctgggaacttagagactag
ttccttgggtcttgggacagcaggaagcaactatggcggcggcctcaataacgctgagc
gtacagggcagacaaactgtgctggtatagtgcaacagcaaaagcagctgggacttagg
atagagcgcacacagatattgtaacactcagctgctggggcattaaagcagctcaagaca
agagctctggcttagaagaatgactcaaaagatacaacagctccttagggcttggggctgc
tctggaaaactcactgcaacactgctgcttggaaactccagttggagtaataaact
gtaacagatattgggatacaactgacctggatgcagtggttagggaaatagtaataatca
acaacaacatacaactgcttggagactgcaaacacagcaggaacaaataagaaagaa
gattatagctctggcagctggaatatttgggaaattggttcaactcaacaagctgg
ctgtggtaacataaaataatcaataatgtagtagaggagctgtagagctbaagaaat
ttgtgtgctctgtgattaaatagagtaggaggggttctcaactatgctcttgcag
accctatccaagcccgagggcccagcagctcggaaagatcgaagaagaaggtgtaga
gagcagagacagacagactcgtgattgtagcaagcttcttggcactcctggcagc
gatcagagagcctgtgctcactgaccacagcttagagactctcattgattgca
acagagagcgtggaactctgggacagcagctcaggggtgtagaggggggtggaa
gccccttaagtattcaggaactgtgctgagatttggggctggaactcaaaaagctgct
gttagctgctgtagaccgttagcaatcgtgacagtaggaagaaacagatagattataga
tttagcaaaagatttgcagactctccgaactcaacaagaatcagcagggcctt
gaaacagcttgcctataa

【 図 6 2 】

FIGURE 62 (配列番号 65)

atgagagtgaggggactgaggaattggcaacaatggtggaatggggcatcttaggc
tttggatgctaatgatttgcacagcaggacctgtgggtcacagctcactacagcgggta
cctgtgggagagaagcaaaactactctatcttctgtcactcagatgctaagaacatagag
aaagaagtgcaataatgtctgggctacacatgctgtgttaccocacagccccaaccca
gaagtgttctgggcaatgtaacagaanaatttcaactgtgaaanaatgacatggtggat
cagatgcaaggaagataaactcagtttattgggatacaaaccttaagccatggttgaagtgtg
acccactcctgtgctcacttcaaacgtcaaaatgcaactgttaactacaataactcct
aaagacatgaaaaatgtctcttctatgtaaccacagaanaatgaagataagaaaaagaa
gaaaatgcaacttcttataagactgatactgacacctaataataggagaagatggaat
atcaacaactatagataataaattgtaatacctgcaactcaacacagcctgcaaaa
gctctcttgaacccactcactaactatattgtgctccagctggtttagcgcctcaaaa
tgaataataagaanaatcaatgggaataggaccattgagataatgcaagcagcaaatgt
acacatggaattaaagcagtggttcaactcaactactggttaattggtagctagcagaa
gaagagataaataatgatactgaaacttgcacaacacatgtaacaacataatagtagcat
cttaagtaactataagataataatgtaacaacactggaataatacaagaaagagtggtg
gaataggacagcagacagcactctatgcaacagggagacataataggagataaaagaaa
gcacattgtaacttagtaaaaatgaatggaatcaacttacaaggtgaaatcaaaa
tacaagaactctccctatagtagcagggataaaaattgcccacactcagagggggac
tagaaaattactacaactagcttaattgtagggagagaaatttctcattgcaatacaaca
gacctgttaataatgatacagactgaatgtaactgcaactaattgtaactgactccta
aatcagagcgcaactcaactcactcgaagaataaacaacataatgcaactggcggcag
gttaggcagcaatgtagccctccactgcaaggaacataactatgatacaacttctcaga
ccttaggactactatacaactgttagggagataataataactgaaacagagacatcaga
cctggagactccttaagtctcggaaagctgctgcagatattgggtctagagcta
aaaaaggtgctatagtcogctgatacactgcaactgaaatgacagtagctgaaagaa
agatataagaattgtagaagaattttagtagactcctcaacatcctaggagaaata
agcaggggttgaagcagcttgcctataa

【 図 6 3 】

FIGURE 63 (配列番号66)

```
gtcgacaagagcagaagacagtgagcaatgagagtgacggggactgaggaattaccocac
aatgggtgatatgggtcatcttagctttagataaataataaattgaggagagagtgagg
tcacagctcttatggggtaacttggctggaagaggagaaataactcttatgttgatc
cagatgctaaagcatatgataaagaatgcaataaagctggccacacatgctgtgac
ccacagatcccacccacaagattgggtttggaaaaatgtaacagaaaaatgtaaatgt
ggaaaaatgacatgggtggatgacatgagcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaat
taaaacctgtgtaaagtgcacccactgtgctcaacttaaatgtgaagcaaaatgta
ctgttaataactcaacacttaattgtagatagctgtgcaacacttggttatagatata
atataaccacagaaactaagagataaagaaaagcaaggtgtaactgttttataagctt
ataataacactgtataatgcaacacttagtgaacacttggttatagatataaataat
gtatcaactcagcaatacaacagactgtccaaaggcaacttggaccaacttccatcaac
atatactgtccacgctggatgtggatctcaaaagttaataataaagcaactccaatggaa
cagggcaatgcaatgttagcagctacaactgtgcaacactgcaatgcaatgcaatgcaat
caactcaactctactgttaattgtagcaagactgtaacactgcaatgcaatgcaatgcaat
acctgcaaacactgcaaacactgcaaacactgcaaacactgcaaacactgcaaacactgca
gtacaagaccggcaataatacaagcaaaatgaaagtaggcaaacactgcaaacactgca
atgcaaacagagacataatagggaataaaagcaaaactgcaaacactgcaaacactgca
aaatggaatgaaacttaaaaagggttagtataaaatagggaacacacttccataaaaa
caataaaattgcaacacactcaggaggagactgaaataatcaactgcaatgttcaatt
tagagagaatattttttatgtaatacaactcaactgttcaatagctgtataatacaac
cagaccctgtttaaataatgtaactgcaactcaactcactccatgcaataaaaaaaca
ttgtaaacactgtggcgggggttagcagcaataatagccctccactgcaagaaaca
taacatgtaactcaagttagcagcaacttctgtgctgtaggagaaacacaacca
actcaactgagatatacagcaaaagaggaaataggaggcaactgggaagtgaat
cataaaatacaaaagttagaanaatgaagcctgggaaatagccccactatgcaaaa
ggagagtggtgagagagaaaaagacagtgacactagagactgttccctgggtctt
tgggagcagcaggaagcactatggcgacgctcaataacgctgacggcagcagccagac
agttgtctctggaaatagtgcaacagcaaaagcaacttgcctgagagctatagagcgaac
agcaatagttgcacactcaagtttggggcatataaacagctcccaagcaagactgtgggta
tagaaagatactaaagatacaagctccacttagaaattggggctgcttggaaaactca
ctgcaacactgctgtgctgaaactcaactggagataaaaaactgagaaagattatt
gggaaaaactgacctggatgagctggatgagaaatagtaataaacagactaataat
acaactcttgaagctgcacaaactccagcaagaaacagaaataaaaagattattagct
tggcagttggaaaaattctgtggattggtttgcagactcnaagttgctgtggtaacata
gaatattcaatgatagtagagagctgtgacacttggaaataaatttctgtgcttcc
ctatagtgaaatagagttagcagggatacctggcttggcttgcacacttgcacac
accocagaaactcagcagctcaggaagactcaggaaggaaggtggagagcaagcagag
acagatcgatcgattagtaaacagatttagcaacttgcacacttgcagcaacttggagc
tctgcttctcagctaccacagcttagagaaactcaatgtagtgcagcaaaagcaggg
aactctgggacacaacagctcaggggacacagagggggggaaaactccttaagta
ctgggaagtctgctcaatattggggtctgacaaactaaaagagtgctatagtttgc
tatcaactagcaatagcagtagtaaggaacagataggatataagaataatacaaga
attggagagctatccgcaaacacactagaagaaataagcagggcttgaagcagcttgc
ataaactcagaagaacaaagggcgaatt
```

【 図 6 4 】

FIGURE 64 (配列番号67)

```
gtcgacaagagcagaagacagtgagcaatgagagtgacggggactgaggaattaccocac
aatgggtgatatgggtcatcttagctttagataaataataaattgaggagagagtgagg
tcacagctcttatggggtaacttggctggaagaggagaaataactcttatgttgatc
cagatgctaaagcatatgataaagaatgcaataaagctggccacacatgctgtgac
ccacagatcccacccacaagattgggtttggaaaaatgtaacagaaaaatgtaaatgt
ggaaaaatgacatgggtggatgacatgagcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaat
taaaacctgtgtaaagtgcacccactgtgctcaacttaaatgtgaagcaaaatgta
ctgttaataactcaacacttaattgtagatagctgtgcaacacttggttatagatata
atataaccacagaaactaagagataaagaaaagcaaggtgtaactgttttataagctt
ataataacactgtataatgcaacacttagtgaacacttggttatagatataaataat
gtatcaactcagcaatacaacagactgtccaaaggcaacttggaccaacttccatcaac
atatactgtccacgctggatgtggatctcaaaagttaataataaagcaactccaatggaa
cagggcaatgcaatgttagcagctacaactgtgcaacactgcaatgcaatgcaatgcaat
caactcaactctactgttaattgtagcaagactgtaacactgcaatgcaatgcaatgcaat
acctgcaaacactgcaaacactgcaaacactgcaaacactgcaaacactgcaaacactgca
gtacaagaccggcaataatacaagcaaaatgaaagtaggcaaacactgcaaacactgca
atgcaaacagagacataatagggaataaaagcaaaactgcaaacactgcaaacactgca
aaatggaatgaaacttaaaaagggttagtataaaatagggaacacacttccataaaaa
caataaaattgcaacacactcaggaggagactgaaataatcaactgcaatgttcaatt
tagagagaatattttttatgtaatacaactcaactgttcaatagctgtataatacaac
cagaccctgtttaaataatgtaactgcaactcaactcactccatgcaataaaaaaaca
ttgtaaacactgtggcgggggttagcagcaataatagccctccactgcaagaaaca
taacatgtaactcaagttagcagcaacttctgtgctgtaggagaaacacaacca
actcaactgagatatacagcaaaagaggaaataggaggcaactgggaagtgaat
cataaaatacaaaagttagaanaatgaagcctgggaaatagccccactatgcaaaa
ggagagtggtgagagagaaaaagacagtgacactagagactgttccctgggtctt
tgggagcagcaggaagcactatggcgacgctcaataacgctgacggcagcagccagac
agttgtctctggaaatagtgcaacagcaaaagcaacttgcctgagagctatagagcgaac
agcaatagttgcacactcaagtttggggcatataaacagctcccaagcaagactgtgggta
tagaaagatactaaagatacaagctccacttagaaattggggctgcttggaaaactca
ctgcaacactgctgtgctgaaactcaactggagataaaaaactgagaaagattatt
gggaaaaactgacctggatgagctggatgagaaatagtaataaacagactaataat
acaactcttgaagctgcacaaactccagcaagaaacagaaataaaaagattattagct
tggcagttggaaaaattctgtggattggtttgcagactcnaagttgctgtggtaacata
gaatattcaatgatagtagagagctgtgacacttggaaataaatttctgtgcttcc
ctatagtgaaatagagttagcagggatacctggcttggcttgcacacttgcacac
accocagaaactcagcagctcaggaagactcaggaaggaaggtggagagcaagcagag
acagatcgatcgattagtaaacagatttagcaacttgcacacttgcagcaacttggagc
tctgcttctcagctaccacagcttagagaaactcaatgtagtgcagcaaaagcaggg
aactctgggacacaacagctcaggggacacagagggggggaaaactccttaagta
ctgggaagtctgctcaatattggggtctgacaaactaaaagagtgctatagtttgc
tatcaactagcaatagcagtagtaaggaacagataggatataagaataatacaaga
attggagagctatccgcaaacacactagaagaaataagcagggcttgaagcagcttgc
ataaactcagaagaacaaagggcgaatt
```

【 図 6 5 】

FIGURE 65 (配列番号68)

```
atgagagtgacggggatactgaggaatataccaaatggtggataggggtaacttaggct
tttggataaatacaatgtagggaggaacatggtgggcaactcttatgggtgcaact
gtaggagagagagcaactctctctcttggctgcaactcagctcaagcaatgtagcaaa
gaagtgatataattgctgggcaacacactgctgctggcgaacactgcaactgcaacac
ttgggtttggaaaaattgaacagaaatattaaattgtaggaaatgcaatgtaggctcag
atgcaatgagaacataactgaatttgggataagcaactgcaaacactgtagaaattgac
ccactctgtgctcaacttaattgtaaaagcaatgttaactgttaaacactatgcaaat
actgttaatactcaacacttaattgtagctgtagcaataatgagaaatgctcttctt
aataataccacagaaactaaagagataaagaaaaagcaagttgtagcactttttaggctt
gataatgtaacatttgacaattgcaactctgtagctttagttagtaataaattgtaatac
gcaatacaacagcctgcaaacaggctcttggcacaacttcttatcattatgtagtgc
ccagctggatagctgtagttagcagggatacctgtagcacttggcttgcacactgca
agtaattgtagcagcagtaacatgtaacacatggaattagcagctggatgtaacactca
ctgttaaatggtgtagctgagagagagataataatcaactgtagcactcgaacacag
aatgcaaaaaataatagtagcacttgaatagctgtagaaatgtagttagcaacagcc
ggcaataatacaagacaaagataaaggatagcagcagcagcaaacactctgcaacagga
gacataataggagacataaaggaagcaactgtaaacattgtgagcaggaatggaattgaa
actttaaaaagggttagtataaaaaatagggaacacttctcaataaaacaataaaat
ggcaccacactcaggaagggactgagaataatacaactgcaactgttttaattgtagagagaa
ttttttttagtaataactcaactgctttttaaattgtagttagtaatacaactcagccgtt
aatagtaataatggttcaaacactcacaactcocaatgcaagaaataaaaactaattgaa
tggcaggggggttagcagagcaataatagccctccactcagcagaaacaataactgtaac
caagtatcagcagactccttggtagctgtaggagaaacataaacactcaacagag
atatcagaccagaagggaaatgtagggacaattggagaagtgaaatataaataat
aaagtgtgagaaatgaagcattgaaatgagcccaactgcaaaaagagagagtggtg
gagagaaaaaaagacagctgcaacttagagactatgttccctgggttcttgggagcagca
ggaagcactatgggcagcagctcaataacgctgagccacagcagcagcagcttggctt
ggaatagtgcaacagcaaaagcaatttggtagagcattagagggcgaacagcattgctc
caactcagactctggggcaatgaacagctcgaagcagcagcttggcttagaaagatac
ctaaaggaatcagcagctcaggaatttggggctgctctggaaaaactcaactgcaacc
gctgtgcttggaaactcaggtggagtagtaaaaactgagaaagatatttgggaaaaatg
aactgtagtagcagtaggagaaattagtaataatacaagcaataatacaaacacttca
gaagtctcgaacaaactcagcaagcaacagaaatgaaagagatttatagcaattggcagcttgg
aaaaactctggaaatgggttagatatacaaaatggcctgtagcaataaaaaatcaata
atagatagtaggagggctgtagagcttggagataaatttctgtgcttcttatagtgaa
agagttaggcagggataactcaacttggctttagagtaaatcttccagcccaagggaa
ctcgaacagctcaggaagactcagagagagctggagagcagacagagacagatcagat
cagtagtagtagagagattctagcacttgcctgggcaacttggagagcctggtgcttctc
agctaccacagcttagagactcctaattgtagtgcagcagagcagcagcaactctggga
cagtagcagctcagggcagctcaataacgcttggagaaactcttaagattctgggaagtct
gccaataattgggtttagaactcaaaaagagcttatagctctgctgtagactcaagca
attgtagtagctggaagaaacagatagaaattatagatataatacaagaattggagagct
atccgcaataatcctcaagaataaagcagggcttgaacacagcttggctataaa
```

【 図 6 6 】

FIGURE 66 (配列番号69)

```
atgagagtgacggggatactgaggaatataccaaatggtggataggggtaacttaggct
tttggataaatacaatgtagggaggaacatggtgggcaactcttatgggtgcaact
gtaggagagagagcaactctctctcttggctgcaactcagctcaagcaatgtagcaaa
gaagtgatataattgctgggcaacacactgctgctggcgaacactgcaactgcaacac
ttgggtttggaaaaattgaacagaaatattaaattgtaggaaatgcaatgtaggctcag
atgcaatgagaacataactgaatttgggataagcaactgcaaacactgtagaaattgac
ccactctgtgctcaacttaattgtaaaagcaatgttaactgttaaacactatgcaaat
actgttaatactcaacacttaattgtagctgtagcaataatgagaaatgctcttctt
aataataccacagaaactaaagagataaagaaaaagcaagttgtagcactttttagaact
gataatgtaacatttgacaattgcaactctgtagctttagttagtaataaattgtaatac
gcaatacaacagcctgcaaacaggctcttggcacaacttcttatcattatgtagtgc
ccagctggatagctgtagttagcagggatacctgtagcacttggcttgcacactgca
agtaattgtagcagcagtaacatgtaacacatggaattagcagctggatgtaacactca
ctgttaaatggtgtagctgagagagagataataatcaactgtagcactcgaacacag
aatgcaaaaaataatagtagcacttgaatagctgtagaaatgtagttagcaacagcc
ggcaataatacaagacaaagataaaggatagcagcagcagcaaacactctgcaacagga
gacataataggagacataaaggaagcaactgtaaacattgtgagcaggaatggaattgaa
actttaaaaagggttagtataaaaaatagggaacacttcccaataaaacaataaaat
ggcaccacactcaggaagggactgagaataatacaactgcaactgttttaattgtagagagaa
ttttttttagtaataactcaactgctttttaaattgtagttagtaatacaactcagccgtt
aatagtaataatggttcaaacactcacaactcocaatgcaagaaataaaaactaattgaa
tggcaggggggttagcagagcaataatagccctccactcagcagaaacaataactgtaac
caagtatcagcagactccttggtagctgtaggagaaacataaacactcaacagag
atatcagaccagaagggaaatgtagggacaattggagaagtgaaatataaataat
aaagtgtgagaaatgaagcattgaaatgagcccaactgcaaaaagagagagtggtg
gagagaaaaaaagacagctgcaacttagagactatgttccctgggttcttgggagcagca
ggaagcactatgggcagcagctcaataacgctgagccacagcagcagcagcttggctt
ggaatagtgcaacagcaaaagcaatttggtagagcattagagggcgaacagcattgctc
caactcagactctggggcaatgaacagctcgaagcagcagcttggcttagaaagatac
ctaaaggaatcagcagctcaggaatttggggctgctctggaaaaactcaactgcaacc
gctgtgcttggaaactcaggtggagtagtaaaaactgagaaagatatttgggaaaaatg
aactgtagtagcagtaggagaaattagtaataatacaagcaataatacaaacacttca
gaagtctcgaacaaactcagcaagcaacagaaatgaaagagatttatagcaattggcagcttgg
aaaaactctggaaatgggttagatatacaaaatggcctgtagcaataaaaaatcaata
atagatagtaggagggctgtagagcttggagataaatttctgtgcttcttatagtgaa
agagttaggcagggataactcaacttggctttagagtaaatcttccagcccaagggaa
ctcgaacagctcaggaagactcagagagagctggagagcagacagagacagatcagat
cagtagtagtagagagattctagcacttgcctgggcaacttggagagcctggtgcttctc
agctaccacagcttagagactcctaattgtagtgcagcagagcagcagcaactctggga
cagtagcagctcagggcagctcaataacgcttggagaaactcttaagattctgggaagtct
gccaataattgggtttagaactcaaaaagagcttatagctctgctgtagactcaagca
attgtagtagctggaagaaacagatagaaattatagatataatacaagaattggagagct
atccgcaataatcctcaagaataaagcagggcttgaacacagcttggctataaa
```





【 図 7 5 】

FIGURE 75 ( 配列番号 78 )

```

gtgcaagagcgaagcagtgaggagggatgaggggacagaggaatbtggcaaca
tggtggatbtggggcactttaggtctttaggtgtaaatgttgaatgttgggaaac
tbtgggtccagctgtatbtgggttaccctgttgggaagcaataactactctatcc
tbtgtcacaagtccaaagcatttggggggggatgcaaaatgttgggttccacactg
tbtgtaccacagcccccaagcaaaaatgttgggaaatgttaaacgaaatatttt
aatcttgggaaatgcaatgggtgcaaaatgcaagggaataaacttgggttgggt
caagcctaaagccatggttaagttaccacactctctgtgcaacttgaatgtcaggg
gttaaggtcccaataatgttagtcccaactgttagttagttaaaccacaatgatgaa
ataaaaaatgtcttccaatgcaaccacagaataaaagcaagagcaacaagagat
gcaacttttatagctgcatatgtaccactaaataggaacaccctgaggagcaat
tctagtggagaagtagatataaaatgttaatacctcaaccttaacaaagcctgtcca
aaggtctcttttgcaacaaatcctcactacatatttgcactccagctgttggattcta
aagtgtaataaagacattcattgggacagggcaatgctcaatgttcgtagcagtaaa
tgtcacactggaataaacccgtgtgtactcaactactctgttaaatgttagcttagca
gaagagagataaataatgttagtcaaaaactgcaaaaacactgtaaaaataataatgta
cagcttaataaactgttagaataatgttggcagacagccggcaataatacaagaaaagt
gtgaaatgagcagcagcaaacattcctatgcaaaccaactgcaataataggagacaataa
caagcacttgttaacattctgaagaaagttggaatgaaacttcaaatgggttagttaa
aaatggagggagcttctcactaaaaaactagaatttagcaactccagagggagac
ctagaatcaacaacacagcttgaatttggtagagagaaatttctctatgtgaaataca
caacttttaaatagctacacatctcaacaactgcaaaaactgacagaaatcaaca
accatcacactccccgcaaaataagcaaatatacaaatgtggcaggggttaggcagg
gcaactgtatgccctccccctggcaggaacataaacatgtaaatcaaatattacaggaata
ctatagtactgttaggggacacaaactcctatgcaaacctggcagcaggaatctcagact
ggagggagagataggaagcaacttggagaatgaaatctcaaaactaaagctgttagaa
atlaagccttgggaatgcaacccactgaaagaaaagaagaggggtgtggagagaaa
ggagcagtaggaataggagctgcaacttgggtcttggggcagcagggagcactatg
ggcgcagctccaatcagctgagctgacagcagcagcaatgttggctggcactagtgca
cagcaaaagcaatttctgagagctatagagcagcagcagcactatgtgcaactcagctc
tggggcattgaagcagctccagagagggctctgctctagaaaatcactcagagatcaa
cagctcctaggacttggggctgctcctggaaactcctcggcaacactcctgctggctgg
aactcaagttggagtaataaactctcaactgataattgggacaactctgactgggtgg
tgggttaggaaataataatcaacaacacacatcccgcttggctgaaataatcgca
actcagcagcaaaaatggaaagatttatacagactggcaagctggcaaaactctgtg
aattggtttagcaaacacagggctggtgctatataaaataatcaactgatagtagga
ggcttgaatggttaagataaatttctgctgtctactctcaatgaacacagacttaggcag
ggatacactcctgcttcaagcacttaccocaaacccgggggcccagcagggctc
ggagagatcgaagagaggttggagagcagcagtagagatcacttggatcactctgagtagc
ggattctctcaactggttggggcagctcggggaacctgtgctcctcagctaccacaga
ttagagagactcattatgttgcagcaagcagctgtggactcctggggcagcaggggtgg
gaaaccttaatacttaggaagcttctggcagcttggggctggggcaacanaaaagat
gctatgtctgtgctgcaatgcaacagcagcttagctgagggaaagcagatgagataa
gaattcacaagaagaatttggtaggctctcggcaacaacttagaagaataagcactggc
tttaagcagcttgcataactcttagaagaacaaggggcaattcc

```

【 図 7 6 】

FIGURE 76 ( 配列番号 79 )

```

gtgcaagagcgaagcagtgaggagggatgaggggacagaggaatbtggcaac
aatggtggatbtggggcactttaggtctttaggtgtaaatgttgaatgttgggaaac
acttgggttcaactgtatbtgggttaccctgttgggaagcaataactactctatcc
tctgtcacaagtccaaagcatttggggggggatgcaaaaatgttgggttccacactg
ctgtgtaccacagcccccaagcaaaaatgttgggaaatgttaaacgaaatatttt
taaatgttgggaaatgcaatgggttgggtcaaatgctcgtgaggaataaacactgttggg
atcaaaagcctaaagcctgtgaaaatgtgaaatgtgaaactcctgtgtaagtacag
gggttaagcttcaacaataatgttagtggcaacaaatgttagttaaaccacaagaagt
aataaaaaatgtcttccaatgcaaccacagaataaaagcaagagcacaagaagt
atgcaacttttatagctgcatatgtaccactaaataggaacaccctgaggagcaat
attctagtggagaatagatataaaatgttaatacctcaaccttaacaaagcctgtccc
caaggtctcttttgcaacaaatcctcactacatatttgcactccagctgttggattcta
taagtgtaataaagacattcattgggacagggcaatgctcaatgttcgtagcagtaaa
atgtcacactggaataaacccgtgtgtactcaactactctgttaaatgttagcttagca
cagaaagagataaataatgttagctgaaactgcaaaaactgcaaaaactgcaaaaataatg
tagacttaataaactgttagaataatgttggcagacagccggcaataatacaagaaa
gttagaagtaggacagcagcaaacattctcctgcaaacagggtgaactaataggagacaata
gacaagcaacttgaacttactgaagataaatggaatgaaacttcaaatgggttagttaa
aaaaatggagggcttctcactaaaaaactagaatttagcaactccagagggaggt
aactaaataatacaacacagccttgaatttggtagagagaaatttctctatgtgaaataca
cacaactatttaaatagctacacatctcaacaactgcaaaaactgacagaaatcaaca
caactcacaactccccgcaaaataagcaaatatacaaatgtggcaggggttaggcagg
gcaactgtatgccctccccctggcaggaacataaacatgtaaatcaaatattacaggaata
ctatagtactgttaggggacacaaactcctatgcaaacctggcagcaggaatctcagact
ggagggagagataggaagcaacttggagaatgaaatctcaaaactaaagctgttagaa
atlaagccttgggaatgcaacccactgaaagaaaagaagaggggtgtggagagaaa
ggagcagtaggaataggagctgcaacttgggtcttggggcagcagggagcactatg
ggcgcagctccaatcagctgagctgacagcagcagcaatgttggctggcactagtgca
cagcaaaagcaatttctgagagctatagagcagcagcagcactatgtgcaactcagctc
tggggcattgaagcagctccagagagggctctgctctagaaaatcactcagagatcaa
cagctcctaggacttggggctgctcctggaaactcctcggcaacactcctgctggctgg
aactcaagttggagtaataaactctcaactgataattgggacaactctgactgggtgg
tgggttaggaaataataatcaacaacacacatcccgcttggctgaaataatcgca
actcagcagcaaaaatggaaagatttatacagactggcaagctggcaaaactctgtg
aattggtttagcaaacacagggctggtgctatataaaataatcaactgatagtagga
ggcttgaatggttaagataaatttctgctgtctactctcaatgaacacagacttaggcag
ggatacactcctgcttcaagcacttaccocaaacccgggggcccagcagggctc
ggagagatcgaagagaggttggagagcagcagtagagatcacttggatcactctgagtagc
ggattctctcaactggttggggcagctcggggaacctgtgctcctcagctaccacaga
ttagagagactcattatgttgcagcaagcagctgtggactcctggggcagcaggggtgg
gaaaccttaatacttaggaagcttctggcagcttggggctggggcaacanaaaagat
gctatgtctgtgctgcaatgcaacagcagcttagctgagggaaagcagatgagataa
gaattcacaagaagaatttggtaggctctcggcaacaacttagaagaataagcactggc
tttaagcagcttgcataactcttagaagaacaaggggcaattcc

```

【 図 7 7 】

FIGURE 77 ( 配列番号 80 )

```

atgagagtgga tggggatcaa gaggaattgt caacaaatgtt ggatatgggg cactctaggg
tttctgggtg tttatgatgtt aaactgnaatg gggaacttgt ggtgcaacgt ctattatggg
gtactctgtt ggagagaagtg aaactgnaa ctactctggg catcaagatg ctagagcaat
ggagaaagag tggtaaatgt tttggtaaca ctgctctgtg taoccaagga cccaacaoca
caagaataag ttttggaaat tttgcaacaga aattttaaca gtgggaaaa taacatgta
gaccagcgt atgaggaatc aatcagttta tgggatacaa gctcaaaccc atgtgtgaag
ttagccocac tctgtgtcac tttaaatgtt agaaatgaaa cgttactaac taacatgat
aataatgita ctcaacaata tagcataact gaagaaataa aaatgtctc ttcaabata
accacagaaa taagagacaa gaanaagata gaatatgcaact tttttatag actgtgtata
gtaccgctta agggagaaa acttaatttc agttagata gatcaataa ttgaaatcc
tcagcctaaa cagagcctg tccaaggtc ttttttagc caattctcat acattatgt
gtccocgctg gttatgcat actaaatgtt caataatagg actctaaagg acagacaca
lgaataatgt tcagcaactg acagtgtgaa catggaata agocaaatgt tcaactcaa
ctactgttaa atgtagctc agcagagaaa gtagaataaa ttagactcaa aaatagaca
aaatgtcaa aaacataat agtcaactgt aatgaactgt tagaataatg gtgtcaagc
ccaacata atacagaag aagtatgag aatgacagc atagcaacat gaaacactt
ggagaataa taggagact aagcaacga tattgtaaa ttatgtaga ccaatggaa
aaactttac cgagggtgag tgaaaataa aggacacact cctctgataa aacaataaa
tttgaacac cctcaggagg agcttagaa aatacaacac atagcttaa ttttagagc
gaattttct attgcaaac catcaactc tttaatgata catcactgcc taatggtaca
gaagtata caagcaaac atcatabct ccatgcaaga taaaacaact tataatagt
tggcaggggg taggagagc aatgttagct cctccactt caggaacat aacatgtcaa
tcaatata cagaaact atgacctgt gatggagag aagatcaaaa gtaacaactt
acagagatc tcaagcctgc agggggggt atgagaca actggagag tgaatataat
agatataag tggtagaat taacactta ggttagtacc ccaactgagg aaaaaggga
gtgtgggga gagaaaaaa agcagtgga ataggagctg gttcctgtg gttcttggg
cgacagggaa gcaacttgg cggcgctca ataacctga cgttagaccg cagcaaccg
tttctggta tagtgcaaca gcaaaacaa ttgtcaggg ctatagagg gcaacagcat
atgtgcacac tcaagctg ggaaatag cagctcaga caagacact ggtctgtaga
agatacctaa aggatcaaca gttcctaggg ctttggggt gctctgaaa actcaatg
accctgccc tgccttggaa cctcagttg agtaaatgt ctaaacaga tatttggat
aacatgcat ggttagctg ggttagagat actgactact acacagaaac aatatcaag
tctttgaa actcgaana ccagcagaaa caaatgaaa aggatttact agcaatgac
agttagaaa actctgtaa ttggtttat ataacaaat gctctggta tataaaaaa
tcaataata cagaaact atgacctgt gatggagag aagatcaaaa gtaacaagg
atgaactaa aggatcaaca gttcctaggg ctttggggt gctctgaaa actcaatg
aggggaccag acgggtcgg aapatgca gaagaggtt ggcagcaaga ccagacaga
tccgtgagat tagtgaacg atcttaca ctgtctgg agcactgccc gctgctgct
ctctcagct acccaaat gagagctta atattgtct tagcgagagc agtggaaat
ctggagcga acgctcag ggcactac acgggtggg aagctctaa gtactggtga
aacctgtgc tgtatgggg tctggagctg aaaaaggcct ctattatct gttgataca
acagcaatg tagtactgga agaaagact agaatcttg cagaattgt cagaattgt
agagctatcc gtaaacatc tagaagata agcggggct ttagagagc ttgtctata

```

【 図 7 8 】

FIGURE 78 ( 配列番号 81 )

```

ggatcaacta gtaacggccg ccagctgctt gnaattggcc ctccacggg tgcagagag
gagaagacag ttggcaactg atgtccaggg atactggaaa atgtcaaca atgtggaca
tgggcaactc tagcttgg gataataatg actgttaatg tggttggaaa ctbtggctc
acagtttat atgggtacc tgttgaaaa gaagcaaaa ctactotat ctgtgataca
gatgtcaag catatgaaa agaatgcat aatgttggg ctacaactg cgtgtacc
accagaccca acccaaga aatgatttg gaaaatgta cagaaaatt taatgttgg
aaaaatgta tggtagtca gatcctgg gatgtaaca gtttatgga ccaagccta
aalgatagtg aaatgtagt gaaaccca aalgataatg gtaatgca ttagtaga
gaaatgaaa atgtctctt caatgaacc acagacatac aagataaga accggagtg
tatgcaact tttatgact gpatatgta ccaactaat atactaaca cttagggag
tatagatbaa taaatgtaa taactcaac atgcaacag cctgtccaaa gttcttctt
gtaccaactc ctatacatta ttgactcca gctggttat cgaattctaa gtttaatag
aagacttca gttggcggg acaatgcaat aatgtcaga cagtaacaat tcaacatgga
attaagcag tggatacac tcaactctg ttaaatgta gcttagcaga aaagagata
ataatgatc ctaaaactc gaacacat gccaaaacca taatagca totaatgaa
tctatagca tttatgtac agcctggc aatacaaca gaagaaagt aagtagtaga
ccagacaag catctcttg accagagca ataataggag ataaagaaa agcatattgt
aacatagoy aaggtgaat gaatagaact ttcaaaagg taggtagaa atatagaca
cactcctgt gtaaaagaat aagattgca ccaactccg gaggagact gaaatataca
accatgact ttaattgg aggaaatt tttatgca ataacaaaa actgtttaa
aggatcata atacaacca actgtttaa ggtcacaaca gctcacaaga tcaagaagt
aattcaacc tccactgag ataaaacca attataaca tgggcccga tttaggaca
gcaatgtat ctctcctat aaagaaac atacatgta actcaaatc cacagatta
ctgttggctg gtgtaggg agagacaa acacagaaa atgcaacga gactcaga
cctggagag gagatagag gcaaatgg agaatgta tatacaata taagtggta
gaaatlagc catgggaat agcactcct gggcaaaa ggaagtgtt ggaagtaga
aaagagac ttggatag agctgtgt cttggctt ttggcagca aggaagct
atggcgggg cgtcaatac gctgagga cagcocaag aattatgct tggtagtg
caacgaaa gcaatttgt ggggccata gaggccca acatatgt gcaactca
gtctggggca ttaaacgct ccagacaaga gattggcca tcgaagata cetaaggct
caacagctcc taggaattg ggggtgctt gaaaactca tctgcccac ttgtgctc
tggactcca gttggatga tagactgag ggaatattt ggaataact gactggatg
caatggata gaaatag caatacca gacaatat caagctctg tagagatg
caaacccg aggaacaaa tgaanagat ttatggct tagcaatg gcaaatctg
tggagtgtt ttaacatc aaatgtgt tggtagata gaattact aatagtaga
ggagcttga tagttttag aataatctt gotgtgctc cttagtga taagttagg
caggatact cactttgtc gttcagacc cttaaccga accoaagggg accagag
ctcagagaaa togaagaaga agtggagag caagaagag acagactcgt tagatag
agcggatct tagactgct tggagcag cttggagcc tgtccttt cactcaac
caattggag actcaatc gatgtagc agcggggg aaattctgg accoaagggg
tggaaacc ttaaatct ggaagtct gtagactt gggcttgg actcaaaag
agtctatta atctgtga tctatgca atagcagtg ctaagagac aatagagat
atagaattaa taactagct tggtagact actgcaaca taactagag aataagcag
ggctttaga cagctltgca ataacttag actagtaag gcaaatct cagatatac
atcacactgg eggccgc

```

【 図 7 9 】

FIGURE 79 ( 配列番号 82)

atgggtgcga gagcgtcaat attaaagcgg ggaanaattg ataaatggga aaaaattagg
ttaagccag ggggaagaa acattatag ataaacacc tagtatggc aagcaggag

【 図 8 1 】

FIGURE 81 ( 配列番号 84)

atgggtgcga gagcgtcaat attgnaaggg aaaaattag atacatggga aagaattagg
ttaagccag ggggaagaa acctatag ataaacacc tagtatggc aagcaggag

【 図 8 0 】

FIGURE 80 ( 配列番号 83)

atgggtgcga gagcgtcaat attaaagcgg ggaanaattg ataaatggga aaaaattagg
ttaagccag ggggaagaa acattatag ataaacacc tagtatggc aagcaggag

【 図 8 2 】

FIGURE 82 ( 配列番号 85)

atgggtgcga gagcgtcaat attaaagcgg ggaanaattg ataaatggga aaaaattagg
ttaagccag ggggaagaa acctatag ataaacacc tagtatggc aagcaggag

【 図 8 3 】

FIGURE 83 ( 配列番号 86)

atgggtgcga gagcgtcaat attaaagcgg ggaanaattg ataaatggga aaaaattagg
ttaagccag ggggaagaa acattatag ataaacacc tagtatggc aagcaggag

【 図 8 5 】

FIGURE 85 ( 配列番号 88)

atgggtgcga gagcgtcaat attaaagcgg ggaanaattg ataaatggga aaaaattagg
ttaagccag ggggaagaa acattatag ataaacacc tagtatggc aagcaggag

【 図 8 4 】

FIGURE 84 ( 配列番号 87)

atgggtgcga gagcgtcaat attaaagcgg ggaanaattg ataaatggga aaaaattagg
ttaagccag ggggaagaa acattatag ataaacacc tagtatggc aagcaggag

【 図 8 6 】

FIGURE 86 ( 配列番号 89)

atgggtgcga gagcgtcaat attaaagcgg ggaanaattg ataaatggga aaaaattagg
ttaagccag ggggaagaa acattatag ataaacacc tagtatggc aagcaggag

【 図 8 7 】

FIGURE 87 ( 配列番号 90 )

atgggtgca gagcgtcaat ataaagagg ggaaaattag ataaatggga agaaattagg
ttaagccag ggggaagaaa acctatagat gtaaaacatc tagtatgggc aagcagggag

【 図 8 9 】

FIGURE 89 ( 配列番号 92 )

atgggtgca gagcgtcaat ataaagagg ggaaaattag ataaatggga agaaattagg
ttaagccag ggggaagaaa acctatagat gtaaaacatc tagtatgggc aagcagggag

【 図 8 8 】

FIGURE 88 ( 配列番号 91 )

atgggtgca gagcgtcaat ataaagagg ggaaaattag ataaatggga agaaattagg
ttaagccag ggggaagaaa acctatagat gtaaaacatc tagtatgggc aagcagggag

【 図 9 0 】

FIGURE 90 ( 配列番号 93 )

atgggtgca gagcgtcaat ataaagagg ggaaaattag ataaatggga agaaattagg
ttaagccag ggggaagaaa acctatagat gtaaaacatc tagtatgggc aagcagggag

【 図 9 1 】

FIGURE 91 ( 配列番号 94 )

atgggtgca gagcgtcaat ataaagagg ggaaaattag ataaatggga agaaattagg
ttaagccag ggggaagaaa acctatagat gtaaaacatc tagtatgggc aagcagggag

【 図 9 3 】

Figure 93 ( 配列番号 96 )

atgggtgca gagcgtcaat ataaagagg ggaaaattag ataaatggga agaaattagg
ttaagccag ggggaagaaa acctatagat gtaaaacatc tagtatgggc aagcagggag

【 図 9 2 】

FIGURE 92 ( 配列番号 95 )

atgggtgca gagcgtcaat ataaagagg ggaaaattag ataaatggga agaaattagg
ttaagccag ggggaagaaa acctatagat gtaaaacatc tagtatgggc aagcagggag

【 図 9 4 】

Figure 94 (配列番号 97)

```

atgggtgcca gagcgtcaat attaaaggc gaaaaattag atagatggga aagaattagg
ttaagccag ggggaaagaa acattatatg ttaaacacac tagtatgggc aagcagggag
ctgaaagat ttgcacttaa ccttggcctt ttagaacaac cagaaggctg taatcaata
atgaaacagc tacaccaccg tcttcagaca ggaacagagg aacttaaatc atbtatcaac
acagtagcaa ctctctattg tgtacatgaa aacataaagg tacgagacac caaggaaacc
ttagacaaga tagaggaaga acaaaaacaa attaaaagtc agcaaaaac caaggagcca
aaagcgcctg acgaaaaagt cagtcaaatc tatcctatag tgcagaactc taaggggcaa
atggtacatc agaaccatc accctagaacc ttgaatgcat gggtaaaagt aatagaggag
aaggctttaa gccccagagt taataccctg tttacagcat tatcagaagg agccaccoca
caagatttaa gccaccatgt aaatcagctg gggggacatc aagcagccat gcaaatgtta
aaagtacca tcaatgaaga ggtgcagaaa tgggatagat acatagcagg aactactagt
cctatggcac caggccaatt gaggaacca agggaaagtg tacaccocag ccatgccccg
acccttcggg acaaatagc atggatgaca agtaatccac ctatccagtg gggagacatc
tataaaagat ggaataattc ggggttaaat aaatagatga gaatgtatg cctctgcaic
atltttggaca taagcaagg gcccaaggaa cctcttagag aactgtatg actatgtaga cggllcctt
aaagccttaa gagctgaaca agctacacaa agtataaaa attggtatga agaaaccttg
ctggctcaaa atgcgaacc agatgttaag accattttaa aagcattagg aatagggctc
acattgaaag aaatgatgac agcatgtcac gtagtggggg gaacctgtca caaagcaaga
gtgttagctg aggcaatgag caagcaaac aatataaaca taatgatgca gagaagcaat
tttaaaagct caaaaagat tgttaaatgt tccaactgtg gcaaggaagg gcatatgccc
agaaattgca gggccctcag taaaaggagg ttattaggaa aaatttgccc ttcccacaag
atgaaagatt gtaactgagag gcagacaatc ttttaggaa aaatttgccc ttcccacaag
ggagggccag ggaatttccct tcagaaacaa ccagagacaa cagccccacc agcagagat
ttcagaaaca gaccagagoc aacggctcca ccagacagaa gcttcaggtt cgaggagac
accocactc cyaagcagga gccgaaagac agggatccct taactccct caaatcactc
tttggagcg accctcctc caataa

```

【 図 9 5 】

Figure 95 (配列番号 98)

```

atgggtgcca gagcgtcaat attaaaggc gaaaaattag ataatggga gaaaattagg
ctaagccag ggggaaagaa acactatatg ctaaaacatc tagtatgggc aagcagggag
ctgaaagat ttgcacttaa ccttggcctt ttagaacatc caaaggctg taatcaata
atgaaacagc tacaccaccg tcttcagaca ggaacagagg aacttaaatc atbtatcaac
acagtagcaa ctctctattg tgtacatgaa aacataaagg tacgagacac caaggaaacc
ttagacaaga tagaggaaga acaaaaacaa attaaaagtc agcaaaaac caaggagcca
aaagcgcctg acgaaaaagt cagtcaaatc tatcctatag tgcagaactc taaggggcaa
atggtacatc agaaccatc accctagaacc ttgaatgcat gggtaaaagt aatagaggag
aaggctttaa gccccagagt taataccctg tttacagcat tatcagaagg agccaccoca
caagatttaa gccaccatgt aaatcagctg gggggacatc aagcagccat gcaaatgtta
aaagtacca tcaatgaaga ggtgcagaaa tgggatagat acatagcagg aactactagt
cctatggcac caggccaatt gaggaacca agggaaagtg tacaccocag ccatgccccg
acccttcggg acaaatagc atggatgaca agtaatccac ctatccagtg gggagacatc
tataaaagat ggaataattc ggggttaaat aaatagatga gaatgtatg cctctgcaic
atltttggaca taagcaagg gcccaaggaa cctcttagag aactgtatg actatgtaga cggllcctt
aaagccttaa gagctgaaca agctacacaa agtataaaa attggtatga agaaaccttg
ctggctcaaa atgcgaacc agatgttaag accattttaa aagcattagg aatagggctc
acattgaaag aaatgatgac agcatgtcac gtagtggggg gaacctgtca caaagcaaga
gtgttagctg aggcaatgag caagcaaac aatataaaca taatgatgca gagaagcaat
tttaaaagct caaaaagat tgttaaatgt tccaactgtg gcaaggaagg gcatatgccc
agaaattgca gggccctcag taaaaggagg ttattaggaa aaatttgccc ttcccacaag
atgaaagatt gtaactgagag gcagacaatc ttttaggaa aaatttgccc ttcccacaag
ggagggccag ggaatttccct tcagaaacaa ccagagacaa cagccccacc agcagagat
ttcagaaaca gaccagagoc aacggctcca ccagacagaa gcttcaggtt cgaggagac
accocactc cyaagcagga gccgaaagac agggatccct taactccct caaatcactc
tttggagcg accctcctc caataa

```

【 図 9 6 】

Figure 96 (配列番号 99)

```

atgggtgcca gagcgtcaat attaaaggc gaaaaattag atagatggga aagaattagg
ttaagccag ggggaaagaa acattatatg ttaaacacac tagtatgggc aagcagggag
ctgaaagat ttgcacttaa ccttggcctt ttagaacaac cagaaggctg taatcaata
atgaaacagc tacaccaccg tcttcagaca ggaacagagg aacttaaatc atbtatcaac
acagtagcaa ctctctattg tgtacatgaa aacataaagg tacgagacac caaggaaacc
ttagacaaga tagaggaaga acaaaaacaa attaaaagtc agcaaaaac caaggagcca
aaagcgcctg acgaaaaagt cagtcaaatc tatcctatag tgcagaactc taaggggcaa
atggtacatc agaaccatc accctagaacc ttgaatgcat gggtaaaagt aatagaggag
aaggctttaa gccccagagt taataccctg tttacagcat tatcagaagg agccaccoca
caagatttaa gccaccatgt aaatcagctg gggggacatc aagcagccat gcaaatgtta
aaagtacca tcaatgaaga ggtgcagaaa tgggatagat acatagcagg aactactagt
cctatggcac caggccaatt gaggaacca agggaaagtg tacaccocag ccatgccccg
acccttcggg acaaatagc atggatgaca agtaatccac ctatccagtg gggagacatc
tataaaagat ggaataattc ggggttaaat aaatagatga gaatgtatg cctctgcaic
atltttggaca taagcaagg gcccaaggaa cctcttagag aactgtatg actatgtaga cggllcctt
aaagccttaa gagctgaaca agctacacaa agtataaaa attggtatga agaaaccttg
ctggctcaaa atgcgaacc agatgttaag accattttaa aagcattagg aatagggctc
acattgaaag aaatgatgac agcatgtcac gtagtggggg gaacctgtca caaagcaaga
gtgttagctg aggcaatgag caagcaaac aatataaaca taatgatgca gagaagcaat
tttaaaagct caaaaagat tgttaaatgt tccaactgtg gcaaggaagg gcatatgccc
agaaattgca gggccctcag taaaaggagg ttattaggaa aaatttgccc ttcccacaag
atgaaagatt gtaactgagag gcagacaatc ttttaggaa aaatttgccc ttcccacaag
ggagggccag ggaatttccct tcagaaacaa ccagagacaa cagccccacc agcagagat
ttcagaaaca gaccagagoc aacggctcca ccagacagaa gcttcaggtt cgaggagac
accocactc cyaagcagga gccgaaagac agggatccct taactccct caaatcactc
tttggagcg accctcctc caataa

```

【 図 9 7 】

Figure 97 (配列番号 100)

```

atgggtgcca gagcgtcaat attaaaggc gaaaaattag atacatggga aaaaattagg
ttaagccag ggggaaagaa acactatatg ctaaaacatc tagtatgggc aagcagggag
ctgaaagat ttgcacttaa ccttggcctt ttagaacatc caaaggctg taatcaata
atgaaacagc tacaccaccg tcttcagaca ggaacagagg aacttaaatc atbtatcaac
acagtagcaa ctctctattg tgtacatgaa aacataaagg tacgagacac caaggaaacc
ttagacaaga tagaggaaga acaaaaacaa attaaaagtc agcaaaaac caaggagcca
aaagcgcctg acgaaaaagt cagtcaaatc tatcctatag tgcagaactc taaggggcaa
atggtacatc agaaccatc accctagaacc ttgaatgcat gggtaaaagt aatagaggag
aaggctttaa gccccagagt taataccctg tttacagcat tatcagaagg agccaccoca
caagatttaa gccaccatgt aaatcagctg gggggacatc aagcagccat gcaaatgtta
aaagtacca tcaatgaaga ggtgcagaaa tgggatagat acatagcagg aactactagt
cctatggcac caggccaatt gaggaacca agggaaagtg tacaccocag ccatgccccg
acccttcggg acaaatagc atggatgaca agtaatccac ctatccagtg gggagacatc
tataaaagat ggaataattc ggggttaaat aaatagatga gaatgtatg cctctgcaic
atltttggaca taagcaagg gcccaaggaa cctcttagag aactgtatg actatgtaga cggllcctt
aaagccttaa gagctgaaca agctacacaa agtataaaa attggtatga agaaaccttg
ctggctcaaa atgcgaacc agatgttaag accattttaa aagcattagg aatagggctc
acattgaaag aaatgatgac agcatgtcac gtagtggggg gaacctgtca caaagcaaga
gtgttagctg aggcaatgag caagcaaac aatataaaca taatgatgca gagaagcaat
tttaaaagct caaaaagat tgttaaatgt tccaactgtg gcaaggaagg gcatatgccc
agaaattgca gggccctcag taaaaggagg ttattaggaa aaatttgccc ttcccacaag
atgaaagatt gtaactgagag gcagacaatc ttttaggaa aaatttgccc ttcccacaag
ggagggccag ggaatttccct tcagaaacaa ccagagacaa cagccccacc agcagagat
ttcagaaaca gaccagagoc aacggctcca ccagacagaa gcttcaggtt cgaggagac
accocactc cyaagcagga gccgaaagac agggatccct taactccct caaatcactc
tttggagcg accctcctc caataa

```

【 図 98 】

Figure 98 (配列番号 101)

atgggtcgga gagcgtcaat attaggagcc ggaattatg atacatggga aaaaattag
ttaaaggcag ggggaagaaa acaactatag ctaaaacat tagtatggcc aagcaggagg
ctggaagact ttgcaactaa cccgtgcccc tttagagcat taacaaataa
ataagaacaa taacaaccag ccttcagaca ggaacagagg aacttaaac atatacaac
acagtagaca cttctctatg tttacatgca aagatagagg tacgagacac caaggaagcc
ttgatataga tagagagaga acaaaaaa tgcagcaga aaacacagca ggcataagag
ctgtagcaggga agatagatca aaattatcc atagtgcaaa agtcaataga ggagaaggta
cacagcggca tatcaactag aactttgaa ctatggcgaa agtcaataga ggagaaggta
tttagccagg agtaataacc catgtttaca ccatatcagg aaggagccac cccacaagat
ttaaacacca tgcataaact agtggggaga catcaacgag catgcaaat gttaaaagat
acatcaatg aggagcctgc aqaatgggac agaatcacat cagtaacatg agggcctatt
gcaccagccc aatagagaga acaaaaggga agtgacatag caggaaactac tagtaccctt
caggaaacaa tagcatggat gacaagtaac ccaactgttc cagtggggaga aatcattaaa
agatgggata tctgggccc aataaaaaa taagaagtat atagcctgtg cagcattttg
gacataaac aaggacaaa gcaaaccttt agagattatg tagaccggtt ctttaaacct
ttaaagagcc aacaagctac acaagatga aaaaattgta tgacagacac cttgttggtc
caaatggca accagatgt taagatcatt ttaagagatg taggaccagg ggcatacatt
gaagaatga tgacagatg tgacagatg ggagagcctt gccacaaagc aagatgtttg
gtgaggcaca tgaccagcc aacagatca aatataatga tgacagagag caattttaaa
ggccctaaaa gaacattaaa atgtttttac tgtgtcaagg aaggccactt agccagaat
tgaccggccc ctagaaaaa ggggttgggt aatgtggga aagaaggaca caaatgaaa
gactgtacag agagacagaa ggaataatga gggaaaattt ggccttcccc caagggaaga
ccagggaact tcttcagaa cgaataatga ccaacagccc caccagcaga gacttcagg
ttgagagaga caaacctgc tccgagagc gagcgaagc aggggaacc cttaactccg
ctcaatcac tctttggcag cgcacctgtg tcaacataa

【 図 99 a 2 】

Figure 99a2. Nef ( 続 )

TV0621 (NM 1001) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1002) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1003) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1004) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1005) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1006) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1007) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1008) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1009) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1010) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1011) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1012) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1013) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1014) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1015) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1016) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1017) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1018) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1019) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1020) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1021) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1022) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1023) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1024) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1025) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1026) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1027) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1028) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1029) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1030) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1031) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1032) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1033) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1034) 1 120 140 160 180 200 220 240 255
TV0621 (NM 1035) 1 120 140 160 180 200 220 240 255

【 図 100 - 1 】

FIGURE 100 ( 3-1001 )

IM21068 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000
969005.02 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000
9286025.8 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000

【 図 100 - 2 】

FIGURE 100 ( 3-1002 )

IM21068 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000
969005.02 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000
9286025.8 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000

【 図 100 - 3 】

FIGURE 100 ( 3-1003 )

IM21068 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000
969005.02 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000
9286025.8 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000

【 図 100 - 4 】

FIGURE 100 ( 3-1004 )

IM21068 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000
969005.02 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000
9286025.8 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100 3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100 4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100 5200 5300 5400 5500 5600 5700 5800 5900 6000 6100 6200 6300 6400 6500 6600 6700 6800 6900 7000 7100 7200 7300 7400 7500 7600 7700 7800 7900 8000 8100 8200 8300 8400 8500 8600 8700 8800 8900 9000 9100 9200 9300 9400 9500 9600 9700 9800 9900 10000



【 図 100 - 9】

TW01069 : WEAKHIGSDVYWGLEKKNLNLEKAVAVESTRDLMLVQICRANFNPRIDQFEMAQ : 870  
 9580102 : .S.T. .NFT.V.G. .FL.T.M.FC. .L. : 879  
 9282220 : .T. .L.G. .S. .S.F.T. .I.V.L.G.W.C. .L. : 856  
 9282518 : .L. .G. .S. .S.F.T. .I.V.L.G.W.C. .L. : 856  
 TW01068.2 : .I. .I. .S.T.T. .I. .L. .L. .L. : 867  
 TW01068.1 : .I. .I. .S.P.T. .I. .I. .L. .L. .L. : 869  
 TW020212.1 : .G.T. .T. .T. .P.F.N.L.G.V. .L. : 854  
 TW01062.1 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 845  
 TW01062.2 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 851  
 TW01062.3 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 857  
 TW01062.4 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 863  
 TW01062.5 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 869  
 TW01062.6 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 875  
 TW01062.7 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 881  
 TW01062.8 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 887  
 TW01062.9 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 893  
 TW01062.10 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 899  
 TW01062.11 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 905  
 TW01062.12 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 911  
 TW01062.13 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 917  
 TW01062.14 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 923  
 TW01062.15 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 929  
 TW01062.16 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 935  
 TW01062.17 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 941  
 TW01062.18 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 947  
 TW01062.19 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 953  
 TW01062.20 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 959  
 TW01062.21 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 965  
 TW01062.22 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 971  
 TW01062.23 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 977  
 TW01062.24 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 983  
 TW01062.25 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 989  
 TW01062.26 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 995  
 TW01062.27 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1001  
 TW01062.28 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1007  
 TW01062.29 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1013  
 TW01062.30 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1019  
 TW01062.31 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1025  
 TW01062.32 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1031  
 TW01062.33 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1037  
 TW01062.34 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1043  
 TW01062.35 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1049  
 TW01062.36 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1055  
 TW01062.37 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1061  
 TW01062.38 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1067  
 TW01062.39 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1073  
 TW01062.40 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1079  
 TW01062.41 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1085  
 TW01062.42 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1091  
 TW01062.43 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1097  
 TW01062.44 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1103  
 TW01062.45 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1109  
 TW01062.46 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1115  
 TW01062.47 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1121  
 TW01062.48 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1127  
 TW01062.49 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1133  
 TW01062.50 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1139  
 TW01062.51 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1145  
 TW01062.52 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1151  
 TW01062.53 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1157  
 TW01062.54 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1163  
 TW01062.55 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1169  
 TW01062.56 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1175  
 TW01062.57 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1181  
 TW01062.58 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1187  
 TW01062.59 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1193  
 TW01062.60 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1199  
 TW01062.61 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1205  
 TW01062.62 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1211  
 TW01062.63 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1217  
 TW01062.64 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1223  
 TW01062.65 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1229  
 TW01062.66 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1235  
 TW01062.67 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1241  
 TW01062.68 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1247  
 TW01062.69 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1253  
 TW01062.70 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1259  
 TW01062.71 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1265  
 TW01062.72 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1271  
 TW01062.73 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1277  
 TW01062.74 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1283  
 TW01062.75 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1289  
 TW01062.76 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1295  
 TW01062.77 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1301  
 TW01062.78 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1307  
 TW01062.79 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1313  
 TW01062.80 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1319  
 TW01062.81 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1325  
 TW01062.82 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1331  
 TW01062.83 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1337  
 TW01062.84 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1343  
 TW01062.85 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1349  
 TW01062.86 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1355  
 TW01062.87 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1361  
 TW01062.88 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1367  
 TW01062.89 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1373  
 TW01062.90 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1379  
 TW01062.91 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1385  
 TW01062.92 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1391  
 TW01062.93 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1397  
 TW01062.94 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1403  
 TW01062.95 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1409  
 TW01062.96 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1415  
 TW01062.97 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1421  
 TW01062.98 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1427  
 TW01062.99 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1433  
 TW01062.100 : .I. .I. .S.D. .I.F.L.G.S.Y. .L. : 1439

FIGURE 100 (シート9/9)

【 図 101 - 1】

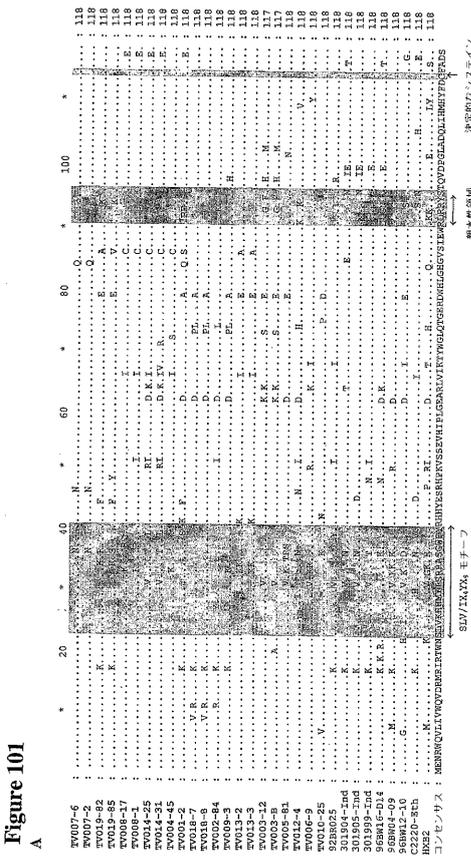
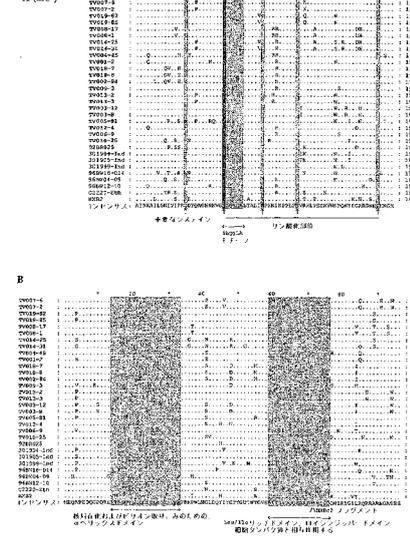


Figure 101 A

【 図 101 - 2】



【 図 101 - 3】

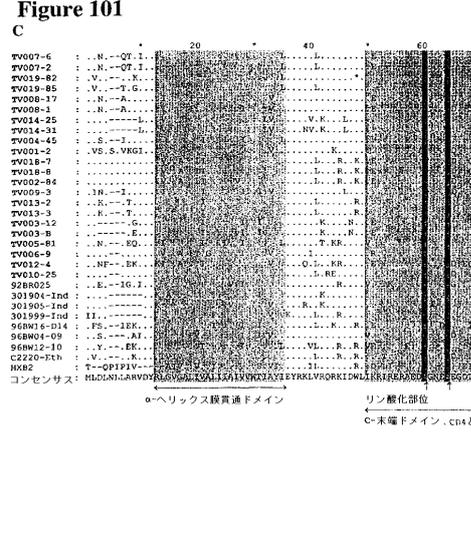
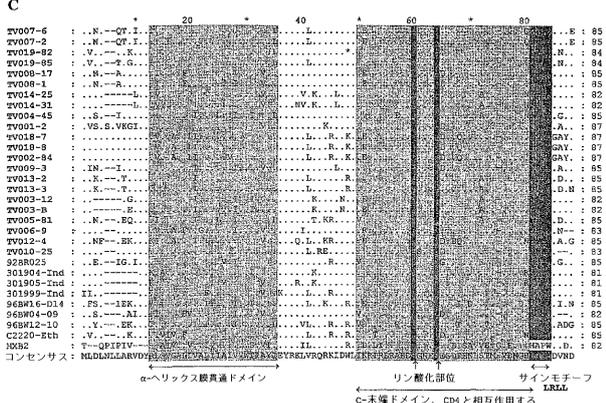


Figure 101 C

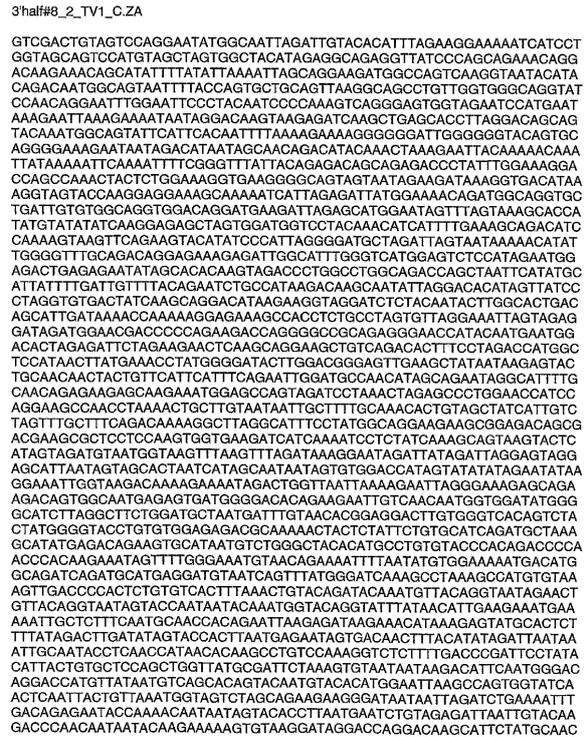
【図101 - 4】

Figure 101

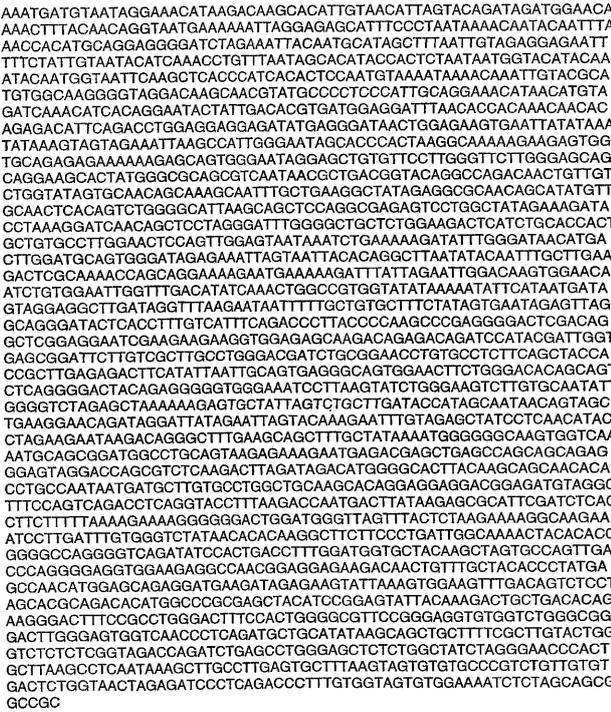


【図102 - 1】

FIGURE 102 (配列番号 181)



【図102 - 2】



【図103 - 1】

FIGURE 103 (配列番号 182)



FIGURE 102 (配列番号 181) シート2の2

【 図 103 - 2 】

FIGURE 103 ( 配列番号 182 )

( シート5の2 )

GGAAACCAAAATGATAGGGAATTTGGAGGTTTATCAAAGTAAAGACA
GATGAGCAAAATGATAGAAAATTTGGGCTGAAAATCCATATAACACTCC
TATTAGTAGGACCTACACCTGCAACATAATTTGGAAGAAAATATGTTGACT
CAGCTTGGATGCACATAAATTTCCAAATTTAGTCCCAATTTGAACTGACCA
GTAATAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAGAGTTAAACAATGGCCATT
GACAGAAGAAAAATAAAGCAATTAACAGCAATTTGTGAAAGAAATGGAG
AAGGAAGGAAAAATTAACAAAATTTGGGCTGAAAATCCATATAACACTCC
AGTATTTGCCATAAAAAAGAGGACAGTACTAAGTGGAGAAAAATTAAGTGA
GATTTACGGGAACCTAATAAAGAACTCAAGACTTTTGGGAAGTCAAT
AGGAATACCAACCCAGCAGGGTAAAAAAGAAAAAATCAGTGACAGTG
CTGGATGTTGGGGATGCATATTTTCAGTTCCTTTAGATGAAAGCTTCAGG
TAATATACTGCATCCACATACTAGTATAAACAATGAAGCACCAGGGAT
AGATATCAATATAATGTGCTTCCACAGGGTGGAAAGGATCACCAGCAA
TATTCAGTGTAGCATAACAAAATCTTTCAGCCCTTATAGGAACAAAAT
CCAAACATAGTATCTACATAATATGGATGGATTTGATGTAGGATCTGAC
TTAGAAAATAGGGCAACATAGAGCAAAAATTAAGGAGTTAAGAGAACAAT
TATTTGAGGTTGGGACTTACCACCCAGACAAGAAACATCAGAAAAGAAC
CCCATTTCTGGATGGGGTATGAACTCAAGACTTTTGGGAAGTCAAT
AGCCTATCTGCTGCCAGAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAG
AAGTATGTTGGAAAGTAACTAGGCTGGCCAGCTAGATTACCCAGGTTAA
AGTAAAGTACTGTGCAAACTCTTACGGGAGCCAAAGCACTAACAGCA
TAGTACCCTGTAGTGAAGAGCTGAATTAAGATTTGGCAGAGAACAGGGA
AATTTCAAAGAACCAGTACATGGAGTATTTATGACCCCTCAAAGACT
TAATAGCTGAAAACAGAAACAGGGCATGACCAATGGACATCAACAAAAT
TACCAAGAACCTTCAAATAATCTGAAAACAGGGAAGTATGCAAAAATGA
GGACTGCCACACTAATGATGTAACACAGTTAACAGAAAGCAGTCAAAA
AATAGCTCTGAAAGACTAGTAAATTTGGGGAAGAGTCTCAAATAATTCAG
TACCATCCAAAAGAAACATGGGAGACAGTGTGGACAGACTATTGGCA
AGCCACTGGACTCCCTGAAATGTTTGTATAACCCCTCCCTGATGATAA
ATTATGGTCCAACTGGAAAAAGCCATAAGCAGGGGTAGAGACTTTCT
ATGTAGATGGAGCAGCTAACAGGGAATAAAAATAGGAAGAACAGCGGTA
TGTACTGCAAAAGGAAGACAGAAAATTTGTTACTTCAAATGAACAACAA
ATCAGAAGGCTGATGCAAGCAATTCAGCTAGCTTTGACAGGATTCAGGA
TCAGAAGCAACATAGTAACAGACTCAGAGTATGCATTAGGAATTTCA
AGCAACACAGATAAGAGGTAATCAGAGTATGTTAACCAGATAATAGAA
AGCTTAATAAACAAGGAGTACTACTCTGGTTCAGGACAGCATAA
AGGAATTTGGGAAAATGAACAAGTACAGAAAATAGTAAAGTAAAGTAA
AGGAAGTGTCTGTCTTCTAGATGGGATAGATAAGGCTCAAGAAAGCAG
AAAATATCAGCAATTTGGAGAGCAATGGCTAGTGTGATTTACTGCCAC
CCATAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCACTAAA
GGGAAGCCATACATGGACAGTGCAGTGTAGTCCAGGAATATGGCAAT
AGATTGTACACATTTAGAAAGAAAATATCCCTGGTAGCAGTCCATGTAG
CCAGTGGCTACATAGAAAGCAGAGTATTTCCAGCAGAAAACAGGACAAG
AACAGCATAATATATCTAAATAAGTAAAGCAAGTGGCAGTTAAATAAT
TACATACAGATAAATGGCAGTAAATTTCCACGATGTGCAAGTTAAAGCA
TGTTGTGGGCAAGGAATCCAAAGGAATTTGGAATTTCCCTACAATCCCA
AAGTCAGGAGTAGTAGAATCCATGAATAAAGAAATTAAGAAAATCAT
GGGCAGGTAAGAGATCAAGTGCACCTCAAGACAGCAGTACAAAATGG

【 図 103 - 4 】

FIGURE 103 ( 配列番号 182 )

( シート5の4 )

ATGCAACAGGAGACATAATAGGAGATATAAGACAAGCACACTGTAAACAT
TAGTGAAAAGCAATGGGATCAGACTTTATACAGGGTAAAGTGAAAAATTA
AAGCAACTTCCCTAAATAAACAATAAAGITTAATCTATCCTCAGGAGGG
GACTTAGAAATTAACAACATAGCTTTAATTTGGGAGAGATTTTTCTAT
TGCAATACATCTGTACTGTTAATGGCACAATACAGTAATGGCACAACAG
TACAAATACAACAGTATCAGCTCCCATGCAAGATAAACAACAATTAATA
ACATGTGGCAGGGGGTAGGACGAGCAATGTATGCCCTCCCATTTGCAGGA
AACATAAATGTAGATCAAAACATCAGGAGTAAATTTGACAGCGTATGG
AGGGCAGGGAGAGAAATGACACAATAGATATTTAGACCTGCAGGAGG
GATATGAGGACAAATGGAGAAGTGAATTAACAATAAAGTGGTGTAG
AAATTCAGCCATTAGGAGTAGCACCCCAATAGGCCAAAAGGAGAGTGT
GGAGAGAGAAAAAGAGCAGCTTTGGGAGCTGTGTCTCTTGGTCTCTGG
GAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCACTCAATAATGCTGACGGTACA
GGCCAGACAACCTGTGTCTGTTATAGTGCACAGCAAAAGCAATTTGCTGA
GAGCTGTAGAGGGCACAACAGCATAATTTGCCAACTCAGGTCTGGGGCAAT
AAGTACTCCAGACAAGAGTCTGGCTATAGAAAAGATACCTAAAGGATCA
ACAGCTCCTAGGGATTTGGGGCTGTCTGGAAGAACTCATCTGCACCACTG
CCGTGGCTTTGGAACAATAAGTGTGGAGTAATAAATCTCAAGAATTAAT
GGAAACATAGCTGATGCAATGGGATAAAGAAATTAAGCAATTTACACAG
AAACAATAACAGGTTGCTTGGGACCGCAGAAAACAGCAGGAGAAAA
TGAAAAGGAGTTACTAGAAATTTGGCAGGTGGGGAAATCTGTGGAACCTGT
TTGACATAAACAATTTGGCTGTGTTATATAAAAAATTTCAATAATGGTAATA
GGAGGCTTGATAGGTTTAAAGAAATAATTTTGGCTGTCTTTCTATAGTAAT
AGAGTTAGGCAGGGATACTACCTTTTGTCTTTCAGACCCCTGGCCAAAAC
CCGAGGGGACCCGACAGCTCGGAAGAACCGAAGAAGAAAGAGTGGAGAGC
AAGCAGAGACAGATCCATAAAGTATAGTGGCAGGATTTCTAGCATCTGCC
TGGGAGGACTGAGGAACCTGTGCAATTTTCTCTACCACCGATGTAGAGA
CTTCATATTTGGTGACAGCGAGCAGTGGAACTTCTGGGACGCAAGCAGTC
TCAGGGGACTCCAGAGGGGTTGGGAAATCCTTAAGTACTCTGGGAAGCTT
GTGCAGTATTTGGGTTCTAGAGCTAAAAAAGAGTGTCTGTTAGTGTCTTGA
TAGCGTAGCAATAGCAGTAGTGGGAAACAGATAGAATTAAGAAATTTCT
TACAAGGAAGCTTGGTAGACTATCTCAAGACTTCTAGGAAGAAATAAGAC
GGCTTTGAAGCAGCTTGGCATGAAATTTGGGAAATTAAGTGGTCAAAAGCT
GGCTGCTGTAAGAGAAAGAAATTTGAAAATCTAGCCAGCAGCAGCAGAGA
AGCAGCTAGCCAGCAGCAGCAGAAAGGATAGGAGCAGCTCTCAAGAC
TTGATAAAGCTGGGGCGTTCAATAACAACAACAGCCAACAATAATCTTC
TGATTTGCTGGTGGAGAGCTGAAAGCAGGATGGGAAGTAGGCTTTCCAG
TCAGACCTCAGTACTTAAAGCAATGACATAAAGGCCAGCATTTGAT
CTCAGCTCTTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGTTAAATTTACTC
CAGGAAAAGGCAAGAGATACTTGTATTTGGTCTATCACACAAGGCT
ACTTCCCTGATTGGCAAACTTGCATCACCCGACCCAGGGTCAATTTCCA
CTGACCTTTGGATGGTGTCTAACGTAAGTCCAGTTGACCCAAAGGGAAGT
AGAAAGGGCCACCGGAGGAGAAGCAACTGTTTGTCTACACCTATGGCC
CAGTATGGAATGGATGATGAACACAAAGAAAGTGTCTACAGTGGAAATTTGA
CAGCAGCTAGCAGCAGACACTGGCCCGGAGCTACATCCGGATTTAT
ACAAAGACTGCTGACACAGAAGGGACTTTCCGCTGGGACTTTCCACTGG
GGCTTCCAGGGGAGTGGTCTGGGCGGACTGGGAGTGGCCAGCCCTCA
GATGCTGCATATAAGCAGCTGCTTTCCGCTGTACTGGTCTCTCTAGGTA

【 図 103 - 3 】

FIGURE 103 ( 配列番号 182 )

( シート5の3 )

CAGTATTCATTCACAATTTTAAAGAAAAAGGGGGATTTGGGGGTACAGT
GCAGGGGAAAGGATAATAGACATAATAGCAACAGACATACAAACATAGAG
AATTAACAAAACAATAATAAAATTTCAAATTTCCGGTTTATTACAGG
GACAGCAGAGACCCCTATTTGGAAAAGGACCCAGCAAACTACTCTGGAAG
GTGAAAGGGCAGTAGTAATAACAAGATAATAGTGCATAAAGGTAGTACC
AAGGAGGAAAAGTAAAAATCATTAAAGGACTATGGAACACAGATGGCAGGT
GCTGATTTGTGTGCAGGTAGACAGGATGAAGATTAGAACATGGAATAGT
TGGTAAAGCATCACAATATAATTTCAAGGAGACTATGGAACACAGATGGCAGGT
AGACTCATTATGAAGCAGACCCCAAAAATAAGTTTCAGAAAGTACACAT
CCCATTAGGGGATGCTAGATTAGTAATAAAAACATATTGGGGTTTGCCATA
CAGGAGAAAAGAGATTGGCATTGGGTCTAGGAGTCCCATAGAAATGGAAA
TTGAGAAAATATAGCACACAAGTACACCTGGCCCTGGCAGACCAAGCTAAT
TCATGTGCATTAATTTTGGATTTTGTTCAGACTTCCATAAGACAAGCCAT
ATTAGGACACATAGTTATTCTAGTGTGACTATCAAGCAGGACATAAATA
AGGTAGGATCTCTCAATACTTGGCACTGACAGCATTTGATAAAACAAAA
AAGAGAAAAGCCACTTGGCATAGTGTAGGAAATAGTAGAGGATAGATG
GAACAGACCCAGAAAGCCAGGGACCCGAGGGAACCATCAATGAAT
GGACTAGAGCTTTAGAGGAACTCAAACAGGAAAGTCTGCAGACACTTT
CCTAGACCATGGCTCCATAGCTTAGGGCAACATATCTATAACACCTATGG
GGATACTTGGCAGGAGTAGAAGCTAATAAGAAATTTCTGCAACAACACTAC
TGTTTATTCATTTCAGAAATTTGGTGCCAGCATAGCAGAAATAGGCATTATGC
GACAGAGAAAGCAAGAAATGGAAACAGGATAGATCTAAACTTAGCCCT
GGAACAATCCAGGAAGTGCAGCTAAAACCTCTGTAATAATTTGCTATTGG
AAAAATGATAGTATCATTGTGTAGTTTCTAGTTTCAAAAAAGGCTTAGG
CAITTCATATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAACGAGAAAGACTCTTCCAAA
GCAGTGGAGTATCAAAAATTTATATCAAAAGCAGTAAGTACTAATGGT
AGATGTAAATGTTAAGTTTCTAGAAAAGAGTAAATGTAATAAGGAGTAG
CAGCATTATAATAGCACTAATCATAGCAATAGTTGTGTGATCATAGTAT
ATATAGAAATAGGAAAATTTTAAAGACAATAAAGAAATTTGCAACCTAGT
GAAAAGATTAGAGAAAGGGCAGAAAGCAGTGGCAATGAGAGTATGGGG
AGCAGGGAATTTCAACAATTTGGGATGTTGGGAAATCTTAGGCTTTTG
GATGCTAATGGTGGTAAATGTAATGGGAACTGTGGTGCAGACTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGAAAAGCAGCAAAAGCACTCTTATTTTGTGCTATC
TAGCTTAAAGCATATAGAAAAGAAAGTGCATATATGTTCCGGCTACACATGC
CTGTGTACCCAGACCCCGACCCAAAGAAATAGTTTGGAGAATGTAA
CAGAAAATTTTAAACATGTGGAAAATAACAGTGGTGACAGCATGATAG
GATATAATCAGCTTATGGGTCAAAGCTTAAAGCCATTTAGGTTAAAGTTGC
CCCACTGTGTGCTACTTTAACTGTAGCAATAAGTTTAAAATGTTAAATGCTACCA
CAGTATGAAGGAAATGAAAATTTGCCTTCAATATAACCCAGAACTAA
GAGATAAGAGAAAAGCAAGAAATAGCACTTTTATAAACTTGATATAGTA
CCACTGGAGGAGAAATCCAGTAAATAGATAGTAATAAATTTGTAATACCTC
AGCCATAACCCAGCTGTCCAAAGGCTCTCTTTGACCCCAATTTCTATACA
TATTGTGTCCAGCTGGTTATAGCGATTTCTAAAGTGAATAAATAAGCAATT
CAATTTGAACAGGAGCATGCAATAATGTGCAGCAGCTTAAATAGTACACTG
GAATTAAGCAGTAGTAACTCACTCAACTGTTAAATTTGTTAGTGTAGTAGCA
GAAGAAGAAATAGTAATTAGATCTGAAAATATGCAAAACAATGCCAAA
TAATAATAGTACATCTAATGAATCTGTAGAAATTCAGTGTACAGGCCCC
AAATAATAACAGAAAAGTATGAGGATAGGAGGACCAAGCAACAACTCT

【 図 103 - 5 】

FIGURE 103 ( 配列番号 182 )

( シート5の5 )

GACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTGTCTATCTGGGAAACCCACTGCTT
AAGCCCTAAATAAGCTTGCCTTGAAGTGTCTAAGTAGTTGTTGCCATCTGT
TTGTGTGACTCTGTTAGACTCTGGTAACAGAGATCCCTCAGACCCCTTGTG
GTAGTGTGGAAAATCTCTAGGA

【 図 104 】

FIGURE 104 ( 配列番号 183 )

gp140.modTV1.mut1.dV2

1 atgctgctga tgggcaacca gaagaactgc cagcagtggt ggalctgggg catctcgggc
61 tctggatgc tgalgatgt caacaccag gacctgtgg tgacctgta ctacgctgt
121 ccctgttgc ggcagccca gaccacctg tctgtgcga ggcagccca ggcctacag
181 accgagctg acagctgtg tgccacccc gctgtctgc ccaccgcca caaccocag
241 gagatctgc tggcaactg gaccgagac tcaacatgt ggaagacga catggccagc
301 cagatcagc aggcctgat cagctctgg gaccagacc tgaagccctg ctggaagtg
361 acccccctg gctgacct gaactcacc gacacaccg tgaccgcca ccgcaccgtg
421 accgcaaca gacacaca caccacacc accgctctg actctctga gggatgaa
481 aactgeact tcaaccg cgcgcgcgc ctgataact gcaacaccg caccatccc
541 cagcctgc caagtgag ctgcacccc atcccctc actctctg cccctcggc
601 taagcctc tgaagtca caacaagc tcaacgca cggccctg ctacactgt
661 agcacctgc agtcaacca cggcatca cccgtgtga gaccaccg ctgtctgaac
721 ggcagcctg ccgaggagg calcatcct cgcagcaga acctgacga gaacacaag
781 acatcctg tgcactga cagagctgt gagataact gcccctccc caacaaca
841 accgcaaga gctgctgat cggcccggc cagcctct agccacca cagctgtat
901 gcaacatc gccagccca ctgcaactc agcaccgacc gctgcaaca gacctcag
961 caggtgatg agaagctgg cagcacttc cccaacaaga caatcagtt caaccgcc
1021 gccggggc actggagat caccatgac agctcaact gcccgcca gttctctac
1081 tgaacaca gnaactgt caacagacc taaccaca caaacgca caaacgctac
1141 aagcgcaca gcaagccc calcatcct cagtcga ga tcaagcag ctgctcagc
1201 tggagctg tggcagcc caclctacc ccocccctg ccctgac caactcgcg
1261 agcaacfaa cggctact gctgaccgc gaggcgct tcaacacc caaacacc
1321 gagctctc gcccggcg cgcgactg cgcgcaact ggcgagca gctgacag
1381 taagagtg tggatcaa gccctggc atgcccoca ccagggcca ggcgctgt
1441 gtcagcgc agagagcc cgtggcact ggocctgt tctggctt cctggcgc
1501 gccgcgca ccatgggc cggccatc acctgacc tgcagctg ccaactgt
1561 agcgcctg tgcagcca gacacact ctaagcca tggagcca gcaacact
1621 ctgacgta ccgtgtgg catcagac ctgagccc tggagccc gcaactgt
1681 taactgag accagact gctggcact tgggctca ggcgctct gctgaccc
1741 accgctgc cctgagac cagctggag aacagagag agagagat ctgggaca
1801 atgactgga tgcattgga ccgagagat agcaacta ccgctgat ctacactg
1861 ctggagca gccagaca gcaagaga aacgagag accctgtg caactgtgagc
1921 tgaacacc tgtgactg gctgacac agcaactg cctgctac ttaa

【 図 1 0 5 】

FIGURE 105 ( 配列番号 184)

gp 140mod.TV1.mut2.dV2

1 atgdcgctga tgggcaccca gaagaactgc cagcagtgtt ggatctgggg catcctgggc
61 ttctggatgc tgatgatctg caaacccgag gaacttggg tgaccgtgta ctacggcgtg
121 cccgtgtggc gcgacgcca gaccaccctg ttctgcgcca gcgacgcca ggctctacgag
181 accgaggtgc acaactgtgt ggcacccacc gctctgctgc ccaccgacc caaccocccag
241 gagatctgtc tgggcaactg gaccgagaac ttaacatgt ggaagaacga catggccgac
301 cagatgcacg aggacgtgat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg
361 accccctgt gctgacct gaactgcacc gaccacaagc tgaccggcaa ccgaccctg
421 accggcaaca gcaccaaca caccacggc accgcatct acaacatga ggagatgaag
481 aactgcagct tcaacggcg ccggccggc ctgatcaact gcaacaccag caccatcacc
541 caggcctgcc ccaaggtgag ctfcgaccc atcccctac actactgcgc ccccggcggc
601 tacgcatcc tgaagtgcga caacaagacc ttaacggcca ccggccctg ctacaactg
661 agcaccgtgc agtgcacca cggatcaag ccctgtgtga gcaaccagct gctgtgaac
721 ggcagcctgg ccgaggagg ccatcactc cgcagcaga acctgaccga gaacaccaag
781 accatcatg tgcaactgaa cgagagcgtg gagatcaact gaaccggcc caacaacaac
841 accgcgaaga gcgtgcgat ccggccggc caggccttct acgccaacca cgactgtgat
901 ggcaacatcc ggcagggcca ctgcaacatc agaccggcc gctggaacca gaccctgcag
961 cagggtgatga agaagctggc cgagcaact cccaacaaga ccatcagtt caagcccac
1021 gccggcggcg acctggagat caccatgcac agcttcaact gccggcgga gttctttac
1081 tgcaacaca gcaactgtt caacagacc taccacaga acaaggcacc ctacaagtac
1141 aacggcaaca gcagcagccc catcaccctg cagtcaaga tcaagcagat cgtgcgcatg
1201 tggcaggcgg tgggcccagg cacctacgcc ccccctatg ccgcaacat cactcggcc
1261 agcaacatca ccggcatct gctgaccgc gaccggcgt tcaacacc caacaacacc
1321 gagacttcc gcccccggcg ccgcaactg cgcgcaact ggcgcagca gctgtacaag
1381 tacaagttgg tggatgtaa gccctgggc atgcoccca ccaaggcca gcgcagcgtg
1441 gtgcagagcg agaagagcgc cgtggcctc ggcgcgtgt tcttggctt cttggggccc
1501 gccggcagca ccatggcgc cgcacgcatc acctgaccg tgcaggccc ccagctgctg
1561 agcggcatcg tgcagcaga gagaacctg ctgaggcca tgcaggcca gcagcagatg
1621 ctgcagctga ccgttgggg catcaacag ctgcaggcc cgtgtctgc catgagcgc
1681 tactgaagg accagcagct gctggcctc tgggctgca gcggccgct gatctgacc
1741 acccggctgc cctggagcag cagctggcct cccaacaaga ccatcagtt caagcccac
1801 atgacctgga tgcagtggga cgcgagatc agcaactaca ccggctgat ctacaactg
1861 ctggaggaca gccagaacca gcaggagaag aacgagaag acctgtgga gctggacaag
1921 tggacaacc ttggaactg gtcgacatc agcaactgc cctgtactat ctac

【 図 1 0 7 】

FIGURE 107 ( 配列番号 186)

gp140mod.TV1.mut4.dV2

1 atgdcgctga tgggcaccca gaagaactgc cagcagtgtt ggatctgggg catcctgggc
61 ttctggatgc tgatgatctg caaacccgag gaacttggg tgaccgtgta ctacggcgtg
121 cccgtgtggc gcgacgcca gaccaccctg ttctgcgcca gcgacgcca ggctctacgag
181 accgaggtgc acaactgtgt ggcacccacc gctctgctgc ccaccgacc caaccocccag
241 gagatctgtc tgggcaactg gaccgagaac ttaacatgt ggaagaacga catggccgac
301 cagatgcacg aggacgtgat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg
361 accccctgt gctgacct gaactgcacc gaccacaagc tgaccggcaa ccgaccctg
421 accggcaaca gcaccaaca caccacggc accgcatct acaacatga ggagatgaag
481 aactgcagct tcaacggcg ccggccggc ctgatcaact gcaacaccag caccatcacc
541 caggcctgcc ccaaggtgag ctfcgaccc atcccctac actactgcgc ccccggcggc
601 tacgcatcc tgaagtgcga caacaagacc ttaacggcca ccggccctg ctacaactg
661 agcaccgtgc agtgcacca cggatcaag ccctgtgtga gcaaccagct gctgtgaac
721 ggcagcctgg ccgaggagg ccatcactc cgcagcaga acctgaccga gaacaccaag
781 accatcatg tgcaactgaa cgagagcgtg gagatcaact gaaccggcc caacaacaac
841 accgcgaaga gcgtgcgat ccggccggc caggccttct acgccaacca cgactgtgat
901 ggcaacatcc ggcagggcca ctgcaacatc agaccggcc gctggaacca gaccctgcag
961 cagggtgatga agaagctggc cgagcaact cccaacaaga ccatcagtt caagcccac
1021 gccggcggcg acctggagat caccatgcac agcttcaact gccggcgga gttctttac
1081 tgcaacaca gcaactgtt caacagacc taccacaga acaaggcacc ctacaagtac
1141 aacggcaaca gcagcagccc catcaccctg cagtcaaga tcaagcagat cgtgcgcatg
1201 tggcaggcgg tgggcccagg cacctacgcc ccccctatg ccgcaacat cactcggcc
1261 agcaacatca ccggcatct gctgaccgc gaccggcgt tcaacacc caacaacacc
1321 gagacttcc gcccccggcg ccgcaactg cgcgcaact ggcgcagca gctgtacaag
1381 tacaagttgg tggatgtaa gccctgggc atgcoccca ccaaggcca gcgcagcgtg
1441 gtgcagagcg agaagagcgc cgtggcctc ggcgcgtgt tcttggctt cttggggccc
1501 gccggcagca ccatggcgc cgcacgcatc acctgaccg tgcaggccc ccagctgctg
1561 agcggcatcg tgcagcaga gagaacctg ctgaggcca tgcaggcca gcagcagatg
1621 ctgcagctga ccgttgggg catcaacag ctgcaggcc cgtgtctgc catgagcgc
1681 tactgaagg accagcagct gctggcctc tgggctgca gcggccgct gatctgacc
1741 acccggctgc cctggagcag cagctggcct cccaacaaga ccatcagtt caagcccac
1801 atgacctgga tgcagtggga cgcgagatc agcaactaca ccggctgat ctacaactg
1861 ctggaggaca gccagaacca gcaggagaag aacgagaag acctgtgga gctggacaag
1921 tggacaacc ttggaactg gtcgacatc agcaactgc cctgtactat ctac

【 図 1 0 6 】

FIGURE 106 ( 配列番号 185)

gp140mod.TV1.mut3.dV2

1 atgdcgctga tgggcaccca gaagaactgc cagcagtgtt ggatctgggg catcctgggc
61 ttctggatgc tgatgatctg caaacccgag gaacttggg tgaccgtgta ctacggcgtg
121 cccgtgtggc gcgacgcca gaccaccctg ttctgcgcca gcgacgcca ggctctacgag
181 accgaggtgc acaactgtgt ggcacccacc gctctgctgc ccaccgacc caaccocccag
241 gagatctgtc tgggcaactg gaccgagaac ttaacatgt ggaagaacga catggccgac
301 cagatgcacg aggacgtgat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg
361 accccctgt gctgacct gaactgcacc gaccacaagc tgaccggcaa ccgaccctg
421 accggcaaca gcaccaaca caccacggc accgcatct acaacatga ggagatgaag
481 aactgcagct tcaacggcg ccggccggc ctgatcaact gcaacaccag caccatcacc
541 caggcctgcc ccaaggtgag ctfcgaccc atcccctac actactgcgc ccccggcggc
601 tacgcatcc tgaagtgcga caacaagacc ttaacggcca ccggccctg ctacaactg
661 agcaccgtgc agtgcacca cggatcaag ccctgtgtga gcaaccagct gctgtgaac
721 ggcagcctgg ccgaggagg ccatcactc cgcagcaga acctgaccga gaacaccaag
781 accatcatg tgcaactgaa cgagagcgtg gagatcaact gaaccggcc caacaacaac
841 accgcgaaga gcgtgcgat ccggccggc caggccttct acgccaacca cgactgtgat
901 ggcaacatcc ggcagggcca ctgcaacatc agaccggcc gctggaacca gaccctgcag
961 cagggtgatga agaagctggc cgagcaact cccaacaaga ccatcagtt caagcccac
1021 gccggcggcg acctggagat caccatgcac agcttcaact gccggcgga gttctttac
1081 tgcaacaca gcaactgtt caacagacc taccacaga acaaggcacc ctacaagtac
1141 aacggcaaca gcagcagccc catcaccctg cagtcaaga tcaagcagat cgtgcgcatg
1201 tggcaggcgg tgggcccagg cacctacgcc ccccctatg ccgcaacat cactcggcc
1261 agcaacatca ccggcatct gctgaccgc gaccggcgt tcaacacc caacaacacc
1321 gagacttcc gcccccggcg ccgcaactg cgcgcaact ggcgcagca gctgtacaag
1381 tacaagttgg tggatgtaa gccctgggc atgcoccca ccaaggcca gcgcagcgtg
1441 gtgcagagcg agaagagcgc cgtggcctc ggcgcgtgt tcttggctt cttggggccc
1501 gccggcagca ccatggcgc cgcacgcatc acctgaccg tgcaggccc ccagctgctg
1561 agcggcatcg tgcagcaga gagaacctg ctgaggcca tgcaggcca gcagcagatg
1621 ctgcagctga ccgttgggg catcaacag ctgcaggcc cgtgtctgc catgagcgc
1681 tactgaagg accagcagct gctggcctc tgggctgca gcggccgct gatctgacc
1741 acccggctgc cctggagcag cagctggcct cccaacaaga ccatcagtt caagcccac
1801 atgacctgga tgcagtggga cgcgagatc agcaactaca ccggctgat ctacaactg
1861 ctggaggaca gccagaacca gcaggagaag aacgagaag acctgtgga gctggacaag
1921 tggacaacc ttggaactg gtcgacatc agcaactgc cctgtactat ctac

【 図 1 0 8 】

FIGURE 108 ( 配列番号 187)

gp140.mod.TV1.GM161

1 atgdcgctga tgggcaccca gaagaactgc cagcagtgtt ggatctgggg catcctgggc
61 ttctggatgc tgatgatctg caaacccgag gaacttggg tgaccgtgta ctacggcgtg
121 cccgtgtggc gcgacgcca gaccaccctg ttctgcgcca gcgacgcca ggctctacgag
181 accgaggtgc acaactgtgt ggcacccacc gctctgctgc ccaccgacc caaccocccag
241 gagatctgtc tgggcaactg gaccgagaac ttaacatgt ggaagaacga catggccgac
301 cagatgcacg aggacgtgat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg
361 accccctgt gctgacct gaactgcacc gaccacaagc tgaccggcaa ccgaccctg
421 accggcaaca gcaccaaca caccacggc accgcatct acaacatga ggagatgaag
481 aactgcagct tcaacggcg ccggccggc ctgatcaact gcaacaccag caccatcacc
541 caggcctgcc ccaaggtgag ctfcgaccc atcccctac actactgcgc ccccggcggc
601 tacgcatcc tgaagtgcga caacaagacc ttaacggcca ccggccctg ctacaactg
661 agcaccgtgc agtgcacca cggatcaag ccctgtgtga gcaaccagct gctgtgaac
721 ggcagcctgg ccgaggagg ccatcactc cgcagcaga acctgaccga gaacaccaag
781 accatcatg tgcaactgaa cgagagcgtg gagatcaact gaaccggcc caacaacaac
841 accgcgaaga gcgtgcgat ccggccggc caggccttct acgccaacca cgactgtgat
901 ggcaacatcc ggcagggcca ctgcaacatc agaccggcc gctggaacca gaccctgcag
961 cagggtgatga agaagctggc cgagcaact cccaacaaga ccatcagtt caagcccac
1021 gccggcggcg acctggagat caccatgcac agcttcaact gccggcgga gttctttac
1081 tgcaacaca gcaactgtt caacagacc taccacaga acaaggcacc ctacaagtac
1141 aacggcaaca gcagcagccc catcaccctg cagtcaaga tcaagcagat cgtgcgcatg
1201 tggcaggcgg tgggcccagg cacctacgcc ccccctatg ccgcaacat cactcggcc
1261 agcaacatca ccggcatct gctgaccgc gaccggcgt tcaacacc caacaacacc
1321 gagacttcc gcccccggcg ccgcaactg cgcgcaact ggcgcagca gctgtacaag
1381 tacaagttgg tggatgtaa gccctgggc atgcoccca ccaaggcca gcgcagcgtg
1441 gtgcagagcg agaagagcgc cgtggcctc ggcgcgtgt tcttggctt cttggggccc
1501 gccggcagca ccatggcgc cgcacgcatc acctgaccg tgcaggccc ccagctgctg
1561 agcggcatcg tgcagcaga gagaacctg ctgaggcca tgcaggcca gcagcagatg
1621 ctgcagctga ccgttgggg catcaacag ctgcaggcc cgtgtctgc catgagcgc
1681 tactgaagg accagcagct gctggcctc tgggctgca gcggccgct gatctgacc
1741 acccggctgc cctggagcag cagctggcct cccaacaaga ccatcagtt caagcccac
1801 atgacctgga tgcagtggga cgcgagatc agcaactaca ccggctgat ctacaactg
1861 ctggaggaca gccagaacca gcaggagaag aacgagaag acctgtgga gctggacaag
1981 gagaaggacc tctggagt ggacaatg gcaaacctt ggaactgtt gcatcagc
2041 aactggcctt ggtactacta a

【 図 1 0 9 】

FIGURE 109 ( 配列番号 188 )

gp140mod.TV1.GM161-195-204

1 atgcgcgtga tgggcacca gaagaactgc cagcagtggt ggaatctggg catcctgggc
61 ttctggtgac tgaatgctg caaacaccag gacctgtggg tgaacctgta ctacgcctg
121 cccgtgtggc gcaagcccaa gaccaccctg ttctggccca gcaagcccaa ggcctacgag
181 accgaggtgc acaactgtgt ggcaccaccac tccctgtgfc ccaccgacc caaccaccag
241 gagatcgtgc tgggcaactg gaccgagaac ttaacatgt ggaagaacga catggccgac
301 cagatgcacg aggcagtgat cagctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg
361 acccccctgt gctgacct gaatgcacc gacacaacg tgaccggcaa ccgaccctg
421 accggcaaca gcaaccaaa caccaccgcc accgcaatc acaacatga ggaatgag
481 cagtcagct tcaacgccac caccagctg cgcgacaaga agcacaagga gtaccgctg
541 ttaccgccg tggacatgt gccctgaa gagaacagc accagttaac ctaccgctg
601 atcaactgcc agaccagacc catcaccag gctgcgccca aggtgagctt cgaccctac
661 cccatccact actgcgcccc cgcggctac gccatctga agtgcacaac caagaccctc
721 aacggcaacc gccctgcta caactgtgac accctgtggt gcaaccaccg catcaagccc
781 gttgtgagca cccagctgt gctgaacggc agcctggccc aggggggcat catcatccg
841 agcgagaacc tgaccgagaa caccagacc atcatctgfc accgaaacga gacgtggag
901 atcaactgca cccgcccaaa caacaacacc cgcgaagcgc tggcctacgg ccccgccag
961 gctctctac ccaccaacga cgtgatcggc aacatccgc agccctact caacatcagc
1021 accgaccctt ggaacaagc cctgcagcag gtatgaaga agctggggca gcaactcccc
1081 aacaagacca tcaagtcca gccaccgcc gggcggaacc tggagatcac catgcaacg
1141 ttaactgcc gggcgagtt ctctactg aacaccaga acctgttca cagcaactc
1201 cacagaaca accgcaacta caagtaca gcaacagca gcagccccat caccctgacg
1261 tgaagatca agcagatgt ggcctgtgg cagctgtgg gcaagccac ctaccgcccc
1321 cccatgccg gcaacatac ctgcgcagc aacataccg gcaatctgt gaccggcagc
1381 ggcgcttca acaccacca caaacccag acctccgcc cggcgccggc gcacatgccc
1441 gacaactgca gcaagcagct gtaacatg aaggtgtgtg agatcaagc cctggctac
1501 gcccccaca aggcacagc cccgtgtgtg cagcgcgaga agcgcgccc gggcatcggc
1561 gccgtttcc tggcttctt gggcgccc ggcacacca tggcgccc cagcatcacc
1621 ctgaccctg agcccacca gctctgagc gcaatctgfc agcagcagc caactctg
1681 aaggccatc agcccaaga gcaactgtc cagctgacc tgggggcat caagcagctg
1741 caggcccgc tgcctgcat cagcagctc tgaaggacc agcagctgt gggcatcgg
1801 gctctgagc gccgctgt ctgaccacc gccgtgcc ggaacagcag ctggagcaac
1861 aagagcgaga agaacatct ggaacaactg acctggatg agtgggacc cagatcagc
1921 aactacacc gctgatcta caactctg gaggacagc agaaccagca ggaagaagc
1981 gagaagacc tctggagct ggaacgtgg aacaactgt ggaactggt cgacatcagc
2041 aactggccc ggtactata a

【 図 1 1 0 】

FIGURE 110 ( 配列番号 189 )

gp140mod.TV1.GM161-204

1 atgcgcgtga tgggcacca gaagaactgc cagcagtggt ggaatctggg catcctgggc
61 ttctggtgac tgaatgctg caaacaccag gacctgtggg tgaacctgta ctacgcctg
121 cccgtgtggc gcaagcccaa gaccaccctg ttctggccca gcaagcccaa ggcctacgag
181 accgaggtgc acaactgtgt ggcaccaccac tccctgtgfc ccaccgacc caaccaccag
241 gagatcgtgc tgggcaactg gaccgagaac ttaacatgt ggaagaacga catggccgac
301 cagatgcacg aggcagtgat cagctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg
361 acccccctgt gctgacct gaatgcacc gacacaacg tgaccggcaa ccgaccctg
421 accggcaaca gcaaccaaa caccaccgcc accgcaatc acaacatga ggaatgag
481 cagtcagct tcaacgccac caccagctg cgcgacaaga agcacaagga gtaccgctg
541 ttaccgccg tggacatgt gccctgaa gagaacagc acaactaac ctaccgctg
601 atcaactgcc agaccagacc catcaccag gctgcgccca aggtgagctt cgaccctac
661 cccatccact actgcgcccc cgcggctac gccatctga agtgcacaac caagaccctc
721 aacggcaacc gccctgcta caactgtgac accctgtggt gcaaccaccg catcaagccc
781 gttgtgagca cccagctgt gctgaacggc agcctggccc aggggggcat catcatccg
841 agcgagaacc tgaccgagaa caccagacc atcatctgfc accgaaacga gacgtggag
901 atcaactgca cccgcccaaa caacaacacc cgcgaagcgc tggcctacgg ccccgccag
961 gctctctac ccaccaacga cgtgatcggc aacatccgc agccctact caacatcagc
1021 accgaccctt ggaacaagc cctgcagcag gtatgaaga agctggggca gcaactcccc
1081 aacaagacca tcaagtcca gccaccgcc gggcggaacc tggagatcac catgcaacg
1141 ttaactgcc gggcgagtt ctctactg aacaccaga acctgttca cagcaactc
1201 cacagaaca accgcaacta caagtaca gcaacagca gcagccccat caccctgacg
1261 tgaagatca agcagatgt ggcctgtgg cagctgtgg gcaagccac ctaccgcccc
1321 cccatgccg gcaacatac ctgcgcagc aacataccg gcaatctgt gaccggcagc
1381 ggcgcttca acaccacca caaacccag acctccgcc cggcgccggc gcacatgccc
1441 gacaactgca gcaagcagct gtaacatg aaggtgtgtg agatcaagc cctggctac
1501 gcccccaca aggcacagc cccgtgtgtg cagcgcgaga agcgcgccc gggcatcggc
1561 gccgtttcc tggcttctt gggcgccc ggcacacca tggcgccc cagcatcacc
1621 ctgaccctg agcccacca gctctgagc gcaatctgfc agcagcagc caactctg
1681 aaggccatc agcccaaga gcaactgtc cagctgacc tgggggcat caagcagctg
1741 caggcccgc tgcctgcat cagcagctc tgaaggacc agcagctgt gggcatcgg
1801 gctctgagc gccgctgt ctgaccacc gccgtgcc ggaacagcag ctggagcaac
1861 aagagcgaga agaacatct ggaacaactg acctggatg agtgggacc cagatcagc
1921 aactacacc gctgatcta caactctg gaggacagc agaaccagca ggaagaagc
1981 gagaagacc tctggagct ggaacgtgg aacaactgt ggaactggt cgacatcagc
2041 aactggccc ggtactata a

【 図 1 1 1 】

FIGURE 111 ( 配列番号 190 )

gp140mod.TV1.GM-V1V2

1 atgcgcgtga tgggcacca gaagaactgc cagcagtggt ggaatctggg catcctgggc
61 ttctggtgac tgaatgctg caaacaccag gacctgtggg tgaacctgta ctacgcctg
121 cccgtgtggc gcaagcccaa gaccaccctg ttctggccca gcaagcccaa ggcctacgag
181 accgaggtgc acaactgtgt ggcaccaccac tccctgtgfc ccaccgacc caaccaccag
241 gagatcgtgc tgggcaactg gaccgagaac ttaacatgt ggaagaacga catggccgac
301 cagatgcacg aggcagtgat cagctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg
361 acccccctgt gctgacct gaatgcacc gacacaacg tgaccggcaa ccgaccctg
421 accggcaaca gcaaccaaa caccaccgcc accgcaatc acaacatga ggaatgag
481 cagtcagct tcaacgccac caccagctg cgcgacaaga agcacaagga gtaccgctg
541 ttaccgccg tggacatgt gccctgaa gagaacagc accagttaac ctaccgctg
601 atcaactgcc agaccagacc catcaccag gctgcgccca aggtgagctt cgaccctac
661 cccatccact actgcgcccc cgcggctac gccatctga agtgcacaac caagaccctc
721 aacggcaacc gccctgcta caactgtgac accctgtggt gcaaccaccg catcaagccc
781 gttgtgagca cccagctgt gctgaacggc agcctggccc aggggggcat catcatccg
841 agcgagaacc tgaccgagaa caccagacc atcatctgfc accgaaacga gacgtggag
901 atcaactgca cccgcccaaa caacaacacc cgcgaagcgc tggcctacgg ccccgccag
961 gctctctac ccaccaacga cgtgatcggc aacatccgc agccctact caacatcagc
1021 accgaccctt ggaacaagc cctgcagcag gtatgaaga agctggggca gcaactcccc
1081 aacaagacca tcaagtcca gccaccgcc gggcggaacc tggagatcac catgcaacg
1141 ttaactgcc gggcgagtt ctctactg aacaccaga acctgttca cagcaactc
1201 cacagaaca accgcaacta caagtaca gcaacagca gcagccccat caccctgacg
1261 tgaagatca agcagatgt ggcctgtgg cagctgtgg gcaagccac ctaccgcccc
1321 cccatgccg gcaacatac ctgcgcagc aacataccg gcaatctgt gaccggcagc
1381 ggcgcttca acaccacca caaacccag acctccgcc cggcgccggc gcacatgccc
1441 gacaactgca gcaagcagct gtaacatg aaggtgtgtg agatcaagc cctggctac
1501 gcccccaca aggcacagc cccgtgtgtg cagcgcgaga agcgcgccc gggcatcggc
1561 gccgtttcc tggcttctt gggcgccc ggcacacca tggcgccc cagcatcacc
1621 ctgaccctg agcccacca gctctgagc gcaatctgfc agcagcagc caactctg
1681 aaggccatc agcccaaga gcaactgtc cagctgacc tgggggcat caagcagctg
1741 caggcccgc tgcctgcat cagcagctc tgaaggacc agcagctgt gggcatcgg
1801 gctctgagc gccgctgt ctgaccacc gccgtgcc ggaacagcag ctggagcaac
1861 aagagcgaga agaacatct ggaacaactg acctggatg agtgggacc cagatcagc
1921 aactacacc gctgatcta caactctg gaggacagc agaaccagca ggaagaagc
1981 gagaagacc tctggagct ggaacgtgg aacaactgt ggaactggt cgacatcagc
2041 aactggccc ggtactata a

【 図 1 1 2 】

FIGURE 112 ( 配列番号 191 )

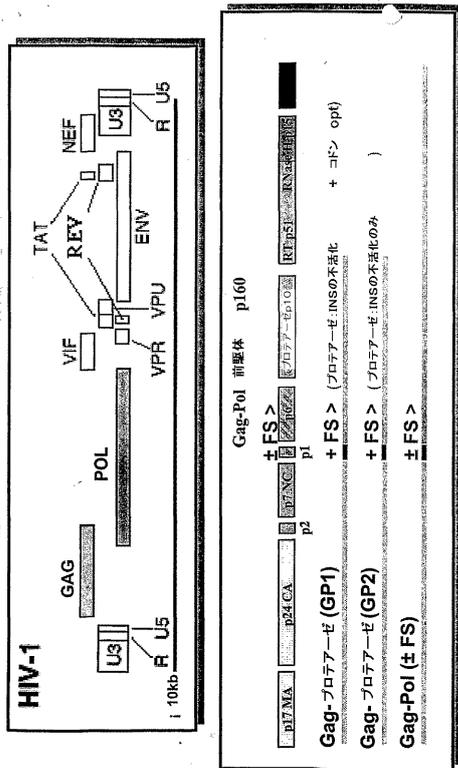
gp140mod.C8.2mut7.delV2.Kozmod.Ta

1 gccaccatgc gctgatggg caccagaag aactgccagc agtggatgat ctggggcacc
61 ctggcttctt ggaatctgat gatctgca accgagacc tgggtgtgac cgtgtactac
121 ggcgtcccg tggcgccga cccaagacc acctgttct gcccagcga cccaagacc
181 lacgagacc agtgcacaa cgttggccc accaccgctt gctgcccac cgaaccaca
241 ccccaggaga tctgtggg caactgacc gagaactca acatgtgaa gaacacatg
301 gccacacga tgcagagga cgtgatcagc ctgtggacc agacctgaa gccctgctg
361 aagtgacc cctgtgctt gacctgacc tgcaccaga ccaactgca ccggaccgc
421 accgtacc gcaacagc caacaacacc aacggcacc gcaatcaaa catgagcag
481 atgaagaact gcaacttca cgcggccc gcccccga tcaactgaa caccagacc
541 atcaaccagg cctgcccga gttgacttc gaaccctac tcaactgaa ctggccc
601 gccgctac ccatctgaa gtcacaac aagacttca accgaccgc cccctgctc
661 aactgagca cctgtgact caaccagc atcaagccc tgggtgac caagcctg
721 ctgaagcga gctggccc gaggccatc atcatcga gcgagacc gaccgagac
781 aacaagca tcaatgca ctgaacag agcgtggga tcaactgac ccgcccaac
841 aacaacacc gcaagact ggcactgccc cccgcccag ccttctacc caaccaagc
901 gtagcagca acatcgca gccaccagc aacatcaga ccgaccctg gaaacagc
961 ctgacgagc tgaatgaa gctggccag caactccca acaagacc ctgctgacg
1021 ccccagcgc ggcggacc ggaataacc atgcaagct tcaactgccc cgcagctg
1081 ttactgca acaccaga cctgttacc agcaactac acagaacaa cggccactc
1141 aagtacaac gcaacagca gcccaccac acctgact gcaatgca cgaatctg
1201 gcaatgca agggctgg cagcccacc tacgcccac ccatcggc caatacacc
1261 tggcgaga acatacagc catctgctg acccgagc gggcttca caccacaac
1321 aacaccaga ccttccc cggcgccc gacatgccc acaactgccc cagcagctg
1381 tacaatgca agtgggga gataagcc ctggccatg ccccacaa ccaacaaac
1441 agctgtgag agagcaga gacgcccgg ggaatggcc cgtgttctt gggcttctg
1501 ggcggccc gcaacacat gggcgccc agatcaacc tgaactgca gggcgccag
1561 ctgctgagc gcaatgca gcaagagc aactgctga agccatca gggccagc
1621 caatgtgc agtgcact gttggcacc agcagctg agcagctg agggcctg
1681 gacagctc tgaagcaga gcaatgct ggcctgagc tggacacga agcagcaga ccactgctg
1741 gcaacatga cctgagca gttggccc gcaatgca actacacc cctgactac
1861 aactgtgag agcagcga ccaaccag gagaagacc agaagacc gctggagctg
1921 gcaagtgca acaactgt gaaactgca gcaatgca actgcccct gtaactaa
1981 a



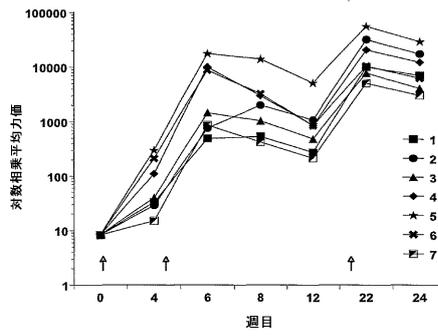
【 図 1 1 8 】

Figure 118  
(シート101)



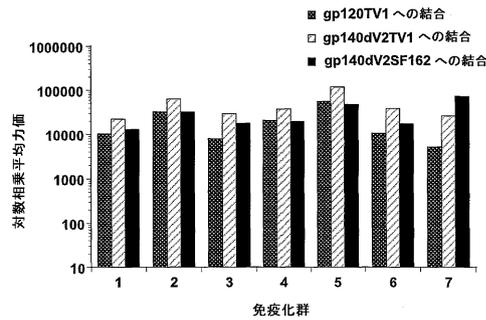
【 図 1 1 9 】

Figure 119



【 図 1 2 0 】

Figure 120



【 図 1 2 1 】

Figure 121

群	動物	ウイルス阻害 %			
		第2回後 DNA (1:20)	第2回後 DNA (1:100)	Prot後 (1:100)	Prot後 (1:500)
1	1	0	60	0	17
	2	34	59	50	21
	3	0	0	12	38
	4	95	92	83	57
2	5	100	89	99	99
	6	0	28	27	35
	7	0	0	43	0
	8	95	38	79	74
3	9	40	0	61	26
	10	0	0	0	0
	11	94	41	91	57
4	12	0	0	12	19
	13	100	86	78	18
	14	20	0	68	0
	15	99	70	100	31
	16	0	33	0	24
	17	100	67	100	75
	18	69	36	100	53
5	19	58	33	NA	NA
	20	99	80	92	39
	21	NA	NA	NA	NA
	22	78	12	100	88
6	23	67	63	92	17
	24	70	62	77	0
	29	100	100	74	68
	30	81	63	55	28
	31	100	79	100	91
	32	100	78	100	45
	サブ日陽性 血清	20480	100	100	100

【 図 1 2 2 】

Figure 122

群	動物	ウイルス阻害 %		ELISA 力値	
		TV1	TV2		
1	1	0	38	19716	
	2	25	67	37994	
	3	0	0	7529	
	4	0	79	41963	
2	5	30	51 <sup>a</sup>	112768	
	6	0	0	57677	
	7	23	9	26247	
	8	47	78	90376	
3	9	0	42	62004	
	10	13	0	5741	
	11	0	36 <sup>b</sup>	53599	
	12	21	12	37597	
4	13	0	22 <sup>b</sup>	45543	
	14	0	0	24885	
	15	0	17 <sup>a</sup>	87556	
	16	28 <sup>a</sup>	59	19838	
5	17	72	80	124618	
	18	0	77	143905	
	19	NA	NA	NA	
	20	19	56 <sup>b</sup>	91808	
6	21	NA	NA	NA	
	22	34	44	31413	
	23	51	50 <sup>a</sup>	62925	
	24	22	31 <sup>a</sup>	28820	
サブ日陽性 サブC陽性プール	29	0	9	62604	
	30	0	50 <sup>a</sup>	15932	
	31	0	58	22418	
	32	41	0	21119	
	サブ日陽性 サブC陽性プール		46	56	NA
	サブ日陽性 サブC陽性プール		36	85	NA

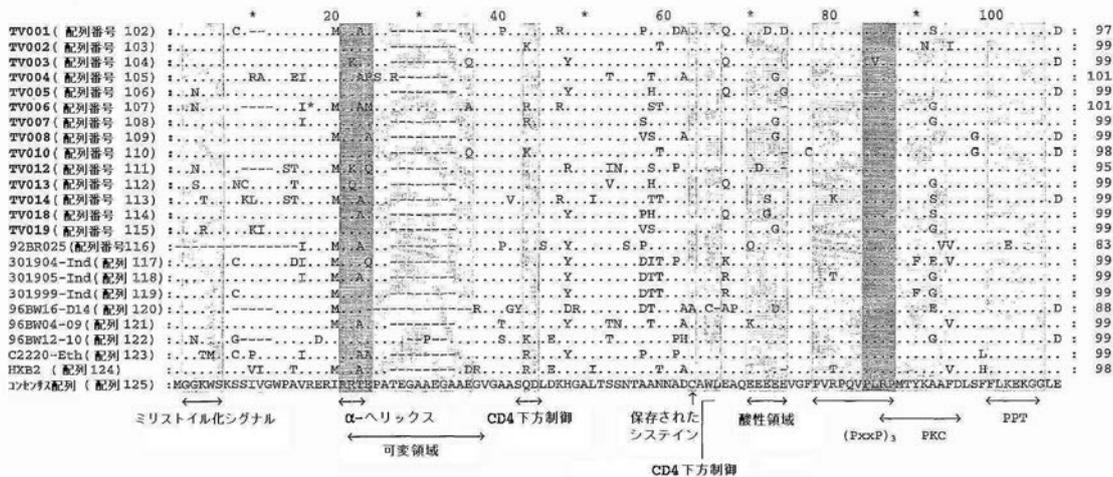
【 図 1 2 3 】

Figure 123

群	動物	ウイルス阻害 %			
		TV1	Du174	SF162	ELISA 力価
1	1	28	20	12	19716
	2	33	19	9	37994
	3	0	0	0	7529
	4	52	61	79	41963
2	5	33	0	95	112768
	6	3	0	14	57677
	7	0	0	0	26247
	8	54	0	86	90376
3	9	0	52	73	62004
	10	0	58	15	5741
	11	0	0	71	53599
	12	0	0	0	37597
4	13	15	0	69	45543
	14	0	0	0	24885
	15	0	13	0	87556
	16	14	0	0	19638
5	17	0	0	0	124618
	18	0	0	30	143905
	19	NA	NA	NA	NA
	20	63	0	56	91808
6	21	NA	NA	NA	NA
	22	24	NV	38	31413
	23	7	65	76	62925
	24	0	NV	NV	28620
7	29	32	0	82	62604
	30	6	NV	0	15932
	31	0	0	98	22418
	32	34	0	0	21119

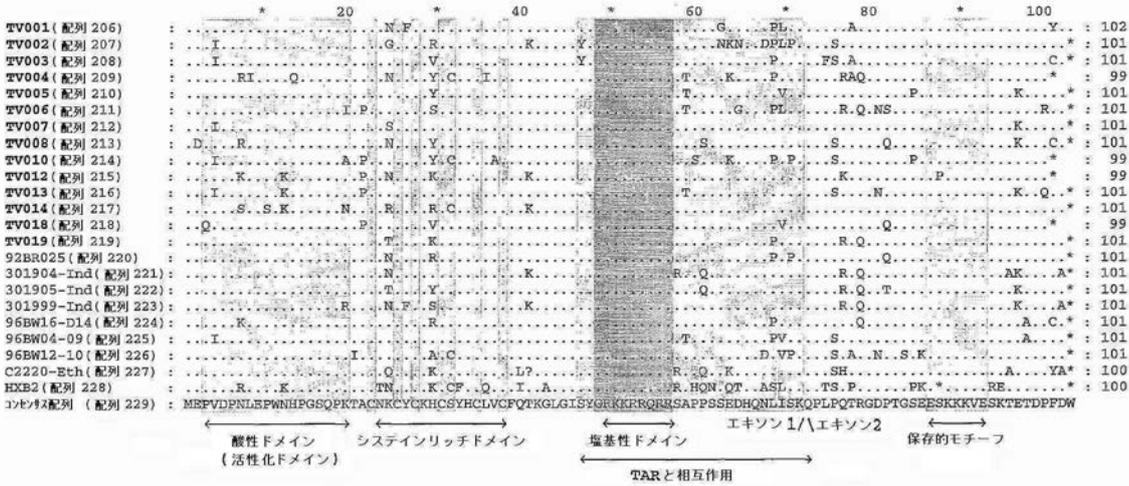
【 図 9 9 a 1 】

Figure 99a1: Nef



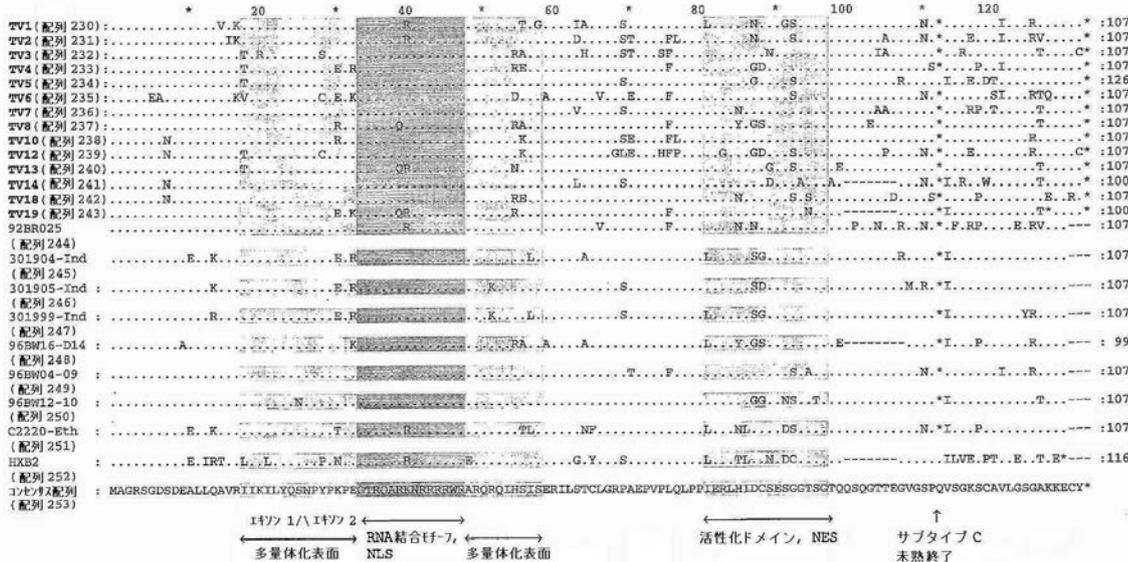
【 図 99 b 】

Figure 99b: Tat



【 図 99 c 】

Figure 99c: Rev



【 配列表 】

201208089500001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 C 0 8 7
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 3	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
C 0 7 K 14/16 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
	A 6 1 K 35/12	
	C 0 7 K 14/16	

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ヤン ツア メデゲ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 , エミリーヴィル , ホートン ストリート 4  
5 6 0 - アール 4 4 0 , カイロン コーポレーション気付

(72)発明者 スーザン ダブリュー . バーネット

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 , エミリーヴィル , ホートン ストリート 4  
5 6 0 - アール 4 4 0 , カイロン コーポレーション気付

(72)発明者 リアン イン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 , エミリーヴィル , ホートン ストリート 4  
5 6 0 - アール 4 4 0 , カイロン コーポレーション気付

(72)発明者 スーザン エンゲルブレヘト

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

(72)発明者 エストレリタ ヤンセ ファン レンスブルク

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

(72)発明者 トマス ジェンス スクリバ

イギリス国 オーエックス1 3 エスワイ オックスフォード , サウス パークス ロード ,  
ザ ピーター メダワー ビルディング フォー パソジェン リサーチ

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA35 CA04 DA02 EA04 GA11

4B065 AA90X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C076 AA19 AA95 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB30 BB31 DD21

EE57 FF34 FF68

4C084 AA01 AA02 AA03 AA13 BA01 MA05 MA24 MA56 MA63 MA65

MA66 NA10 NA13 ZB071 ZB331 ZC551

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA24 MA55 MA56 MA63 MA65

MA66 NA10 NA13 ZB07 ZB33 ZC55

4C087 AA01 AA02 BB64 BC83 CA04 CA12 MA05 MA24 MA55 MA56

MA63 MA65 MA66 NA10 NA13 ZB07 ZB33 ZC55

4H045 BA10 CA05 DA86 EA20 FA74