

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4178029号
(P4178029)

(45) 発行日 平成20年11月12日(2008.11.12)

(24) 登録日 平成20年8月29日(2008.8.29)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00

請求項の数 15 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-555262 (P2002-555262)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月8日(2002.1.8)
 (65) 公表番号 特表2004-516846 (P2004-516846A)
 (43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2002/000031
 (87) 国際公開番号 W02002/053757
 (87) 国際公開日 平成14年7月11日(2002.7.11)
 審査請求日 平成15年11月13日(2003.11.13)
 (31) 優先権主張番号 2001/00894
 (32) 優先日 平成13年1月8日(2001.1.8)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

微生物の受託番号 KCCM 10233
 微生物の受託番号 KCCM 10234
 微生物の受託番号 KCCM 10348

(73) 特許権者 503246842
 キム, チョル-ジュン
 大韓民国, 305-345 テジョン, ユ
 ソン-ク, シンソン-ドン, ハンウル ア
 パートメント 103-801
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人原謙三国際特許事務所
 (74) 代理人 100113701
 弁理士 木島 隆一
 (74) 代理人 100116241
 弁理士 金子 一郎
 (72) 発明者 キム, チョル-ジュン
 大韓民国, 305-345 テジョン, ユ
 ソン-ク, シンソン-ドン, ハンウル ア
 パートメント 103-801
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV様粒子及びその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

HIV-1のenv遺伝子(6264-8879bp)が第1のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、HIV-1のgag遺伝子(832-2328bp)が第2のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、HIV-1のpro遺伝子(2268-2606bp)が第3のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結された、セムリキ森林ウイルス(SFV)をベースとした発現ベクター。

【請求項2】

請求項1において、前記発現ベクターはpSFV/env-gag-proであることを特徴とする発現ベクター。

10

【請求項3】

HIV-1のenv遺伝子(6264-8879bp)が第1のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、HIV-1のgag遺伝子(832-2328bp)が第2のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、HIV-1のgagpro遺伝子(832-2577bp)が第3のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結された、SFVをベースとした発現ベクター。

【請求項4】

請求項3において、前記発現ベクターはpSFV/env-gag-gagpro、およびpSFV/env-gag-gagproから選択されるものであることを特徴と

20

する発現ベクター。

【請求項 5】

H I V - 1 の g a g p o l 遺伝子 (8 3 2 - 5 1 3 2 b p) が第 1 のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、H I V - 1 の e n v 遺伝子 (6 2 6 4 - 8 8 7 9 b p) が第 2 のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結された、S F V をベースとした発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 において、前記発現ベクターは p S F V / g a g p o l - e n v であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項において、C T E (constitutive transport element) 遺伝子をさらに含むことを特徴とする発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 7 において、前記発現ベクターは p S F V / e n v - g a g - g a g p r o - C T E、p S F V / e n v - g a g - g a g p r o - C T E、p S F V / g a g p o l - e n v - M C T E から選択されるものであることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 9】

寄託番号 K C C M - 1 0 2 3 3、K C C M - 1 0 2 3 4、または K C C M - 1 0 3 4 8 で寄託された発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項による発現ベクター又はその R N A 転写物を動物細胞に導入して発現させることを特徴とする H I V 様粒子 (H I V L P) の製造方法。

【請求項 11】

請求項 10 において、前記 H I V 様粒子は成熟 H I V 様粒子、または感染性成熟 H I V 様粒子であることを特徴とする製造方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 13】

免疫反応を起こすのに十分な量の、請求項 11 に記載の製造方法によって製造された成熟 H I V 様粒子を含むことを特徴とする A I D S ワクチン組成物。

【請求項 14】

請求項 11 の方法によって製造された成熟 H I V 様粒子を含むことを特徴とする H I V 感染を診断するための診断用キット。

【請求項 15】

(a) H I V 特異的抗体を含有するものと期待されるサンプルを採取する段階と、(b) 段階 (a) から採取されたサンプルを抗原として請求項 11 の方法によって製造された成熟 H I V 様粒子と、抗原と抗体との結合がなされるようにして抗原 - 抗体免疫複合体を形成させる条件の下で接触させる段階と、(c) 免疫複合体の形成を検出する段階とを含むことを特徴とし、サンプル中で H I V レトロウイルス抗原と特異的に反応する抗体の存在を決定する方法。

【発明の詳細な説明】

〔技術分野〕

本発明は、H I V の G a g 蛋白質を発現させる発現ベクター、H I V の E n v 蛋白質を発現させる発現ベクター、H I V の G a g と E n v 蛋白質とを同時に発現させる発現ベクター、H I V の G a g p o l ポリプロテインを発現させる発現ベクター、及び H I V の G a g p o l ポリプロテインと E n v 蛋白質とを同時に発現させる発現ベクターに関するものである。

【0001】

〔背景技術〕

H I V - 1 (Human Immunodeficiency Virus-1) は、後天性免疫不全症候群 (Acquired Imm

10

20

30

40

50

unodeficiency Syndrome:以下、「AIDS」という)の病因源である。HIV-1はHIV-2と共にレトロウィルスのレンチウイルス(Lentivirida)に属し、感染性ビリオンは2つの同一の一重鎖(single-stranded)からなるRNA(+)ゲノムをもっている。HIV-1が細胞に感染すると、前記RNA(+)ゲノムがコードする逆転写酵素(reverse transcriptase)によってRNAが二重鎖DNA(double-stranded DNA)に転換され、このDNAが宿主細胞の染色体に挿入されてプロウィルスを形成することになる。

【0002】

HIV-1ゲノム(9.2kb)はgag、pol、envの構造遺伝子(structural gene)とtat、rev、nef、vif、vpr、vpxなどの付随遺伝子(accessory gene)とから構成されている。図1にHIV-1のゲノム構造を図式化した。

10

【0003】

HIVのGag蛋白質は、gag-polの全長RNAから55kDaの前駆蛋白質(Pr55gag)として発現される。蛋白質のN末端にミリスチン化されており、これにより原形質膜の内側にターゲットされてウィルス粒子を形成する。Pr55gagはpol遺伝子によって発現されるウィルスプロテアーゼ(Pro)によってマトリックス(MA、p17)、カプシド(CA、p24)、ヌクレオカプシド(NA、p9)及びp6の蛋白質でプロセッシングされて成熟化する(Gheysen D. et al, Cell, 59, 103-112 (1989); Bray, M. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1256-1260 (1994); Cann, A. J., and J. Karn, AIDS 3(Suppl.1), S19-S34 (1989); Ratner, L., W. et al., Nature 313, 277-284 (1985); Wain-Hobson, S. et al., Cell 40, 9-17 (1985))。

20

【0004】

皮膜糖蛋白質(envelope glycoprotein)Envは、スプライシングされたRNAから、gp160と呼ばれる前駆体として発現される。細胞内で宿主又はウィルスのプロテアーゼによってN末端のgp120とC末端のgp41蛋白質に切断され、このように生成されたgp120は細胞膜外部(external surface domain)に存在する糖蛋白質サブユニットを形成し、gp41は膜貫通領域(transmembrane domain)を構成する。成熟ビリオンではgp120とgp41が非共有結合してヘテロ二量体(heterodimer)を形成しているが、これらはHIVの感染性、細胞指向性(cellular tropism)及び細胞病理(cytopathogenicity)に直接関与するものと知られている(Robey, E. and Axel, R., Cell 60, 697-700(1990))。このようにHIVのEnv蛋白質は、抗原性と密接した関連があるため、HIVワクチンの製造において最も重要な研究対象である。

30

【0005】

プロテアーゼ(Pro)はgag mRNAの3'でリボソームフレームシフト(ribosomal frame shift)が生じて作られる前駆蛋白質(Pr160gag-pol)から自己切断されて生成される(Jacks, T. and Varmus, H. E. Science, 230, 1237-1242 (1985); Jacks, T. et al, Nature (Lodon), 331, 280-283 (1988); Sonigo, P. et al, Cell, 45, 375-385 (1986))。ProはPr160gag-polポリプロテインの切断及びEnvのプロセッシングに関与し、ウィルス粒子の成熟(maturation)と感染(infectivity)に重要な役割を果たすものと報告されている(Kohl, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, 4686-4690 (1988))。

40

【0006】

これまでAIDSワクチンとして開発されたものには、不活化ワクチン、弱毒化ワクチン、組換え生ワクチン、ウィルス様粒子ワクチン、サブユニットワクチンなどがある。次に、各ワクチン分野で試みられてきた技術を紹介する。

【0007】

「不活化ワクチン(Inactivated Whole virus vaccine)」は、分離したウィルス粒子を化学的又は物理的に処理して感染性を失わせたものである。製造容易で、略全てのエピトープを使用することが不可能な利点がある反面、ウィルスを完全に不活性化させていない場合には疾病を誘発するおそれがあり、逆に完全に不活化させるために強力な処理を行う場合にはエピトープが破壊されるという欠点がある。文献にSIVの感染試験に成功した例

50

が報告されたことがあるが (Scott E. J. Nature, 253, 393 (1991); Le Grand R. et al., Nature, 355, 684 (1992); Crange M. P. et al., Nature, 355, 685-686 (1992); Arthur L. O., et al., J virol, 69, 3117-3124 (1995); Neidrig M., et al., Vaccine, 11, 67-74 (1993))、その結果が培養宿主細胞の異種抗原(xeno-antigen)によるものという疑問が提起されているので、未だ成功段階にあるワクチンとは認められない。

【 0 0 0 8 】

「弱毒性ワクチン(Live attenuated vaccine)」は、例えば *n e f* 遺伝子又は *n e f* と *v p r* 遺伝子を同時に欠乏させたように、H I V 遺伝子の一部を欠損させたものであるが (Descrosiers RC., AIDS Res Hum Restroviruses, 8, 411-421 (1992); Gibbs J. S. et al., AIDS Res Hum Retroviruses, 10, 607-616(1994); Cranage M. P. et al., Virology, 229, 143-154 (1997); Wyand M. S., et al., Nature Med, 3, 32-36 (1997))、ウイルスが動物体内で欠損した遺伝子を再び獲得する場合に病原性を示すので、安定性に問題がある比較的開発初期段階の技術であると言える。

【 0 0 0 9 】

「組換え生ワクチン(Live recombinant vaccine)は、非病原性ウイルスの非必須遺伝子をH I V 抗原で代替させた形態のワクチンである。文献には、ワクチニアウイルス(vaccinia virus)、ポックスウイルス(poxvirus)、カナリヤポックスウイルス(canarypox virus)、アビポックスウイルス(avipox virus)、ポリオウイルス(poliovirus)、インフルエンザウイルス(Influenza virus)などで *g a g*、*p o l* 又は *e n v* などの遺伝子を発現させ、或いはH I V の *V 3 l o o p* などを含む抗原性部位をキメラ蛋白質の形態で発現させた例が報告されている(Tartaglia J. et al., Virology, 188, 217-232 (1992); Abimiku A., et al., Nature Med, 1, 321-329 (1995); Natuk RJ. et al., AIDS Hum Retroviruses, 9, 395-404 (1993); Li S. et al., J Virol, 67, 6659-6666(1993); Muster T. et al., J Virol 69, 6678-6686 (1995))。この技法は一般に全体抗原の一部のみをワクチンとして用いるため、良い免疫源を提供するものとは考えられず、構成されたベクターが時々不安定であるという欠点がある (Morrow C. D. et al., AIDS Res Hum Retroviruses, 10, S61- S66 (1994); Anderson M. J. et al., AIDS Res Hum Retroviruses, 13, 53-62 (1997))。

【 0 0 1 0 】

天然から分離し或いは遺伝工学的に発現させたH I V のサブユニットをワクチンとして用いる「サブユニットワクチン(subunit vaccine)」は、比較的容易に作る事ができるという利点があるが、これもH I V 抗原決定部位の一部のみを使用するものであって、全体ウイルス粒子とは異なる立体構造(conformation)を取るという点において制限点を抱えているワクチンである。組換え *E n v* 糖蛋白質 *g p 1 2 0* と *g p 1 6 0* が哺乳動物細胞や昆虫細胞などで発現されたことがあるが (Lasky, L. A., et al., Science, 249, 932-935 (1986); Barr, P. J. et al., Vaccine, 5, 90-101 (1987); Hu, S-L. et al., J. Virol., 61, 3617-3620 (1987); Rusche, J. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 6924-6928 (1987); Berman, P. W., et al., J. Virol., 63, 3489-3498 (1989); Ivey-Hoyle, M., and Rosenberg, M., Mol. Cell. Biol., 10, 6152-6159 (1990); Lasky, L. A. et al., Cell, 50, 975-985 (1987))、C H O 細胞で発現された *g p 1 2 0* はチンパンジーにおけるチャレンジ(challenge)実験では失敗した (Berman, P. W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 5200-5204 (1988))。

【 0 0 1 1 】

ワクチンをウイルス粒子の形態で提供すると、サブユニット形態の抗原を提供することより免疫源が高く安定である。従って、遺伝子を含んでいない非感染性「ウイルス様粒子(V L P; Virus-like particle)」をワクチンとして用いる方法が最近開発された。パッケージング遺伝子に変異が起こった結果、ゲノムR N A のないV L Pを生産し、或いは組換えバキュロウイルス又はワクチニアウイルスを用いて、プロセッシングされていない *G a g* 蛋白質で構成されたV L Pを製造したことがその例である (Gorelink R. J. et al., J Virol, 64, 3207-3211(1990); Gheysen D. E. et al., Cell, 59, 103-112(1989))。

文献は (Haffar O. K. et al., Virology, 183, 487-495(1991)) g a g - p o l 遺伝子と e n v 遺伝子を含む2つの組換えワクチニアウィルスを同時に感染させ、遺伝子のないウィルス様粒子を生産したことを報告している。ところが、このようなシュード粒子 (pseudo-particle) は、体内で中和抗体、シンシチウム抑制 (syncytium inhibiting)、e n v - C D 4 防御抗体などを生成することに成功したが、成熟したウィルス粒子ではなく、かつ感染性が欠乏しているという制限がある。

【 0 0 1 2 】

V L P 形態のワクチンとしては、この他にも H I V の抗原基を含有するように作製されたポリオウィルスカプシド、H B V コア粒子、H B s A g 粒子又はイーストレトロトランスポゾンウィルス様粒子 (yeast retrotransposon virus-like particle) などのハイブリッド粒子があるが、これらもウィルス様粒子に挿入できる抗原基部位が制限されるという限界点を克服できなかったものである (Greene E. et al., AIDS Res Hum Retroviruses, 13, 41-51(1997); Schlienger K., et al., J Virol, 66, 2570-2576 (1991); Adams S. E. et al., Nature 329, 68-70 (1987); Layton G. T. et al., J Immunol, 151, 1097-1107 (1993); Eckart L. et al., J Gen Virol, 77, 2001-2008 (1996))。

10

【 0 0 1 3 】

本発明者は、新しい A I D S ワクチンを開発する試みであって、 - ウィルスベクターシステムを用いて、成熟ウィルス様粒子形態のワクチンを製造することにより、A I D S 疾病を予防する方法を提供することになった。

【 0 0 1 4 】

〔発明の開示〕

本発明は、H I V の G a g 蛋白質を発現させる発現ベクター、H I V の E n v 蛋白質を発現させる発現ベクター、H I V の G a g と E n v 蛋白質を同時に発現させる発現ベクター、H I V の G a g p o l ポリプロテインを発現させる発現ベクター、及び H I V の G a g p o l ポリプロテインと E n v 蛋白質とを同時に発現させる発現ベクターを提供することを目的とする。

20

【 0 0 1 5 】

また、本発明の他の目的は、前記発現ベクターで形質転換されたことを特徴とする細胞株を提供することにある。

【 0 0 1 6 】

また、本発明のさらに他の目的は、前記組換え発現ベクター又はその R N A 転写物を動物細胞に導入して発現させることを特徴とする H I V 様粒子 (H I V L P) の製造方法及びその方法によって製造された H I V 様粒子を提供することにある。

30

【 0 0 1 7 】

また、本発明のさらに他の目的は、成熟 (mature) H I V 様粒子を含むことを特徴とする H I V 感染診断用キット及びこれを用いて H I V 疾病の感染有無を診断する方法を提供することにある。

【 0 0 1 8 】

また、本発明のさらに他の目的は、成熟 H I V 様粒子を含むことを特徴とするワクチン組成物、或いは前記発現ベクター及び / 又はその R N A 転写物を含むことを特徴とする A I D S ワクチン組成物を提供することにある。

40

【 0 0 1 9 】

また、本発明のさらに他の目的は、(a) H I V 特異的抗体を含有するものと期待されるサンプルを採取する段階と、(b) 段階 (a) から採取されたサンプルを抗原として本発明の成熟 H I V 様粒子と、抗原と抗体との結合がなされるようにして抗原 - 抗体免疫複合体を形成させる条件の下で接触させる段階と、(c) 免疫複合体の形成を検出する段階とを含むことを特徴とし、サンプル内で H I V レトロウィルス抗原と特異的に反応する抗体の存在を決定する方法を提供することにある。

【 0 0 2 0 】

〔発明を実施するための最良の形態〕

50

本発明は、H I Vの構造蛋白質を発現させる、 ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。本発明のH I VにはH I V - 1、H I V - 2、H T L V - 1又はH T L V - 2のようなヒトレトロウィルスが全て含まれる。

【 0 0 2 1 】

「 ウィルス」とは、当業界で通常 ウィルスとして分類されるウィルス種及びサブタイプをいい、例えば、Eastern Equine Encephalitis virus (EEE), Venezuelan Equine Encephalitis virus (VEE), Everglades virus, Mucambo virus, Pixuna virus, Western Encephalitis virus (WEE), Sindbis virus, South African Arbovirus No. 86, Girdwood S.A. virus, Ockelbo virus, Semliki Forest virus, Middleburg virus, Chikungunya virus, O'Nyong-Nyong virus, Ross River virus, Barmah Forest virus, Mayaro virus, Getah virus, Sagiyama virus, Bebaru virus, Mayaro virus, Una virus, Aura virus, Whataroa virus, Babanki virus, Kyaylagach virus, Highlands J virus, Fort Morgan virus, Ndumu virus, Buggy Creek virus及びその他のウィルス学名に関する国際委員会(International Committee on Taxonomy of Viruses)で ウィルスとして分類したものがこれに含まれる。

10

【 0 0 2 2 】

ウィルス(Alphavirus)は、トガウィルス科(Togaviridae)に属する、皮膜をもっている(+)鎖(positive-strand)RNAウィルスであって、広範囲な細胞(昆虫、鳥類、哺乳類)に感染することができる。ウィルスのRNAゲノムがそれ自体で感染性があり、自らRNAレプリカーゼをコードするため、RNA複製と転写が効率よく行われるシステムである(Liljestrom, P. and H. Garoff, Biotechnology, 9, 1356-1361 (1991))。

20

【 0 0 2 3 】

本発明の ウィルスは、好ましくは「セムリキ森林ウィルス(S F V : Semliki Forest virus)」と、「シンドビスウィルス(Sindbis virus)」である。さらに好ましくは、本発明の ウィルスはS F Vである。本発明の具体例で使用された、S F Vをベースとした発現ベクターp S F Vは、S P 6プロモータを有するプラスミドにS F Vのc D N Aゲノムを挿入したもので、S P 6 7ポリメラーゼを用いて*in vitro*転写が可能であり、構造遺伝子の代わりに挿入された外来遺伝子が2 6 Sサブゲノミックプロモータによって発現できるように変換された発現ベクターである。

【 0 0 2 4 】

感染によって組換えRNAを細胞内に導入させるためには、*in vivo*パッケージングシステムを用いる必要がある。p S F V - h e l p e rはS F VのRNA複製シグナルと構造遺伝子を発現させることが可能な情報を含んでいるが、ゲノミックRNAパッケージングシグナルが欠如しているもので、p S F V - h e l p e rを組換えp S F Vベクターと共に同時トランスフェクションさせると、S F V構造蛋白質内に組換えRNAのみがパッケージングされたウィルス粒子が生成される。前記ウィルス粒子は細胞に感染して組換え遺伝子を発現させるが、再びウィルス粒子を形成することはできない。本発明の実施例で使用されたp S F Vとp S F V - h e l p e rの構造を図2に示した。本発明で 사용되는DNAベクターとそのRNA転写物は全て本発明の範囲に含まれる。

30

【 0 0 2 5 】

本発明の一側面は、H I V - 1のg a g、g a g p r o、e n v、e n vとg a g、e n vとg a gとg a g p r o又はg a g p r o、g a g p o l又はg a g p o lとe n v遺伝子が ウィルスのサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結された発現ベクターを提供する。

40

【 0 0 2 6 】

p r o又は遺伝子を2 6 Sサブゲノミックプロモータの下でそれぞれ挿入してG a g、E n v、P o l又はP r oを発現させる、 ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。P r oの発現はG a g蛋白質の量に依存するものと考えられている (Velissarios K. et al., Virology, 193, 661-671 (1993); Magdeleine H. et al., J Virol. 72, 4819-1824 (1998); Joel G. et al., Virology, 244, 87-96 (1998))。本発明では、G a gの

50

プロセッシングのためにProの発現を極大化するために、env遺伝子の後ろにgagpro又はgagpolの隣接部でフレームシフトされたコドン序列が削除されたgagpro遺伝子をそれぞれ26Sプロモータに連結させ、或いはgagpol遺伝子の後ろにenv遺伝子を26Sプロモータに連結させたベクターを製作した。

【0027】

本発明は、HIV-1のgag遺伝子がプロモータの下で作動できるように連結された(operably linked)、ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。本分野において、「作動できるように連結された」とは一般に連結されたDNA序列が相互接触し、リーディングフレーム内に存在することを意味し、このような意味は同様に本願にも適用される。pSFV/gagは前記ベクターの例である(実施例1)。本発明は、HIV-1のgagpro遺伝子がプロモータの下で作動できるように連結された、ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。pSFV/gagproは前記ベクターの例である(実施例1)。本発明は、HIV-1のenv遺伝子がプロモータの下で作動できるように連結された、ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。pSFV/envは前記ベクターの例である(実施例4)。

10

【0028】

本発明は、HIV-1のenvとgag遺伝子を同時に発現させるウィルスベクター、好ましくはenv遺伝子が第1のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、gag遺伝子が第2のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結された、ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。pSFV-env-gagは前記ベクターの例である(実施例9)。本発明は、HIVのpro遺伝子がプロモータの下で作動できるように連結された、ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。pSFV/proは前記ベクターの例である(実施例9)。

20

【0029】

本発明は、ひいてはHIV-1のenv、gag及びpro遺伝子を同時に発現させるウィルスベクター、好ましくはenv遺伝子が第1のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、gag遺伝子が第2のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、pro遺伝子が第3のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結された、ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。pSFV/env-gag-proは前記ベクターの例である(実施例9)。

30

【0030】

本発明は、HIV-1のgagpro遺伝子及びCTE(Constitutive Transport Element)遺伝子を発現させるウィルスベクター、好ましくはgagpro遺伝子がプロモータの下で作動できるように連結され、CTE遺伝子がさらに連結された、ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。pSFV/gagpro-CTEは前記ベクターの例である(実施例9)。

【0031】

本発明は、HIV-1のenv、gag、gagpro及びCTE遺伝子を発現させるウィルスベクター、好ましくはenv遺伝子が第1のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、gag遺伝子が第2のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、gagpro遺伝子が第3のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、CTE遺伝子をさらに含む、ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。pSFV-env-gag-gagpro-CTEは前記ベクターの例である(実施例12)。

40

【0032】

本発明は、HIV-1のenv、gag及びgagmRNAの3'末端でリボソームフレームシフトが生じなくてもPro蛋白質を生産し得るように、gagとpro遺伝子の接続部で拡散序列の欠損が生じたgagpro遺伝子及びCTE遺伝子を発現させるウィルスベクター、好ましくはenv遺伝子が第1のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、gag遺伝子が第2のサブゲノミックプロモータの下で作動できる

50

ように連結され、g a g p r o 遺伝子が第3のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、C T E 遺伝子をさらに含む、 ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。p S F V / e n v - g a g - g a g p r o - C T E は前記ベクターの例である(実施例13)。

【0033】

本発明は、H I V - 1 の g a g p o l 全長遺伝子を同時に発現させる ウィルスベクター、好ましくはサブゲノミックプロモータの下で前記 g a g p o l 全長遺伝子が作動できるように連結された、 ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。p S F V / g a g p o l は前記ベクターの例である(実施例14)。

【0034】

本発明は、H I V - 1 の g a g 及び e n v 遺伝子を同時に発現させる ウィルスベクター、好ましくは g a g 遺伝子が第1のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、e n v 遺伝子が第2のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、M C T E 遺伝子をさらに含む、 ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。

【0035】

p S F V / g a g - e n v M C T E は前記ベクターの例である(実施例16)。

【0036】

本発明は、H I V - 1 の g a g p o l 及び e n v 遺伝子を同時に発現させる ウィルスベクター、好ましくは g a g p o l 遺伝子が第1のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、e n v 遺伝子が第2のサブゲノミックプロモータの下で作動できるように連結され、M C T E 遺伝子をさらに含む、 ウィルスをベースとした発現ベクターを提供する。p S F V - g a g p o l - e n v M C T E は前記ベクターの例である(実施例16)。

【0037】

本発明のベクターは、当業界に公知になっている遺伝子組換え技術に基づいて、当業者が発明の内容に適した変形を加えて製造することができる。

【0038】

本発明は、前記発現ベクターを用いてH I V - 1 構造蛋白質G a g、P r o 及び/又はE n v (前駆蛋白質及びプロセシングされたサブユニット)を製造する方法を提供する。本発明の ウィルスベクターは、広範囲な範囲の宿主細胞で蛋白質を発現させることができる。本発明は、前記の発現ベクター又はそのR N A 転写物を宿主細胞、好ましくは動物細胞で発現させることにより、H I V - 1 のG a g、P r o 及び/又はE n v 蛋白質を製造する方法を提供する。本発明の動物細胞は、好ましくは鳥類、哺乳動物、爬虫類、両棲類、昆虫又は魚類細胞である。哺乳動物細胞の例としてはヒト、猿、ハムスタ、ネズミ及び豚細胞を挙げることができる。特に、好ましい宿主とベクターシステムの例はB H K / p S F V とC O S / p S F V であるが、本発明の発現システムはこれに制限されない。

【0039】

ウィルス発現ベクター又はそのR N A 転写物は、通常のトランスフェクション方法、例えばD E A E - D e x t r a n、リン酸カルシウム法、好ましくはエレクトロポレーション(electroporation)によって動物細胞、例えばB H K - 2 1 細胞に導入することができる。本発明を例示するp S F V ベクターの場合、エレクトロポレーションによって非常に高い収率でR N A 転写物を宿主細胞に導入することができる。一つ又は二つ以上の同時トランスフェクション(cotransfection)する場合にも、前記方法を使用することができる。エレクトロポレーションを含んだトランスフェクションの技術は当業界に公知になっている。

【0040】

細胞の形質転換は、感染性ウィルス粒子で感染させる場合、その発現効率が増大する。本発明は、ヘルパーウィルスを用いて作った本発明によるR N A 転写物を含んでいる感染性ウィルス粒子を宿主細胞に感染させることにより、前記蛋白質を製造する方法を提供する。前記の方法は、実施例2及び実施例6に例示されている。本発明のベクター転写物又は

10

20

30

40

50

ヘルパーウイルスを用いて作った欠損ウイルス粒子(Defective Virus Particle)の感染によって生産されたH I V - 1蛋白質は、様々な方法によって分離されることができる。分離方法としては当業界に公知になっている様々な方法、例えばイオン交換クロマトグラフィ、親和カラムクロマトグラフィ、ゲル浸透クロマトグラフィなどの方法を使用することができる。

【 0 0 4 1 】

本発明は、前記ベクターのRNA転写物、前記RNAを含んだVLPで一時的に形質転換され、或いは前記ベクターで安定的に形質転換された(permanently transformed)宿主細胞又は細胞株を提供する。前記安定的に形質転換された細胞株は、例えばH I Vのc D N Aゲノムが宿主細胞の染色体に挿入されるために必要なサイトメガロウイルス (cytomegalovirus: C M V)プロモータとr e v独立的な発現のためのC T E (constitutive transport element)遺伝子、選択マーカとしての抗ネオマイシン遺伝子を備えた動物細胞株である。前記C T E遺伝子は、好ましくはM P M V (Mason-Pfizer monkey virus)の遺伝子である。

10

【 0 0 4 2 】

本発明は、前記発現ベクター及び宿主細胞を用いて感染性H I V L Pを製造する方法を提供する。本発明は、G a g蛋白質を発現させるベクターを宿主細胞に導入して、H I VのG a gからなる未成熟ウイルス様粒子(H I V L P)を製造する方法を提供する。H I Vの場合、プロテアーゼによって切断されていないG a gは成熟粒子を形成することができず、未成熟VLPを形成する。「ウイルス様粒子(VLP)」とは、野生型ウイルスと同一ではないが、類似の物理化学的性質を有する粒子をいう。「未成熟ウイルス様粒子(immature VLP)」とは野生のビリオンになるために必要なプロセッシングを完全に経ていないウイルスであって、粒子的構造を形成するものをいう。「レプリコン(replicon)」とは、遺伝子複製に必須的な遺伝子を含有している遺伝体をいい、外来遺伝子を結合させてウイルスを増殖させ、外来遺伝子が発現する発現ベクターとして使用できる。

20

【 0 0 4 3 】

H I VはG a gのみでもウイルス粒子を形成するが、これは未成熟形態であり、感染性(infectivity)を持っていない。H I Vに対する中和抗体のエピトープは皮膜蛋白質に位置するものと知られており、この部分が最も様々なアミノ酸序列(variable sequence)を持っている。したがって、G a gのみからなる組換えウイルス粒子にE n v蛋白質を挿入することはH I Vワクチンを作るための重要な技法の一つであるといえる。本発明はH I Vのg a g遺伝子を含有した前記発現ベクター及びe n v遺伝子を含有した前記発現ベクターを同時トランスフェクションして一つの宿主細胞で2つの蛋白質を同時に発現させることにより、H I VのG a gとE n v蛋白質からなる未成熟ウイルス様粒子(H I V L P)を製造する方法を提供する。

30

【 0 0 4 4 】

同時トランスフェクションによるH I V L Pの製造は煩わしく、効率も低下する。従って、本発明では一つのベクターに2つ或いは3つの目的遺伝子をクローニングした組換えプラスミドを用いて簡便かつ経済的で効率よくH I V L Pを生産、回収できるようにした。従って、本発明は、ウイルスレプリコンにH I Vのg a gとe n v遺伝子をそれぞれのプロモータの下でクローニングした後、このベクターを細胞にトランスフェクションして、H I V - 1のG a gとE n v蛋白質からなる未成熟H I V様粒子(H I V L P)を製造する方法を提供する。

40

【 0 0 4 5 】

H I Vウイルスは、アSEMBL又はバツディング(budding)過程中、或いはその後プロテアーゼによってG a gが切断され、切断された構造蛋白質がさらに再結合することにより、完全な成熟粒子を構成する。G a g蛋白質のみからなるH I V L Pはそのサイズと模様などで天然のH I V L Pとは大きい差異があり、またG a gとE n vからなるH I V L Pもプロテアーゼによってプロセッシングされない限り、成熟ウイルス粒子を形成することができない。効果的な免疫反応を誘導するために、天然に存在するH I Vと最も類似の

50

形態を有する免疫源を提供することが重要であり、よって成熟HIVLPを製造することはHIVワクチンで最も強力な手段を提供することになる。本発明では、HIV-1のGagとPro蛋白質を同時に発現させ、或いはGag、Env及びPro蛋白質を同時に発現させることにより、HIVの成熟HIVLPを製造する方法を開発することになった。「成熟ウィルス様粒子」とは、HIVの場合、ProによってHIVの構造蛋白質が完全にプロセシングされたHIVLPであって、その形態又は大きさが野生型HIVと実質的に類似のウィルス粒子をいう。本発明では、gagpol遺伝子がenv遺伝子と同時に発現される場合、成熟HIVLPが多く生成されることを発見した。

【0046】

HIV様粒子はワクチン又はHIV感染診断用抗原として最も好ましいと言える。ところが、HIV様粒子を作るために必要なGag、Env及び/又はプロテアーゼをそれぞれの発現ベクターによって発現させることは煩わしいうえ、その効率もよくなく、この場合にHIV様粒子を生産する安定的な細胞株を得ることも難しい。本発明では、HIVのGag、EnvとプロテアーゼをHIV様粒子の形成に充分な量で同時に発現させることが可能な、ウィルスをベースとした発現ベクターを成功的に製造し、これから感染性のあるウィルス様粒子を製造及び分離することに成功した。

【0047】

従って、本発明は、ひいては免疫反応を起こすのに充分な量の前記発現ベクター、前記ベクターのRNA転写物又は前記HIVLPを含むAIDS予防用ワクチン組成物、及びこれを投入してAIDS疾病を予防ないし治療する方法を提供する。前記HIVLPには成熟及び未成熟HIVLP、感染性及び非感染性HIVLPが全て含まれる。特に好ましくは成熟HIVLPである。成熟HIVLPをワクチンとして使用する場合、HIVが有する立体構造を提供することができるため、優れた免疫反応を誘導することができる。

【0048】

本発明のワクチン組成物は、生体に適した形態で対象者に投与される。ここで、生体に適した形態とは、疾病の予防ないし治療効果がいずれの毒性効果より高い形で投与される物質の形態をいう。前記物質をいずれの動物、好ましくはヒトに投与することができる。

【0049】

本発明のワクチンは、適した希釈剤、賦形剤及び/又は担体をさらに含むこともできる。好ましくは、前記ワクチンは生体内でワクチンの免疫源性を向上させることが可能な賦形剤を含む。前記賦形剤としては、グラム陰性バクテリアのエンドトキシン中のリピドA部分、マイコバクテリアのトレハロースジマイコレート(trehalose dimycholate)、ホスフォリドリゾレシチン(phospholipid lysolecitin)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(dimethyldioctadecylammonium bromide、DDA)、ある直鎖ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレン(polyoxypropylene-polyoxyethylene、POP-POE)ブロックポリマー、アルミニウムヒドロキシド及びリポソームを含む本技術分野の公知の賦形剤から選択することができる。担体は前記ワクチン組成物を投与された個体内で好ましくない抗体を生成しない限り、いずれの担体を使用してもかまわない。特に塩水、緩衝塩水、及び非特異的な血清アルブミンと混合された塩水を含む多数の適した担体又は希釈剤を本発明で使用することができる。薬剤学的組成物としては補助剤、緩衝剤、抗酸化剤、グルコース、スクロース又はデキストリンのようなカーボハイドレイト、及びEDTAのようなキレート剤を含む以外に水、食塩水、グリセロール、エタノールなどや乳化剤、湿潤剤又はpH調整剤などを含むことができる。ワクチン組成物は免疫反応を増強させるために、アジュバント(adjuvant)を含むことができる。アジュバントの例としてはアルミニウムヒドロキシド(alum)、thr-MDP、nor-MDP、MPT-PEなどを挙げることができる。また、前記ワクチンはGM-CSF、IL-2、IL-12、TNF及びIFNを含む免疫反応を向上させるものと知られたサイトカインを含むことができる。

【0050】

ワクチンの投与量は患者の疾病状態、歳、性別及び体重と患者に所望の反応を誘導するための抗体能のような因子によって様々にすることができる。最適の治療反応を提供するた

10

20

30

40

50

めに投与量療法を調節することができる。例えば、数個の分けられた投与量で毎日投与するか、或いは治療状況の緊急性に依りて投与量を比例的に減少させることができる。前記ワクチンは注射（例えば、皮下、静脈内及び筋肉内）、経口投与、吸入、経皮投与又は座薬のように通常の方法で投与することができる。ブースタ免疫処理は4～6週後に制動することができる。

【0051】

本発明は、HIVの感染を診断することが可能な診断用キット及びこれを用いて疾病を診断する方法を提供する。本発明は、(a)動物、特にヒトから得た生物学的サンプルを前記HIVLPと接触させ、(b)HIVLPとサンプル中の抗体とが結合することを探知することにより、HIVに感染したか否かを診断するキット、及び前記キットを用いてHIVに感染したか否かを診断する方法を提供する。抗原-抗体の結合程度を測定する方法は、当業界に既に十分公知になっている。ELISAはこのために使用可能な一つの方法である。このような診断はまた直接結合法又は競争的結合法によって行われることができる。

10

【0052】

前記と関連した観点として、本発明は(a)HIV特異的抗体を含有するものと期待されるサンプルを採取する段階と、(b)段階(a)から採取されたサンプルを抗原として、請求項18の方法によって製造されたHIV様粒子と、抗原と抗体との結合がなされるようにして抗原-抗体免疫複合体を形成させる条件の下で接触させ、(c)免疫複合体の形成を検出する段階とを含むことを特徴とし、サンプル中でHIVレトロウイルス抗原と特異的に反応する抗体の存在を決定する方法を提供する。

20

【0053】

本発明の成熟HIV様粒子は、酵素連結された免疫吸着検定(ELISA)、RIA及びその他非酵素連結された抗体結合検定を含んだ免疫検定又は抗レトロウイルス(例えばHIV)HIV抗体及びレトロウイルス抗原(例えばHIV)の検出のために、本分野に知られた手続きで免疫源として、すなわち抗原として有用である。ELISA検定において、成熟HIV様粒子は特定の表面、例えばポリスチレン微細力価平板のウェルのように蛋白質と結合することが可能な表面上に固定される。洗浄によって、不完全に吸着した成熟HIV様粒子を除去した後、試験サンプルと抗原的に中性であると知られたウシ血清アルブミン(BSA)又はカゼインの溶液のような非特異的蛋白質を特定の表面上に結合させることができる。これは、固定化がなされる表面上に非特異的吸着部位を遮断させることにより、その表面上に抗血清の非特異的結合によって発生する背景を減少させる。

30

【0054】

次に、固定化がなされる表面を、免疫複合体(抗原/抗体)を形成させる方式で検索しようとする臨床学的材料又は生物学的材料のようなサンプルと接触させる。これはBSA、ウシガンマグロブリン(BGG)及び/又はホスフェート緩衝塩水(PBS)/ツイーン(Tween)の溶液のような希釈剤でサンプルを希釈させることを含むことができる。その後、サンプルを、例えば約25、37の温度で順次約2～4時間培養する。培養後、サンプルの接触表面を洗浄して非免疫複合体化された物質を除去する。洗浄手続きはPBS/ツイーンのような溶液又は硼酸塩緩衝液で洗浄することを含むことができる。

40

【0055】

試験サンプルに結合した本発明の成熟HIV様粒子の間に特定の免疫複合体を形成し、洗浄した後、免疫複合体形成の頻度及び場合によって量を、この免疫複合体を第1抗体に対して特異性を有する第2抗体に適用することにより決定することができる。試験サンプルがヒトから由来されたものである場合、第2抗体はヒト免疫グロブリン、一般にIgGに対して特異性を有する抗体である。検出手段を提供するために、第2抗体は、例えば適切な発色基質と培養した際に色を展開する酵素活性のような関連した活性を持つことができる。その後、例えば可視光線分光光度計を用いて発色程度を測定することにより定量することができる。

【0056】

50

複数のH I V分離体を認知する抗体を同定することが要求される一つの診断様態として、本発明の免疫学的に区分される複数の成熟H I V様粒子を特定の表面上に固定させる。この方法として、抗H I V抗体がいろいろのH I V分離体の間に高度に保存されているエピトープを認知する際、一つ又は限定された数の成熟H I V様粒子を固定させることができる。単一のH I V分離体(例えば、L A 1、M N、S F 2又はH X B 2)を認知する抗体を特異的に同定することが要求される他の診断様態として、本発明の単一の特定成熟H I V様粒子を固定させることができる。このような追加の診断様態は、抗体反応を含んだ免疫反応の誘発を担当する特定のH I V分離体を決定するのに重要な医薬、臨床試験、法医学分野で特定の用途を有する。

【0057】

追加の診断様態として、免疫学的に区分されるH I V、例えばそれぞれ異なる部類に属するH I V分離体を特異的に同定することが必要であることもある。免疫学的に区分されるH I V分離体は、例えばL A 1、M N、S F 2、H X B 2、又は原始H I V - 1分離体を含むことができる。このような診断様態において、本発明の特定成熟H I V様粒子はこのような免疫学的に区分されるH I V分離体を特異的に認知するモノクローナル抗体を含んだ抗体の生成に有用である。

【0058】

免疫学的に区分される成熟H I V様粒子が、例えばワクチン又は診断剤において免疫源として使用できることは当然である。交差分離体の保護及び/又は診断を提供するために、成熟H I V様粒子の混合物を使用する状況があり得る。このような場合、免疫源の混合物は通常「カクテル」製剤という。

【0059】

追加の診断学的様態として、本発明の免疫学性組成物は、個別的に又はカクテル製剤を含む混合物であって、生物学的サンプルを含んだサンプル中でH I V又は抗原を検出し或いはH I Vを中和させるために使用できるH I V抗原特異的抗体(モノクローナル抗体を含む)の生成のために有用である。

【0060】

さらに他の診断学的様態として、本発明の成熟H I V様粒子は、例えば診断又は治療のためのH I V感染者から採取した生物学的サンプル中でH I V特異的T細胞を特異的に刺激するために使用することができる。

【0061】

次の実施例は本発明を例示するためのものである。従って、本発明の範囲が下記の実施例によって制限されてはならない。

【0062】

〔実施例〕

[実施例1] p S F V / g a g 及び p S F V / g a g p r o 発現ベクターの製造 G a g 蛋白質は、H I V - 1 の g a g p o l の全長RNAで発現されるピリオンの主要な構成要素である。G a g 蛋白質はそれ自体のみでも他のウィルス蛋白質なしでウィルス様粒子(V L P)をアSEMBLすることができるものと知られている。G a g 蛋白質はp o l 遺伝子によって発現されるウィルスプロテアーゼによってマトリックス(M A、p 1 7)、カプシド(C A、p 2 4)、ヌクレオカプシド(N A、p 9)及びp 6の蛋白質でプロセシングされて成熟粒子(mature particle)を形成する(Gheysen D. et al, Cell, 59, 103-112(1989))。本発明ではH I V - 1 の g a g 遺伝子を ウィルスレプリコンに挿入してG a g を発現させる発現ベクターを製造した。

【0063】

H I V c l a d e E 遺伝子を(Genbank accession number U51188, Journal of Virology, 1996)鋳型として使用した。p S F V / g a g を作るために、G a g の全長遺伝子に該当するH I V - 1 の塩基序列(832 - 2328bp)を下記のプライマー1及びプライマー2を用いてPCRで増幅した。G a g と共に、プロテアーゼP r o を発現させるためにp S F V / g a g p r o を製作した。H I V - 1 の g a g、フレームシフト部位及び

10

20

30

40

50

プロテアーゼ部位を含んだ全長遺伝子(832-2577bp)をプライマー1及びプライマー3を用いてPCRで増幅した。鋳型としてHIV-1 clone E全長遺伝子を持っているpUHD(100ng/μl)に2.5mM dNTP(Boehringer Mannheim, Germany)4μl、センスプライマー(100pmol/μl)1μl、アンチセンスプライマー(100pmol/μl)1μl、Taq polymerase10Xバッファ5μl、D.W.37μlを入れて混合液を作った後、98で5分間変性させた後、Taq polymerase1μlを添加し、その後94で1分、55で2分、72で3分に保たせる一連の反応を30回繰り返し行った。増幅された遺伝子をそれぞれpSFVのBamHIサイトに挿入してpSFV/gag(図3)及びpSFV/gagpro(図4)を作った。

プライマー1:センス(序列1)

5'-GCGGATCCCGGGATGGGTGCGAGAGCGTCAATATTAAGT-3'

プライマー2:アンチセンス(序列2)

5'-CGCGGATCCCTGTTACTGTGACAAGGGGTCGTTGCCAAA-3'

プライマー3:アンチセンス(序列3)

5'-CGCGGATCCCTGCAGTTAAAGTACAACCAATCTGAGTCAACA-3'。

【0064】

[実施例2] pSFV-helperとpSFV/gag、又はpSFV-helperとpSFV/gagproを用いたVLPの製造

HIV-1のプロテアーゼ(Pro)は、ビリオンの Budding(budding)中或いは Budding後に活性化され、Gag又はGagpolポリプロテインを切断することにより構造蛋白質をプロセッシングするのに関与する。本実験ではpSFV-helperと共に実施例1で製造したpSFV/gag又はpSFV/gagproを宿主細胞で発現させた。

【0065】

pSFV/gag又はpSFV/gagproを制限酵素PvuIで処理して線状DNAに作った後P/C処理した。前記DNA10μl、10xSP6バッファ(Takara)5μl、10mM m7G(5')ppp(5')G(BM)5μl、100mM DTT2.5μl、rNTP mix(10mM ATP、10mM CTP、10mM UTP、5mM GTP、BM)5μl、RNasin(BM)2μl、SP6 RNAポリメラーゼ(Takara)1.5μl、D.W.19μlで混合液を作った後、37で1時間30分間反応させた。mRNA転写物(pSFV-helper RNA転写物25μlにそれぞれ前記pSFV/gag又はpSFV/gagpro RNA転写物50μl)を、PBS(Phosphate buffered saline, 1.37mM Sodium Chloride, 0.02mM Potassium Chloride, 0.1mM Phosphate buffer/ml)バッファに浮遊させたBHK-21細胞(107cells/ml)800μlに入れた後、0.4cmエレクトロポレーションキュベットで830V/25μFで2番パルスを与えた(Bio-Rad Gene Pulser)。トランスフェクション48時間後に上澄液を3500rpmで、15分間遠心分離した後、さらに超高速遠心分離(SW41 rotor, 2hr, 30,000rpm, 4, BECKMAN)してウイルス粒子を得た。このペレットをTNE(50mM Tris-HCl(pH7.4)、100mM NaCl、0.5mM EDTA)バッファに浮遊させて-70で保管した。上澄液から収集した欠損VLP(defective VLP)をSDS-PAGEした後、AIDS患者の血清(patient human serum)を用いてウェスタンブロットした(図5)(レインM:陰性対照群;レイン1:pSFV-helperとpSFV/lacZから生成されたVLP;レイン2:pSFV-helperとpSFV/gagから生成されたVLP;レイン3:pSFV-helperとpSFV/gagproから生成されたVLP)。

【0066】

図5のレイン2からGag蛋白質が検出された。これはBHK-21の細胞質内に入ったpSFV/gag RNA転写物によってGag蛋白質が発現され、前記Gag蛋白質からなるHIVLVPがSFVLP粒子と共に細胞上澄液に放出されたことを示す。Gag蛋白質とProを共に発現させるために作製されたpSFV/gagpro発現システムの

10

20

30

40

50

ウェスタンブロットでは p S F V / g a g の場合に比べて少量の G a g 蛋白質が検出された(図5、レイン3)。

【0067】

T N E バッファに浮遊しているウィルス粒子 1 0 0 μ l にキモトリプシン (1 0 m g / m l) 5 μ l 、 5 0 m M C a C l ₂ 5 μ l を入れて氷で 3 0 分間反応させた後、アプロチニン (2 m g / m l) 4 5 μ l を入れて前記 V L P を活性化させた。前記活性化された粒子を 7 0 % 単一層の (monolayered) B H K - 2 1 細胞に感染させ、 1 時間 3 0 分後に新しい培地を入れた後 2 日間培養した。 2 日後に細胞溶解バッファ (cell lysis buffer: 1% NP40 (Nonidet P-40), 50mM Tris-HCl(pH7.6), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1 μ g / M l PMSF) 2 0 0 μ l で 1 時間反応させ、遠心分離 (1 2 0 0 0 r p m 、 4 、 5 分) して得た上澄液にサンプルバッファを入れて 5 分間沸した後、 1 2 % S D S - P A G E に電気泳動した。電気泳動したゲルを P V D F ウェスタンブロットメンブレイン (B M) で 1 5 V 、 7 m A で 2 時間トランスファーした後、特異的抗体を用いてウェスタンブロットした。使用された 1 次抗体は A I D S 患者の血清、 2 次抗体はビオチン化された抗ヒト I g G である。ブロットは A B 溶液と反応させた後、 D A B 溶液で発色させた (図 6) (レイン 1 : p S F V / g a g から得られた V L P で感染させた B H K - 2 1 細胞 ; レイン 2 : p S F V / g a g p r o から得られた V L P で感染させた B H K - 2 1 細胞) 。 5 5 k D a のバンドは、再感染結果、 B H K - 2 1 細胞の細胞質で G a g 蛋白質が生成されたことを示す。従って、 p S F V / g a g 又は p S F V / g a g p r o から得られた V L P が、 g a g 遺伝子を有する感染性 V L P であることが分る。

10

20

【0068】

[実施例 3] p S F V / g a g 又は p S F V / g a g p r o を用いた V L P の製造
前記実施例 2 で作られた V L P には、 S F V のコアからなる V L P (S F V L P g a g 又は S F V L P g a g p r o) と H I V - 1 コアを有する V L P (H I V L P g a g または S F V L P g a g p r o) とが混合されているので、 H I V - 1 コアからなる V L P のみを発現させようと、実施例 1 で作製された p S F V / g a g と p S F V / g a g p r o をそれぞれ i n v i t r o 転写して p S F V - h e l p e r R N A 転写物なしで B H K - 2 1 細胞に、前記実施例 2 の方法でそれぞれトランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞は - 2 0 ° C の冷たい 1 0 0 % M t O H で 4 ~ 6 分間固定させ、 1 % のゼラチンで 1 時間ブロッキングした後、 H I V の p 2 4 (カプシド) に対するポリクローナル抗体 (ウサギ) で免疫化学的ステイニングした。 2 次抗体はビオチン化された抗ウサギ I g G である。前記実験結果、形質転換された B H K - 2 1 細胞で G a g 蛋白質が発現されたことを確認することができた (図 7) (A : 陰性対照群、トランスフェクションされていない B H K - 2 1 細胞 ; B : p S F V / g a g で形質転換された B H K - 2 1 細胞 ; C : p S F V / g a g p r o で形質転換された B H K - 2 1 細胞) 。

30

【0069】

細胞質内における G a g 蛋白質の検出に相次いで、実施例 2 の方法によって細胞培養培地上澄液から V L P を分離してこれらを E M で観察した (図 8) (A : p S F V / g a g から得られた V L P ; B : p S F V / g a g p r o から得られた V L P) 。 p S F V / g a g 又は p S F V / g a g p r o R N A 転写物を p S V - h e l p e r 転写物なしで発現させた場合、 H I V - 1 の G a g のみからなる感染性 V L P (H I V L P g a g) が生成されることが分った。

40

【0070】

[実施例 4] p S F V / e n v 発現ベクターの製造
H I V - 1 の g p 1 6 0 遺伝子を増幅するために H I V c l a d e E 遺伝子を (Genbank accession number U51188, Journal of Virology, 1996) 鋳型とし、プライマー 4 及びプライマー 5 を用いて塩基序列 (6 2 6 4 - 8 8 7 9 b p) を P C R で増幅した。

プライマー4:センス (序列 4)

5'-CGCGCCTCGAGCGGGATCCCATGAGAGTGAAGGGGACACGGA-3'

プライマー5:アンチセンス (序列 5)

5'-AATGGATCCTATAGCAAAGCCCTTTCCAAGCCC-3'

鋳型 HIV-1 clade E 全長遺伝子を持っている pUHD (100 ng/μl) に 2.5 mM dNTP (Boehringer Mannheim, Germany) 4 μl、センスプライマー (100 pmol/μl) 1 μl、アンチセンスプライマー (100 pmol/μl) 1 μl、Taq polymerase 10 X バッファ 5 μl、D.W. 37 μl を入れて混合液を作った後、98 で 5 分間加温し、その後 Taq polymerase 1 μl を添加した後、94 で 1 分、55 で 2 分、72 で 3 分に保たせる一連の反応を 30 回繰り返し行った。増幅された遺伝子を pS 10
FV ベクターの BamHI サイトに挿入して pSFV/env 発現ベクターを製作した (図 9)。

【0071】

[実施例 5] pSFV-helper 及び pSFV/env を用いた VLP の製造
HIV-1 の Env のみでは VLP を形成することができないので、pSFV-helper と pSFV/env を用いて VLP を製造した。実施例 4 で製造された pSFV/env 発現ベクターを制限酵素 SphI で処理して線状 DNA に作った後、P/C 処理した。この DNA 10 μl、10 x SP6 バッファ (Takara) 5 μl、10 mM m7G (5') ppp (5') G (BM) 5 μl、100 mM DTT 2.5 μl、rNTP mix (10 mM ATP、10 mM CTP、10 mM UTP、5 mM GTP、BM) 5 μl、RNasin (BM) 2 μl、SP6 RNA ポリメラーゼ (Takara) 1.5 μl、D.W. 19 μl) で混合液を作った後、37 で 1 時間 30 分間反応させた。mRNA 20
転写物 (pSFV/helper RNA 転写物 25 μl 及び pSFV/env RNA 転写物 50 μl) を PBS に浮遊させた BHK-21 細胞に前記実施例 2 の方法でトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間の後、上澄液を 3500 rpm で、15 分間遠心分離した後超高速遠心分離 (SW41 rotor, 2hr, 30,000rpm, 4, BECKMAN) してウイルス粒子を得た。このペレットは TNE (50mM Tris-HCl (pH7.4), 100mM NaCl, 0.5mM EDTA) バッファに浮遊させて -70 で保管した。トランスフェクションされた細胞は -20 の冷たい 100% MeOH で 4~6 分間固定し、1%ゼラチンで 1 時間ブロッキングした後、特異的なモノクローナル抗体を用いて免疫化学的ステイニングした (図 10) (A: 陰性対照群、トランスフェクションされていない BHK 細胞; B: pSFV/env でトランスフェクションされた BHK 細胞)。1 次抗体として gp160 に対するモノクローナル抗体 (1 mg/ml)、2 次抗体として、ビオチン化された抗マウス IgG (5 μl/ml) を使用し、AB 溶液 (avidin 5 μl, biotin 5 μl/PBS 1 ml, VECTOR) に 30 分間反応させた後、DAB (3,3'-diaminobenzidine) 溶液 (ベクター) で発色させた。 30

【0072】

pSFV/env でトランスフェクションされた細胞で Env 蛋白質が発現された。

【0073】

TNE バッファに浮遊しているウイルス粒子 100 μl にキモトリプシン (10 mg/ml) 5 μl、50 mM CaCl₂ 5 μl を入れて氷で 30 分間反応させた後、アプロチニン (2 mg/ml) 45 μl を入れて VLP を活性化させた。前記粒子をウイルス 70% 単一層の (monolayered) BHK-21 細胞に感染させ、1 時間 30 分後に新しい培地を入れて 2 日間培養した。2 日後に細胞溶解バッファ (cell lysis buffer: 1% NP40, 50mM Tris-HCl (pH7.6), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1 μg/ml PMSF) 200 μl で 1 時間反応させた後、遠心分離 (12000 rpm, 4, 5 分) して得た上澄液にサンプルバッファを入れて 5 分間沸した後、12% SDS-PAGE に電気泳動した。電気泳動したゲルを PVDF ウェスタンブロットメンブレイン (BM) で 15 V、7 mA で 2 時間トランスファーした後、特異的抗体を用いてウェスタンブロットした。使用された 1 次抗体は AIDS 患者の血清、2 次抗体はビオチン化された抗ヒト IgG であり、プロットは AB 溶液と反 40
50

応させた後 D A B 溶液で発色させた (図 1 1) (レイン 1 : 陰性対照群、 B H K - 2 1 細胞 ; レイン 2 : V L P で感染させた B H K - 2 1 細胞) 。 V L P を収去してこれを *i n v i t r o* 活性化させた後、 B H K - 2 1 細胞に感染させた結果、 B H K - 2 1 細胞の細胞質で E n v 蛋白質が生成されたので、感染性 S F V L P e n v が生成されたことが分る。

【 0 0 7 4 】

[実施例 6] p S F V / g a g 及び p S F V / e n v を用いた V L P の製造
H I V の g a g 遺伝子のみを発現させた場合に未成熟 V L P がアSEMBLされるという事実、及び H I V の中和抗体を形成するのに E n v 蛋白質が重要な役割を果たすという事実が知られている (Gheysen D. et al., Cell, 59, 103-112 (1989); Lasky, L. A. et al., Science, 249, 932-935 (1986); Lasky, L. A. et al., Cell, 50, 975-985 (1987)) 。
従って、 G a g からなる粒子に E n v を挿入するために、実施例 1 で製造された p S F V / g a g と実施例 4 で製造された p S F V / e n v の R N A 転写物とを同時にトランスフェクションする実験を行った。

10

【 0 0 7 5 】

p S F V / g a g と p S F V / e n v を前記実施例 2 に記述の方法によってそれぞれ *i n v i t r o* 転写して (p S F V - h e l p e r なしで) B H K - 2 1 細胞に同時トランスフェクションさせ、 4 8 時間培養した後、 G a g と E n v を全て認識する A I D S 患者の血清、及び E n v を認識する g p 1 6 0 に対するモノクローナル抗体で細胞をイムノステイニングした。患者の血清でステイニングした場合 (図 1 2 の C) が g p 1 6 0 に対するモノクローナル抗体でステイニングした場合 (図 1 2 の B) よりさらに多くステイニングされたことから、細胞で H I V - 1 の G a g 及び E n v が全て発現されたことが分った (図 1 2) (A : 陰性対照群 ; B : g p 1 6 0 に対するモノクローナル抗体 ; C : A I D S 患者の血清) 。この結果から H I V - 1 の G a g と E n v からなる H I V L P が作られていることが分る。

20

【 0 0 7 6 】

[実施例 7] V L P 内にパッケージングされた R N A の分析
p S F V / g a g R N A 転写物のみを発現させて得られた実施例 3 の V L P 、又は p S F V / g a g と p S F V / e n v の R N A 転写物を同時にトランスフェクションして得られた実施例 6 の V L P が核酸を含んでいるかを確認するために、前記の V L P を 1 0 % スクロースクッションに透過させた。他の R N A 又は D N A の汚染を防ぐために 1 m g R N a s e A と 7 0 U R N a s e - f r e e D N a s e I によって常温で 1 時間 M g ₂ S O ₄ - アセテートバッファ状態で反応させた。 R N A 分離キット (Viral RNA purification kit; Viogene) を用いて R N A を分離し、 R T - P C R と P C R を行った。 g a g 遺伝子のためには 6 5 0 b p 程度の p 2 4 遺伝子を増幅し、 e n v 遺伝子のためには 3 5 0 b p 程度の g p 4 1 の一部分を増幅させた。

30

【 0 0 7 7 】

4 μ l の 5 倍濃縮したスーパースク립ト II 逆転写バッファ (250 mM Tris-HCl [pH 8.5], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 、 2 μ l の 0.1 M D T T 、 4 μ l のデオキシヌクレオシドトリホスフェートバッファ (d N T P ; 2 5 mM ; T a K a R a) 及びプライマーを入れた後、総 2 0 μ l にして 4 2 ° C で 2 分間放置した。前記溶液に 1 μ l のスーパースク립ト II 逆転写酵素 (Molony Murine Leukemia Virus の p o l 遺伝子から由来した逆転写酵素 (Gibco BRL)) を入れて 4 2 ° C で 5 0 分間反応させて c D N A を作った。 g a g R N A に対しては 1 μ l の 1 0 0 p m o l のプライマー 6 を、 e n v R N A のためにはプライマー 7 を使用した。

40

プライマー 6 : アンチセンス (序列 6)

5' - C C C A A G C T T T T A G C A T G C T G T C A T C A T T T C - 3'

プライマー 7 : アンチセンス (序列 7)

5' - G G T T C T G C A G A A G C T T C C T T G T T A T T T C A A A C C A - 3'

生成された R N A / D N A ハイブリッドを変性させた後、 7 0 ° C で 1 5 分間逆転写酵素の

50

活性を抑制させた。このように生成された cDNA を Z t a g DNA ポリメラーゼ (T a K a R a) とプライマーを用いて増幅した (プライマー 8 とプライマー 6、g a g RNA 検索 ; プライマー 9 とプライマー 7、e n v RNA 検索)。

プライマー 8 : センス (序列 8)

5' - C C C A A G C T T C A T C A G G C C T T A T C A C C T - 3'

プライマー 9 : センス (序列 9)

5' - T C C C C C G G G A A G C T T G C G C A G C A G C A T C T G T T G - 3'

鋳型として前記の R T - P C R で生成された cDNA 10 μ l、2.5 mM d N T P (Boehringer Mannheim, Germany) 4 μ l、センスプライマー (100 pmol / μ l) 1 μ l、アンチセンスプライマー (100 pmol / μ l) 1 μ l、Z taq polymerase 10 X バッファ 5 μ l、D.W. 28 μ l、Z taq polymerase (T a K a R a) 1 μ l を入れて混合液を作った後、94 で 5 分間変性し、その 94 で 1 分、55 で 1 分、72 で 1 分の一連の反応を 35 回行い、72 で 7 分間反応させた。増幅された産物はアガロースゲルに電気泳動した後、U V イリユーミネーション (illumination) で観察した。

【 0 0 7 8 】

p 2 4 遺伝子は p S F V / g a g RNA 転写物のみを発現させて得られた H I V L P 又は p S F V / g a g と p S F V / e n v の RNA 転写物を同時にトランスフェクションして得られた全 H I V L P で増幅された (図 1 3 のレイン 1 及び 2)。ところが、g p 4 1 遺伝子はいずれの V L P でも増幅されなかった (図 1 3 のレイン 1 ないし 3)。前記結果は只 g a g 遺伝子を持った R n A のみが V L P にパッケージングされてバッディングされることを示す。(レイン 1 : p S F V / g a g から得られた V L P ; レイン 2 と 3 : p S F V / g a g と p S F V / e n v の同時トランスフェクションによる V L P ; レイン 1 と 2 は p 2 4 プライマーを用いて増幅したもので、レイン 3 は p 4 1 プライマーを用いて増幅したものである。650 bp は g a g 遺伝子部位を、350 bp は e n v 遺伝子部位を示す)。

【 0 0 7 9 】

[実施例 8] 欠損 S F V L P の感染による V L P の生産

前記実施例 2 及び実施例 5 から得られた V L P を *in vitro* で活性化させて COS - 1 細胞に感染させた後、V L P が生産したか否かを確認した。感染した COS - 1 細胞溶解物と上澄液から得た V L P とを A I D S 患者の血清と p 2 4 に対するポリクローナル抗体 (ウサギ) と p 2 4 に対するモノクローナル抗体でウェスタンブロットした (図 1 4)。(A : A I D S 患者の血清 ; B : p 2 4 に対するポリクローナル抗体 ; C : p 2 4 に対するモノクローナル抗体 ; 陰性対照群 (レイン 1、4、7、10、13) ; S F V L P g a g による感染 (レイン 2、5、8、11、14) ; S F V L P g a g と S F V L P e n v による同時感染 (レイン 3、6、9、12、15) ; 細胞溶解物 (レイン 1、2、3、7、8、9、10、11、12) ; V L P (レイン 4、5、6、13、14、15))。

【 0 0 8 0 】

図 1 4 の A と B において、g a g 遺伝子を含む欠損 S F V L P で感染させた場合、細胞内 (レイン 2、8) とその上澄液の V L P (レイン 5) から G a g 蛋白質が検出された。g a g と e n v 遺伝子をそれぞれ含有している S F V レプリコンを同時に感染させた場合には細胞内 (レイン 3、9) とその上澄液から得た V L P (レイン 6) より G a g と E n v の蛋白質が全て検出された。従って、G a g と E n v 蛋白質が一つの細胞で同時に発現される場合、この 2 つの蛋白質からなる V L P が生成されることを確認することができた。

【 0 0 8 1 】

図 1 4 の C で p 2 4 に対するモノクローナル抗体 (Biogenesis, Cat. No. 4999-8607) でウェスタンブロットした結果、G a g の前駆体である P r 5 5 及び p 2 4 が検出された。これは COS - 1 細胞内で H I V - 1 のプロテアーゼが発現されなくても G a g の前駆体がプロセッシング或いは変性されることができると考えられる。

【 0 0 8 2 】

[実施例 9] p S F V / e n v - g a g と p S F V / e n v - g a g - p r o 発現ベクターの製作

2 6 S サブプロモータを有する p r o (2 2 6 8 - 2 6 0 6 b p) 遺伝子をクローニングするために p S F V / p r o を製作した。プライマー 1 0 及びプライマー 1 1 を用いて、鑄型として H I V - 1 c l a d E 全長遺伝子を持っている p U H D (1 0 0 n g / μ l) に 2 . 5 m M d N T P (Boehringer Mannheim, Germany) 4 μ l 、センスプライマー (1 0 0 p m o l / μ l) 1 μ l 、アンチセンスプライマー (1 0 0 p m o l / μ l) 1 μ l 、Taq polymerase 1 0 X パッファ 5 μ l 、D . W . 3 7 μ l を入れて混合液を作った後、9 8

で 5 分後、Taq polymerase 1 μ l を添加し、その後 9 4 で 1 分、5 5 で 1 分、7 2

で 3 0 秒に保たせる一連の反応を 4 0 回繰り返し行った

プライマー 10 : センス (序列 10)

5' - CCAAGATCTATGACAGCCTCCTCCTTAGTTTC - 3'

プライマー 11 : アンチセンス (序列 11)

5' - CAACCCGGGTGCGGATTAAGTGTCAATAGGACTAAT - 3' .

【 0 0 8 3 】

プライマーの両末端に装着した E c o R V と S m a I サイトを用いて、p S F V のマルチクローニング部位である S m a I サイトに、前記反応で増幅された遺伝子を挿入した (図 1 5) .

【 0 0 8 4 】

p S F V / e n v - g a g ベクターは、前記実施例 1 で製造した p S F V / g a g を鑄型として 2 6 S サブゲノミックプロモータに対するプライマー 1 2 (センス) 、g a g に対するプライマー 2 (アンチセンス) を用いて 2 6 S g a g 遺伝子を増幅した後、p S F V / e n v の S m a I サイトに挿入することにより製造した (図 1 6) .

プライマー 12 : センス (序列 12)

5' - CCGGATATCACCTCTACGGCGGTCTTA - 3'

プライマー 13 : アンチセンス (序列 13)

5' - CGCCCGGTTACTGTGACAAGGGGTCGTTGCCAAA - 3'

前記で製造した p S F V / p r o を鑄型として、サブゲノミックプロモータプライマー (序列 1 2) と p r o のアンチセンスプライマー (序列 1 1) を用いて 2 6 S p r o 遺伝子を増幅し、これを前記 p S F V / e n v - g a g の S m a I サイトに挿入して p S F V / e n v - g e g - p r o を製作した (図 1 7) . ここで増幅された p r o g e n e は実施例 1 の g a g p r o の p r o 遺伝子より N 末端序列が減少し、C 末端序列がさらに含まれている。これはセルフプロセシングするのに必要な序列を含んで p r o 遺伝子を増幅したものである (Viviane V . et al . , J . Gen . Virol . 73 , 639-651 (1992)) . 本発明の p S F V / e n v - g a g - p r o ベクターはブダペスト条約下の寄託機関である Korean Culture Center of Microorganisms に寄託番号 K C C M - 1 0 2 3 3 で寄託された。

【 0 0 8 5 】

[実施例 1 0] p S F V / e n v - g e g の発現による V L P の生産

G a g に E n v が挿入された V L P を作るために H I V の 2 つの構造蛋白質がそれぞれのプロモータの下で一つのベクターに連続的にクローニングされた実施例 9 の発現ベクター p S F V / e n v - g a g を細胞に感染させた。p S F V - e n v - g a g の R N A 転写物を B H K - 2 1 細胞にトランスフェクションして 4 8 時間後にその細胞溶解物又は培地上澄液から得た V L P を A I D S 患者の血清で E C L (enhanced chemiluminescent substrate) 方法を用いてウェスタンブロットした (図 1 8) (レイン 1 : 陰性対照群、レイン 2 、 3 : 細胞溶解物 ; レイン 4 、 5 : 細胞上澄液) . V L P から G a g と E n v の 2 つの蛋白質が全て発見されたので、2 つのサブゲノミックプロモータの下で e n v と g a g 遺伝子をそれぞれ連結してクローニングした際にこれらの 2 つの蛋白質が細胞で全て発現され、相互結合してウィルス粒子を形成することが分る。図 1 8 において培地上澄液の G a g 蛋白質の大きさが小さく見えるのは、血清成分である 6 5 k D a のアルブミンによって

押されて電気泳動されたためである。

【0086】

[実施例11] pSFV/env-gag-proの発現によるVLPの製造
前記実施例9で製造されたpSFV/env-gag-proベクターを宿主細胞にトランスフェクションさせてそれぞれの蛋白質を発現した。pSFV/env-gag-proのRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションさせた後、48時間後に細胞をAIDS患者の血清、gp160に対するモノクローナル抗体、p24に対するモノクローナル抗体及びプロテアーゼに対するポリクローナル抗体(羊)で免疫細胞化学ステイニングした(図19)(A:陰性対照群;B:患者の血清;C:gp160に対するモノクローナル抗体;D:p24に対するポリクローナル抗体;E:プロテアーゼに対するポリクローナル抗体)。これらの抗体が全て各抗原を認識したので、それぞれの26SサブゲノミックプロモータからGag、Env及びProが全て発現されたことが分る。前記実験はひいては ウィルス発現ベクターの3つのサブゲノミックプロモータにそれぞれ連結された3つ以上の外来遺伝子が全て発現できることを示す結果でもある。

10

【0087】

[実施例12] pSFV/env-gag-gagpro-CTE発現ベクターの製造
pSFV/CTEベクターを製造するために、pGEM7fz(-)/MPMVを鋳型として下記のプライマー14とプライマー15を用いて増幅した後、pSFVのBamHIとSmaIサイトに挿入した(図20)。前記ベクターに実施例1で製造したpSFV/gagproのgagproをBamHI処理してpSFV/CTEのBamHIサイトに挿入してpSFV/gagpro-CTEを製造した(図21)。pSFV/gagpro-CTEベクターはpSFV/gagpro序列の後にMaston-Pfizer monkeyウィルスのCTE遺伝子を挿入したものである。

20

【0088】

前記pSFV/gagpro-CTEを鋳型として、26Sサブゲノミックプロモータを含んだgagpro全長遺伝子とCTE遺伝子をPCRで増幅し、実施例9で製作されたpSFV/env-gagプラスミドのSmaIサイトに挿入してpSFV/env-gag-gagpro-CTE発現ベクターを製造した(図22)。増幅反応はプライマー12及びプライマー15を用いて鋳型pSFV/gagpro-CTE 1µlに2.5mM dNTP(Boehringer Mannheim, Germany) 4µl、センスプライマー(100pmol/µl) 1µl、アンチセンスプライマー(100pmol/µl)、Taq polymerase 10Xバッファ5µl、D.W.37µlを入れて混合液を作った後、98℃で5分後、Taq polymerase 1µlを添加し、その後94℃で1分、55℃で1分、72℃で2分に保たせる一連の反応を40回繰り返し行った。本発明のpSFV/env-gag-gagpro-CTEベクターは、ブダペスト条約下の寄託機関であるKorean Culture Center of Microorganismsに寄託番号KCCM-10234で寄託された。

30

プライマー14:センス(序列14)

5'-AATGGATCCCCTCCCCTGTGAGCTAGACT-3'

プライマー15:アンチセンス(序列15)

5'-AATGATATCAGATCTCCAAGACATCATCCGGGCAA-3'

40

[実施例13] pSFV/env-gag-gagpro-CTE発現ベクターの製造
gagproはgagproのリボソームフレームシフトシグナルで保存された序列である5つのTを除去したものである。このgagproを作るために、まず前記実施例1のpSFV/gagを鋳型として、26Sサブゲノミックプロモータ及びフレームシフトとなる直前のgag遺伝子(832-2113)をプライマー12と下記のプライマー16を用いてPCRで増幅した後、pGEMTベクター(Promega)に挿入した。

【0089】

増幅は鋳型としてpSFV/gag 1µlに2.5mM dNTP(Boehringer Mannheim, Germany) 4µl、センスプライマー(100pmol/µl) 1µl、アンチセンスプライマー(100pmol/µl) 1µl、Taq polymerase 10Xバッファ5µl、D.W.3

50

7 μ l を入れて混合液を作った後、98 で5分後、Taq polymerase 1 μ l を添加し、その後94 で1分、55 で1分、72 で1分に保たせる一連の反応を40回繰り返し行った。また、前記実施例12のpSFV/gagpro-CTEを鋳型としてフレームシフトシグナルの保存序列を排除したproの全長遺伝子をプライマー17とプライマー15を用いてPCRで増幅した後、pGEMTベクターに挿入した。

プライマー16: アンチセンス (序列 16)

5'-AATAGGCCTGTCTTTCAGTGCAGTCTT-3'

プライマー17: センス (序列 17)

5'-CACAGGCCTATAGGAAAATCTGGCCTTC-3'

2つの遺伝子はStuI制限酵素で処理して連結し、この過程にアミノ酸Asn (Asparagine)がTyr (Tyrosine)で置換され、5つのTを除去することによりPhe (Phenylalanine)アミノ酸2つが除去された。完成したgagproはEcoRV制限酵素を処理してpSFV/env-gagのSmaIサイトに挿入してpSFV/env-gag-gagpro-CTE発現ベクターを製造した(図23)。

(序列18) F F R E

CAG GCT AATTT TTT AGG GAA Gag-polのフレームシフト部位

Q A N

(序列19)

CAG GCC TAT AGG GAA Gag Δ proの変形部位

Q A Y R E.

【0090】

[実施例14] pSFV/gagpol発現ベクターの製造

本発明ではHIV-1のgagpol遺伝子をウィルスレプリコンに挿入してGagpolポリプロテインを発現させる発現ベクターを製造した。

【0091】

pSFV/gagpolを作るために、Gagpolの全長遺伝子に該当するHIV-1の塩基序列(832-5132bp)を下記のプライマー18及びプライマー19を用いてPCRで増幅した。鋳型としてHIV-1 clade E全長遺伝子を持っているpUHD(100ng/ μ l)に2.5mM dNTP(Boehringer Mannheim, Germany)4 μ l、センスプライマー(100pmol/ μ l)1 μ l、アンチセンスプライマー(100pmol/ μ l)1 μ l、Taq polymerase 10Xバッファ5 μ l、D.W.37 μ lを入れて混合液を作った後、98 で5分間変性させ、その後Taq polymerase 1 μ lを添加した後、94 で1分、55 で1分、72 で3分に保たせる一連の反応を40回繰り返し行った。

プライマー18: センス (序列 20)

5'-TTAGGATCCATGGGTGCGAGACGTCA-3'

プライマー19: アンチセンス (序列 21)

5'-CGCGGATCCCTAATCCTCATTCTGTCTACC-3'

前記増幅された遺伝子をpSFVのBamHIサイトに挿入してpSFV/gagpol(図24)を作った。

【0092】

[実施例15] pSFV/gagpolを用いたVLPの生産

プロセッシングされたHIV-1コアからなるVLPを発現させようと、実施例14で作製された発現ベクターpSFV/gagpolをin vitro転写してpSFV-heliperRNA転写物なしでBHK-21細胞に、前記実施例2の方法でそれぞれトランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞は-20の冷たい100%MTOHで4~6分間固定させ、1%のゼラチンで1時間ブロッキングした後、細胞をAIDS患者の血清、p24に対するポリクローナル抗体及びプロテアーゼに対するポリクローナル抗体で免疫細胞化学ステイニングした(図25)(A: 陰性対照群; B: 患者の血清; C: p24pに対するポリクローナル抗体; D: プロテアーゼに対するポリクローナル

10

20

30

40

50

抗体)。前記実験結果、形質転換されたBHK-21細胞でGag蛋白質だけでなくGag polポリプロテインが発現されたことを確認することができた。

【0093】

pSFV/gag polのRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションして48時間後、その細胞溶解物又は培地上澄液からVLPを分離してp24に対するポリクローナル抗体でECL方法を用いてウェスタンブロットした(図26)(レイン1、4:陰性対照群;レイン2、5:pSFV/gagから得られたサンプル;レイン3、6:pSFV/gag polから得られたサンプル;細胞溶解物(レイン1、2、3);VLP(レイン4、5、6))。

【0094】

pSFV/gagをトランスフェクションしたBHK-21細胞内ではPr55のみが発現されて上澄液から未成熟VLPが検出されたが、pSFV/gag polをトランスフェクションしたBHK-21細胞内では殆どのPr55がプロセッシングされて多量のp24が発現され、上澄液ではプロセッシングされた成熟VLPを発見することができた。

【0095】

[実施例16] pSFV/gag-entMCTEとpSFV/gag pol-envMCTE発現ベクターの製造

本発明では、Envを持っている成熟HIVLVPを製造するために26SサブゲノミックプロモータとMCTEを含んだenv遺伝子を増幅した後、pSFV/gag polのSmaIサイトに挿入することにより、pSFV/gag pol-envMCTEを製造した。また、この作製物との比較実験のためにpSFV/gag-envMCTEを製造した。

【0096】

pSFV/gag-envMCTEを作るために、まずpSFV/gagを新しく構築した。実施例1で作られたpSFV/gagのgag遺伝子の前にはSmaIサイトを含んでいるので、SmaIサイトを除去したプライマー18とプライマー2を用いてGagの全長遺伝子に該当するHIV-1の塩基序列(832-2113bp)をPCRで増幅して前記実施例1と同一の方法で製造した。

【0097】

pSFV/gag-envMCTEは、実施例12で製造されたpSFV/MCTEのBamHIサイトに、前記実施例4と同一の方法で製造されたpSFV/envMCTE(図27)を鋳型として26Sサブゲノミックプロモータに対するプライマー12(センス)とMCTEに対するプライマー15(アンチセンス)を用いて26envMCTE遺伝子を増幅した後、pSFV/gagのSmaIサイトに挿入することにより製造した(図28)。

【0098】

pSFV/gag pol-envMCTEは、前記の方法で26SenvMCTE遺伝子を増幅した後、pSFV/gag polのSmaIサイトに挿入することにより製造した(図29)。本発明のpSFV/gag pol-envMCTEベクターは、ブダペスト条約下の国際寄託機関であるKorean Culture Center of Microorganismsに寄託番号KCCM-10348で寄託された。

【0099】

[実施例17] pSFV/gag-envMCTE及びpSFV/gag pol-envMCTEを用いたVLPの生産

pSFV/gag-envMCTEをin vitro転写してpSFV-helper RNA転写物なしでBHK-21細胞に、前記実施例2の方法によってトランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞は-20℃の冷たい100%MeOHで4~6分間固定させ、1%のゼラチンで1時間ブロッキングした後、細胞をAIDS患者の血清、p24に対するポリクローナル抗体、プロテアーゼに対するポリクローナル抗体及びenvに対するモノクローナル抗体で免疫細胞化学ステイニングした(図30)(A:陰性対照群;B:患者の血清;C:p25pに対するポリクローナル抗体;D:プロテアー

10

20

30

40

50

ぜに対するポリクローナル抗体)。前記実験結果、形質転換されたBHK-21細胞でGag蛋白質だけでなくEnv蛋白質が発現されたことを確認することができた。

【0100】

pSFV/gagpol-envMCTEも前記実施例2の方法でトランスフェクションした(図31)(A:陰性対照群;B:患者の血清;C:p24に対するポリクローナル抗体;D:プロテアーゼに対するポリクローナル抗体;E:envに対するモノクローナル抗体)。前記実験結果、形質転換されたそれぞれのBHK-21細胞でGagpol蛋白質だけではなくEnv蛋白質が発現されたことを確認することができた。

【0101】

pSFV/gag-envMCTE及びpSFV/gagpol-envMCTEのRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションして48時間後、その培地の上澄液からVLPを分離してp24に対するポリクローナル抗体、envに対するモノクローナル抗体でECL方法を用いてウェスタンブロットした(図32)(A:患者の血清;B:envに対するモノクローナル抗体;レイン1、4:pSFV/gagから得られたVLP;レイン2、5:pSFV/gag-envMCTEから得られたVLP;レイン3、6:pSFV/gagpol-envMCTEから得られたVLP)。前記の結果により、pSFV/gagpol-envMCTEを発現させた場合、Envを含み、プロセッシングされた成熟VLPを生産することができた。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(110) KIM, Chul Joong
KIM, Eun
SHIN, Kwang Soon
KIM, Hyun Soo

(120) HIV-like Particle And The Use Thereof

(160) 21

(170) KopatentIn 1.71

(210) 1

(211) 39

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Designed DNA to be used as primer

(400) 1

gcggatcccg ggatgggtgc gagagcgtca atattaagt

39

(210) 2

(211) 39

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

10

20

30

40

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 2

cgcggatccc tgttactgtg acaaggggic gttgcca_{aa} 39

<210> 3

10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 3

cgcggatccc tgcagttaaa gtacaaccaa tctgagtcaa ca 42

20

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 4
cgcgctcga gcggatccc atgagatga agggacacg ga 42

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 5
aatggatcct atagcaaagc ctttccaag ccc 33

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 6

cccaagcttt tagcatgctg tcatcatttc 30

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

10

<400> 7

ggttcgcag aagcttcctt gtatttcaa acca 34

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 8

cccaagcttc atcagcctt atcacct 27

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 9 10
tcccccgga agcttgcgca gcagcatctg tig 33

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed DNA to be used as a primer 20

<400> 10
ccaagatcta tgacagcctc ctccttagt ttc 33

<210> 11
<211> 36
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 11

caaccgggt cgcgattaag tgcaatagg actaat

36

10

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 12

ccggatatca ccctacggc ggtccta

27

20

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 13

cgccccgggtt actgtgacaa ggggtcgttg ccaaa 35

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 14

aatggatccc ctcacctgtg agctagact 29

20

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 15
aatgatatca gatctccaag acatcatccg ggcaa 35

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 16

aataggcctg tctttcagtg cagtctt 27

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 17

cacaggccta tagggaaaat ciggccttc 29

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Frame shift part of Gag-pol

10

<400> 18
 caggctaatt ttttagggaa 20

<210> 19
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Part of HIV genomic DNA

<400> 19
 caggcctata gggaa 15

<210> 20

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 20
 ttaggatcca tgggtgcgag agcgtca 27 10

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed DNA to be used as a primer

<400> 21
 cgcgatccc taatcctcat tctgtctacc 30 20

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はHIV-1のゲノム構造を示す概要図である。

【図2】 図2はpSFVベクター及びpSFV-helperの構造を示す概要図である。

【図3】 図3はpSFV/gag発現ベクターの製造過程を示す概要図である。 30

【図4】 図4はpSFV/gagpro発現ベクターの製造過程を示す概要図である。

【図5】 図5はpSFV-helperとpSFV/gag、又はpSFV-helperとpSFV/gagproRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションして得たウイルス粒子をAIDS患者の血清でウェスタンブロットした結果を示す写真である。

【図6】 図6はpSFV-helperとpSFV/gag、又はpSFV-helperとpSFV/gagproRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションして得たウイルス粒子を*in vitro*活性化してBHK-21細胞に感染させた後、感染したBHK-21細胞の溶解物をAIDS患者の血清でウェスタンブロットした結果を示す写真である。 40

【図7】 図7はpSFV/gag又はpSFV/gagproRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションした後、細胞をp24(カプシド)に対するポリクローナル抗体で免疫化学ステイニングしてGagの発現を確認した写真である。

【図8】 図8はpSFV/gag(A)又はpSFV/gagpro(B)のRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションした後、その細胞培養培地の上澄液から得たVLPをネガティブステイニングして電子顕微鏡で観察した写真である(X140,000)。

【図9】 図9はpSFV/env発現ベクターの製造過程を示す概要図である。

【図10】 図10はpSFV-helperRNA転写物と共にpSFV/envRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションした後、gp160に対するモノク 50

ローナル抗体で免疫化学ステイニングして gp 160 の発現を確認した写真である。

【図 11】 図 11 は p S F V - h e l p e r R N A 転写物と共に p S F V / e n v R N A 転写物を B H K - 2 1 細胞にトランスフェクションして得た欠損 S F V 粒子をさらに *i n v i t r o* 活性化して B H K - 2 1 細胞に感染させ、感染した B H K - 2 1 細胞の溶解物を A I D S 患者の血清でウェスタンブロットした結果を示す写真である。

【図 12】 図 12 は p S F V / g a g と p S F V / e n v R N A 転写物を同時に B H K - 2 1 細胞にトランスフェクションした後、gp 160 に対するモノクローナル抗体 (B) 又は A I D S 患者の血清 (C) で細胞を免疫化学ステイニングして H I V - 1 E n v と G a g 蛋白質が同時に発現されたことを示す写真である。

【図 13】 図 13 は p S F V / g a g R N A 転写物、又は p S F V / g a g と p S F V / e n v R N A 転写物を同時に B H K - 2 1 細胞にトランスフェクションしてそれぞれ V L P を得た後、これらの粒子内にパッケージングされた R N A を R T - P C R と P C R 分析した結果を示す写真である。

【図 14】 図 14 は p S F V - h e l p e r と p S F V - g a g R N A 転写物、又は p S F V - h e l p e r と p S F V / e n v R N A 転写物を B H K - 2 1 細胞に同時トランスフェクションして得たそれぞれの欠損 S F V 粒子を *i n v i t r o* 活性化させて C O S - 1 細胞に再感染させた結果、H I V - 1 の G a g と E n v からなる V L P が生成されたことを示すウェスタンブロット写真である。

【図 15】 図 15 は p S F V / p r o 発現ベクターの製造過程を示す概要図である。

【図 16】 図 16 は p S F V / e n v - g a g 発現ベクターの製造過程を示す概要図である。

【図 17】 図 17 は p S F V / e n v - g a g - p r o 発現ベクターの製造過程を示す概要図である。

【図 18】 図 18 は p S F V / e n v - g a g の R N A 転写物を B H K - 2 1 細胞にトランスフェクションして得た V L P 又は細胞溶解物を A I D S 患者の血清でウェストブロットした結果を示す写真である。

【図 19】 図 19 は p S F V / e n v - g a g - p r o の R N A 転写物を B H K - 2 1 細胞にトランスフェクションした結果、H I V - 1 の G a g 、 E n v 及び P r o が発現されたことを示す免疫細胞化学分析写真である。

【図 20】 図 20 は p S F V / C E T 発現ベクターの製造過程を示す概要図である。

【図 21】 図 21 は p S F V / g a g p r o - C T E 発現ベクターの製造過程を示す概要図である。

【図 22】 図 22 は p S F V / e n v - g a g - g a g p r o - C T E 発現ベクターの製造工程を示す概要図である。

【図 23】 図 23 は p S F V / e n v - g a g - g a g p r o - C T E 発現ベクターの製造過程として、g a g の 3' 末端で生ずるフレームシフト塩基序列を除去した g a g p r o を p S F V / e n v - g a g に挿入したことを示す概要図である。

【図 24】 図 24 は p S F V / g a g p o l の製造過程を示す概要図である。

【図 25】 図 25 は p S F V / g a g p o l を B H K - 2 1 の細胞にトランスフェクションした後、細胞を p 24 に対するポリクローナル抗体及びプロテアーゼに対するポリクローナル抗体で免疫細胞化学ステイニングして G a g 及び G a g p o l ポリプロテインの発現を確認した写真である。

【図 26】 図 26 は p S F V / g a g p o l の R N A 転写物を B H K - 2 1 細胞にトランスフェクションした後、細胞を p 24 に対するポリクローナル抗体で E C L 方法を用いてウェスタンブロットした結果を示す写真である。

【図 27】 図 27 は p S F V / e n v M C T E の製造過程を示す概要図である。

【図 28】 図 28 は p S F V / g a g - e n v M C T E の製造過程を示す概要図である。

【図 29】 図 29 は p S F V / g a g p o l - e n v M C T E の製造過程を示す概要図である。

10

20

30

40

50

【図30】 図30はpSFV/gag-envMCTEをBHK-21細胞にトランスフェクションした後、細胞をp24に対するポリクローナル抗体、プロテアーゼに対するポリクローナル抗体及びenvに対するモノクローナル抗体でGag及びEnv蛋白質の発現を確認した写真である。

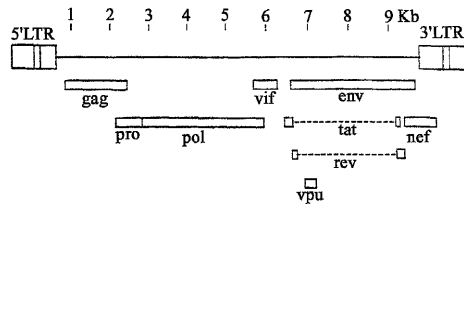
【図31】 図31はpSFV/gagpol-envMCTEをBHK-21細胞にトランスフェクションした後、細胞をp24に対するポリクローナル抗体、プロテアーゼに対するポリクローナル抗体及びenvに対するモノクローナル抗体で免疫細胞化学ステイニングしてGagpolポリプロテイン及びEnv蛋白質の発現を確認した写真である。

【図32】 図32はpSFV/gag-envMCTE及びpSFV/gagpol-envMCTEのRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションし、48時間後、細胞をp24に対するポリクローナル抗体及びenvに対するモノクローナル抗体でECL方法を用いてウェスタンブロットした結果を示す写真である。

10

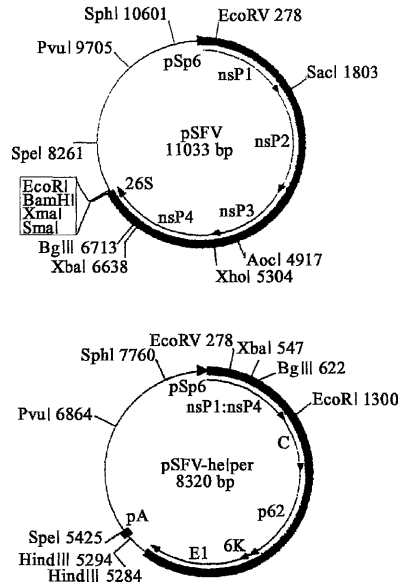
【図1】

FIG. 1

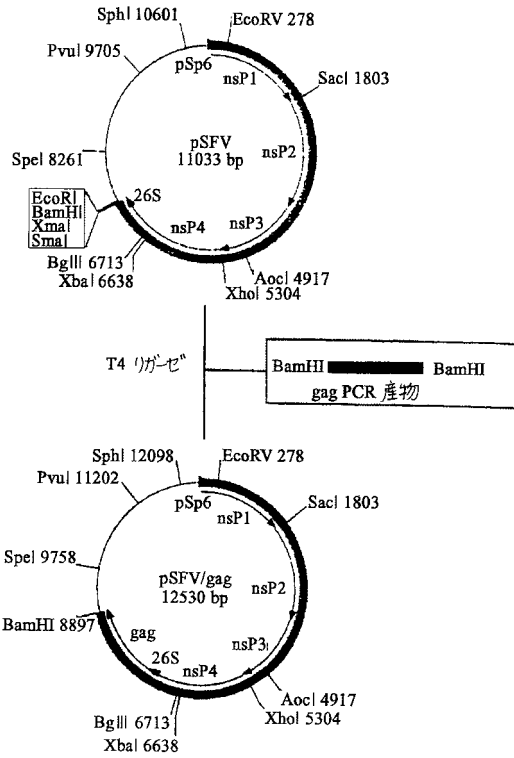


【図2】

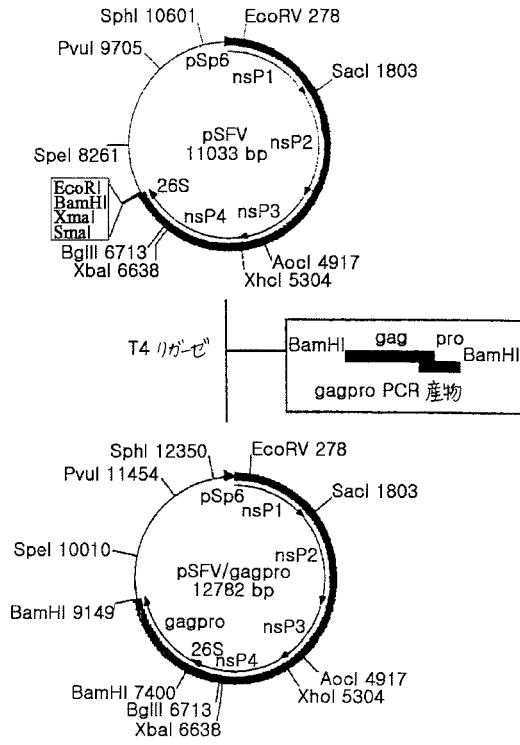
FIG. 2



【 図 3 】

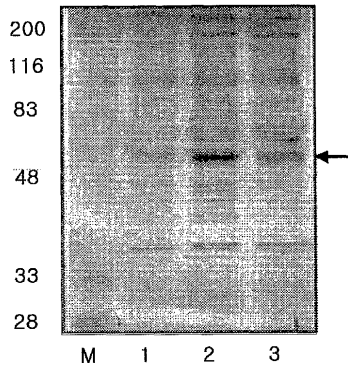


【 図 4 】



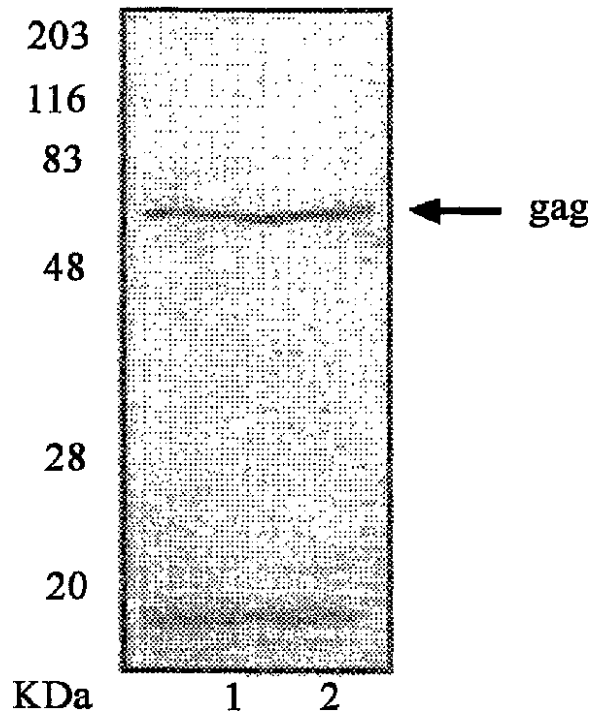
【 図 5 】

FIG. 5



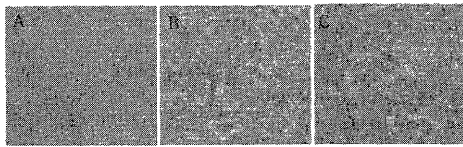
【 図 6 】

FIG. 6



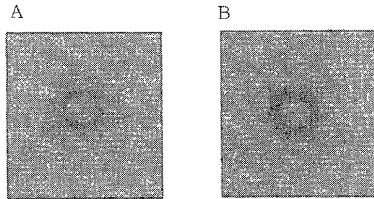
【 図 7 】

FIG. 7



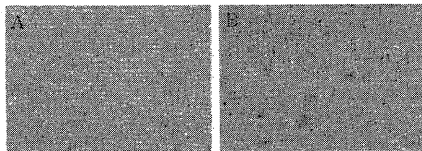
【 図 8 】

FIG. 8

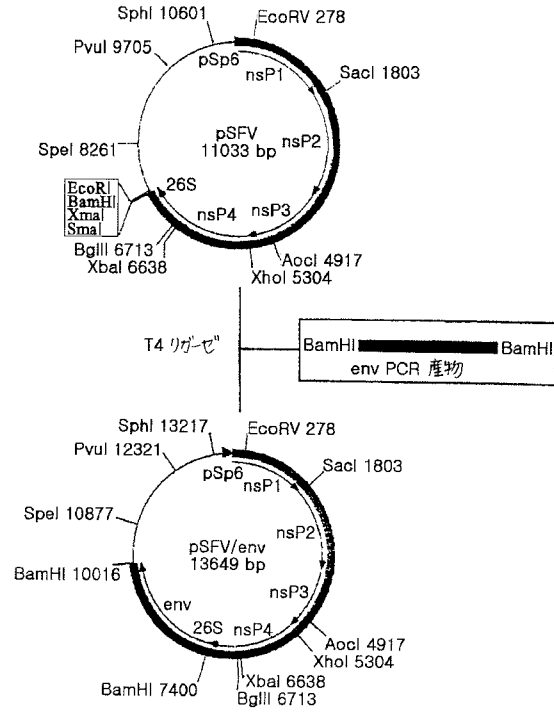


【 図 10 】

FIG. 10

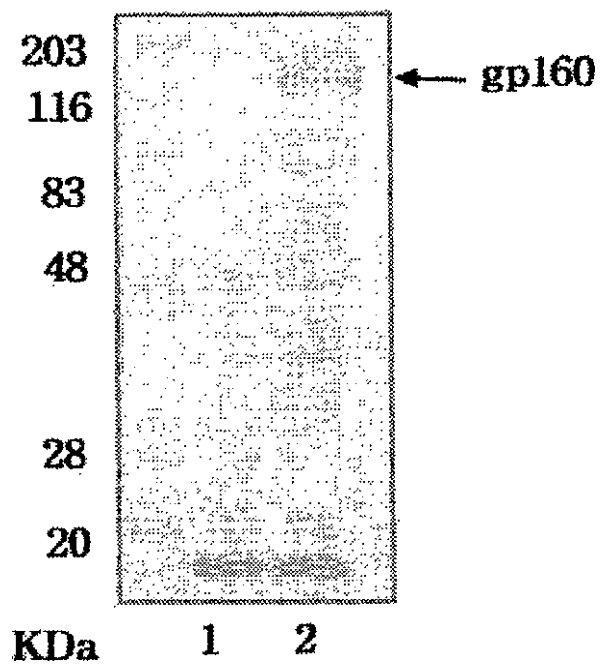


【 図 9 】



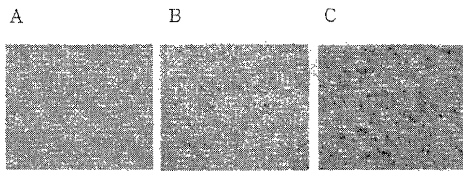
【 図 11 】

FIG. 11



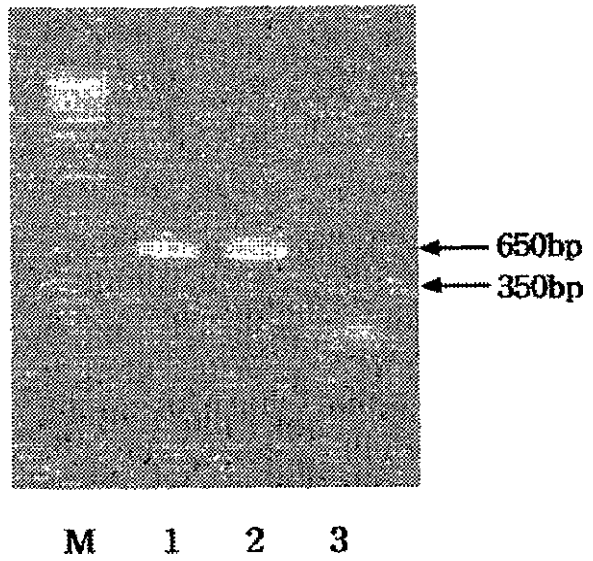
【 図 1 2 】

FIG. 12



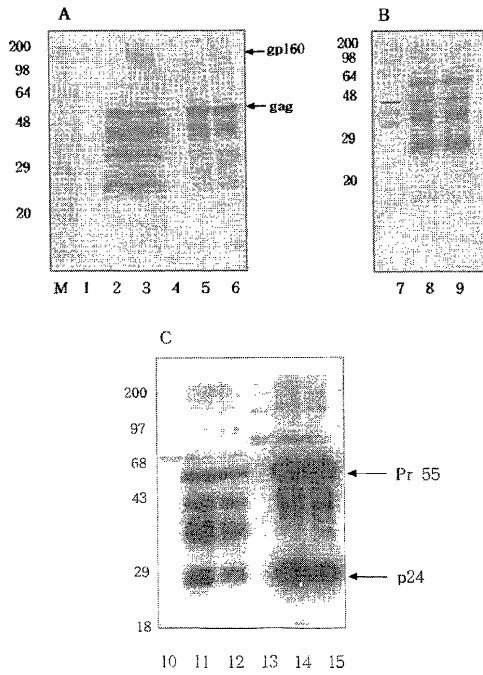
【 図 1 3 】

FIG. 13

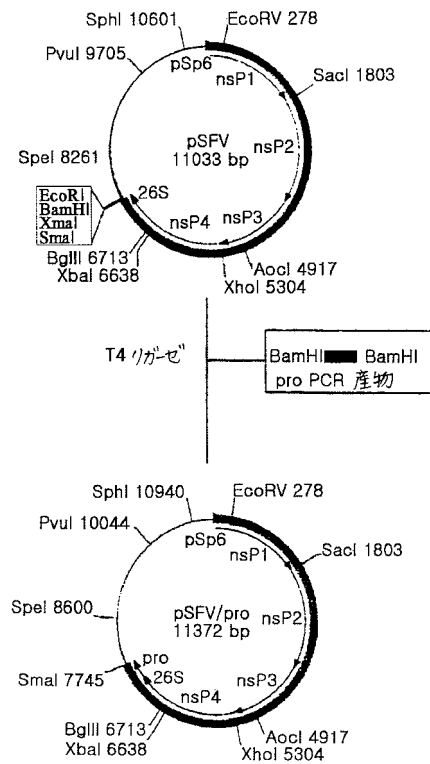


【 図 1 4 】

FIG. 14

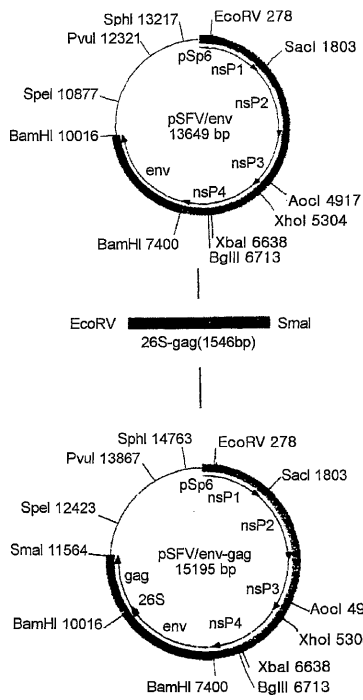


【 図 1 5 】



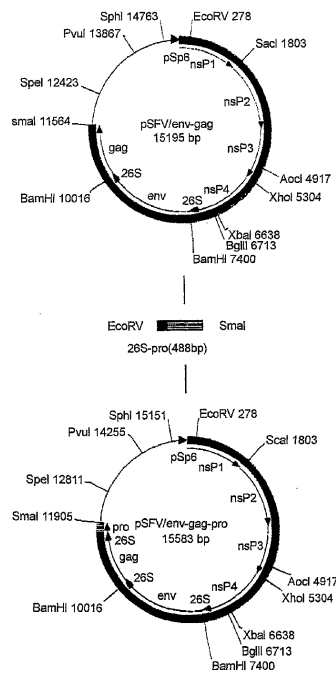
【 16 】

FIG. 16



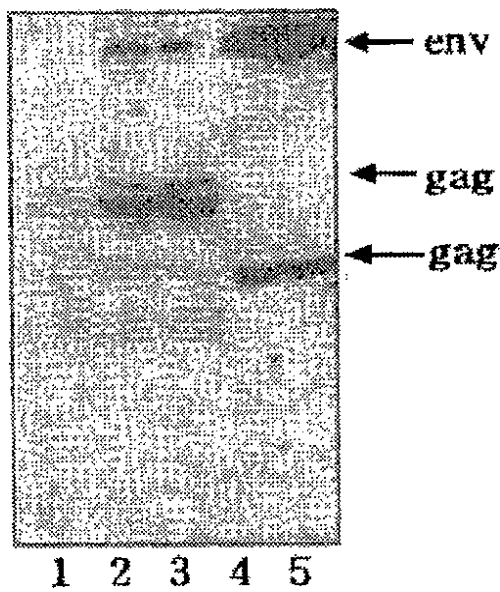
【 17 】

FIG. 17



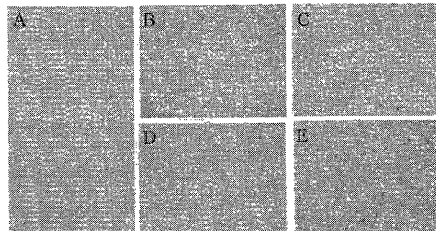
【 18 】

FIG. 18

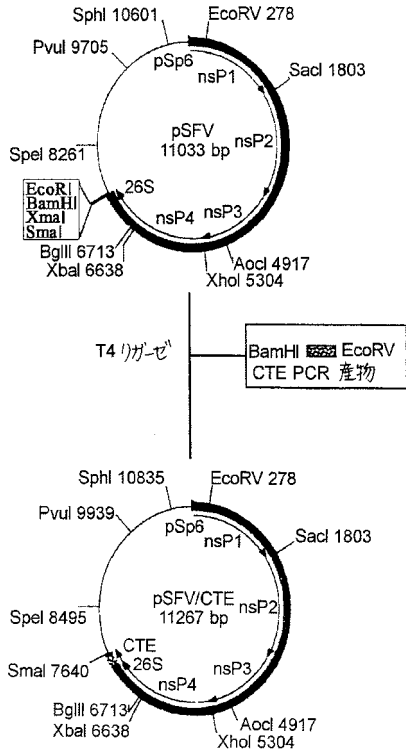


【 19 】

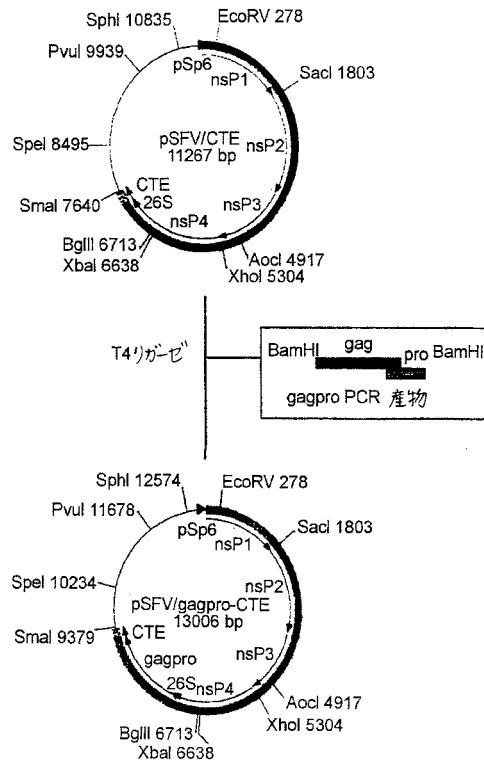
FIG. 19



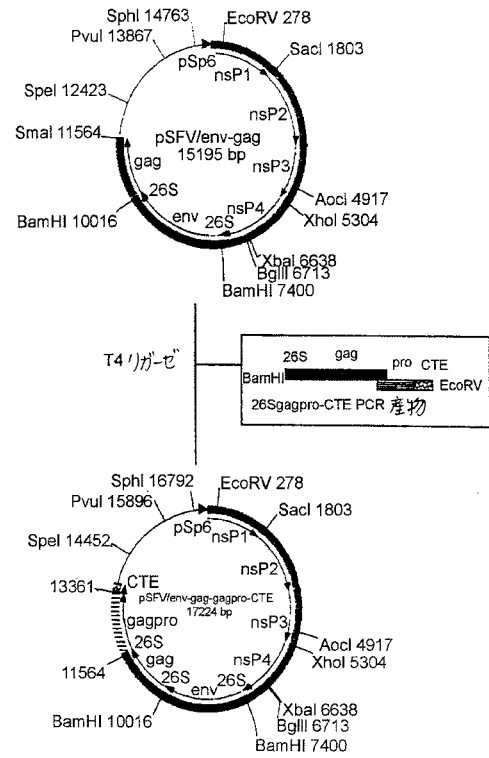
【 図 2 0 】



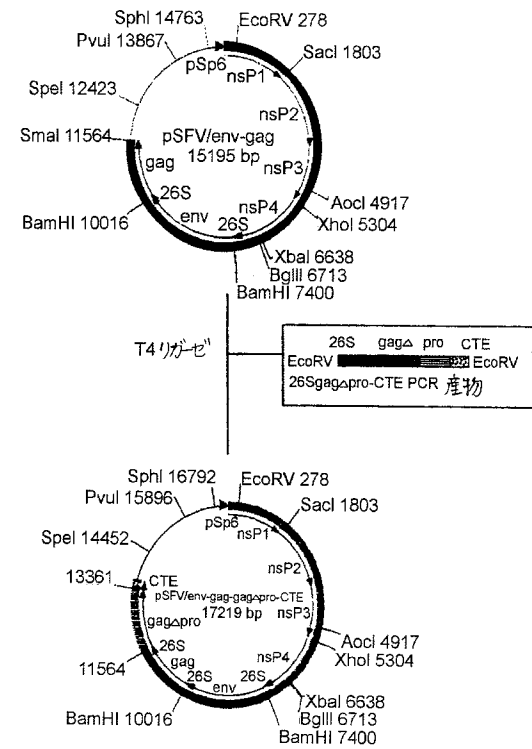
【 図 2 1 】



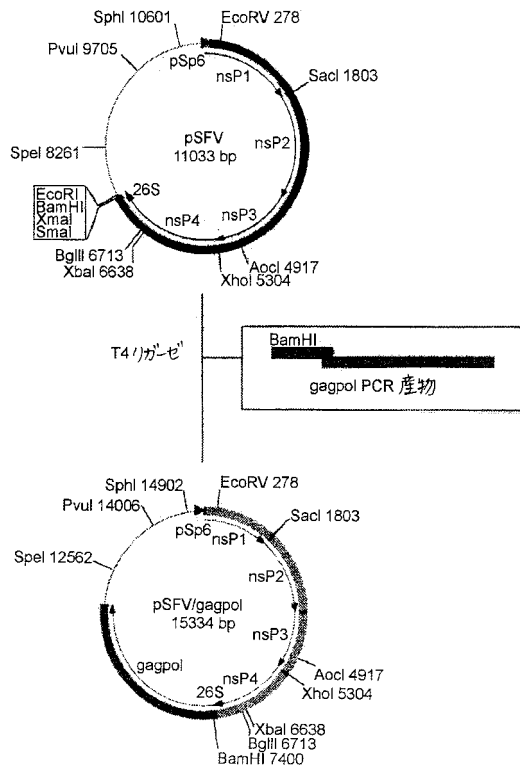
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】

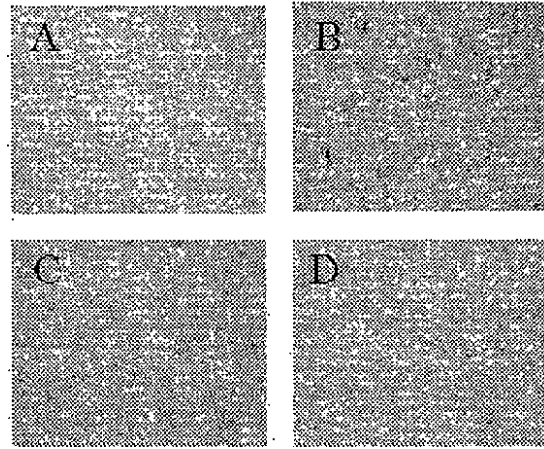


【 図 2 4 】



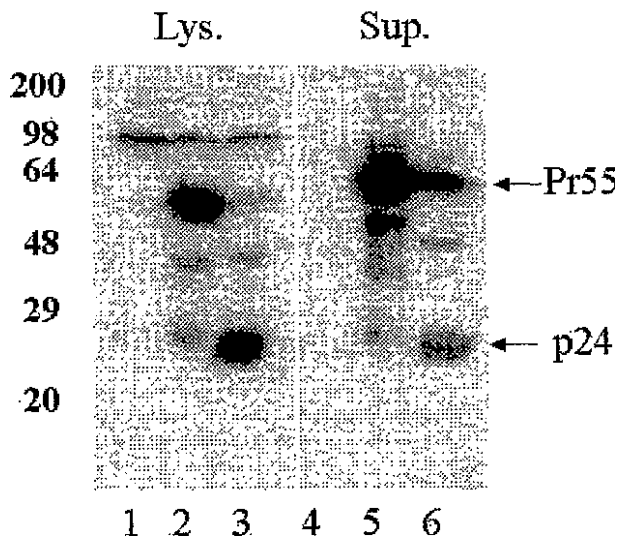
【 図 2 5 】

FIG. 25

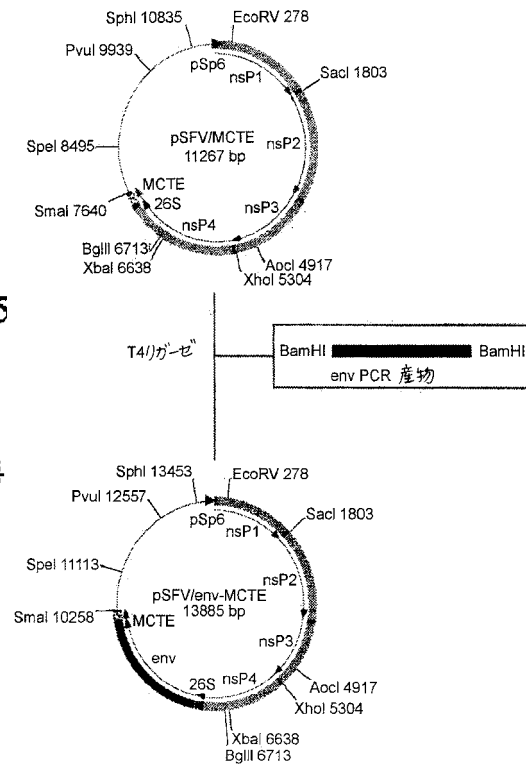


【 図 2 6 】

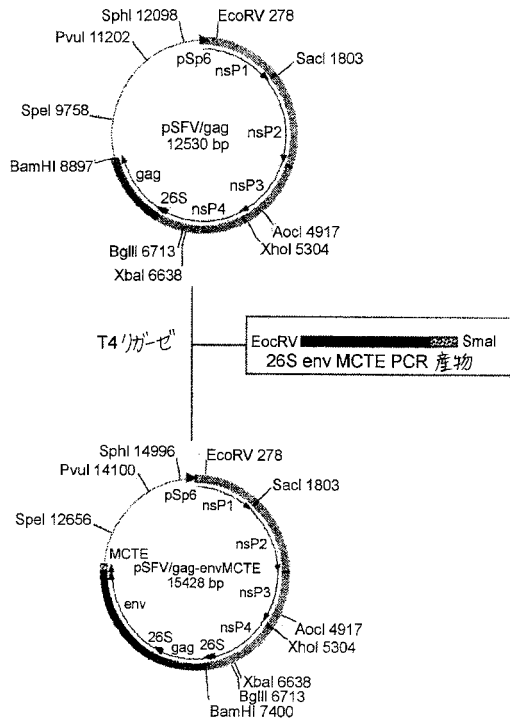
FIG. 26



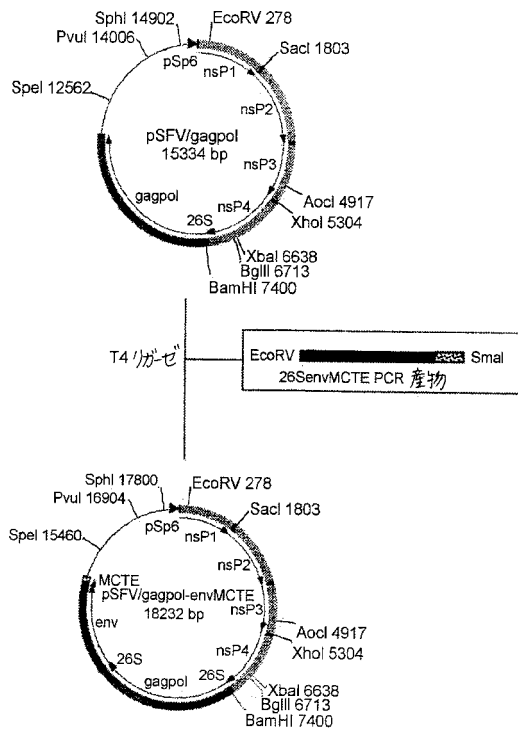
【 図 2 7 】



【 図 28 】

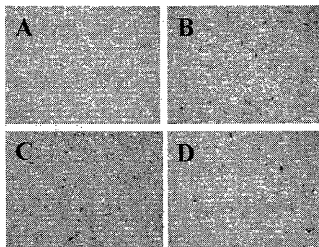


【 図 29 】



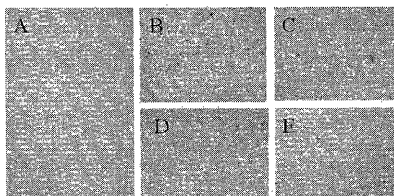
【 図 30 】

FIG. 30



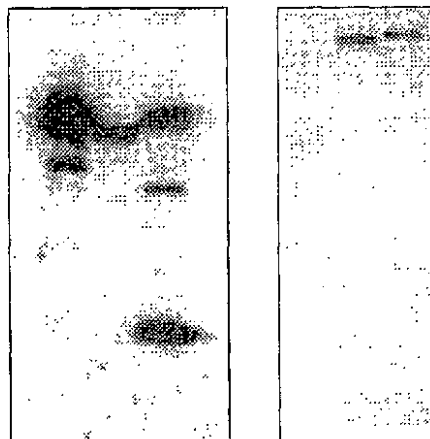
【 図 31 】

FIG. 31



【 図 32 】

FIG. 32



1 2 3

4 5 6

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)		C 1 2 Q 1/70	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/569	H

(72)発明者 キム, ウン
大韓民国, 301-150 テジョン, チュン-ク, テピョン-ドン 422-7, ポドネ アパートメント 112-2002

(72)発明者 シン, クァン-スン
大韓民国, 305-762 テジョン, ユソン-ク, ジョンミン-ドン, エキスポ アパートメント 402-104

(72)発明者 キム, ヒョン-スー
大韓民国, 305-340 テジョン, ユソン-ク, ドリョン-ドン 391, ジュゴン アパートメント 1-308

審査官 山中 隆幸

(56)参考文献 国際公開第00/039302 (WO, A1)
国際公開第99/050432 (WO, A1)
国際公開第00/039304 (WO, A1)
The Journal of Infectious Diseases, 1999年, vol.180, p.1122-1132
Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, 2001年, vol.101, p.691

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
JSTPlus(JDreamII)

专利名称(译)	HIV样颗粒及其用途		
公开(公告)号	JP4178029B2	公开(公告)日	2008-11-12
申请号	JP2002555262	申请日	2002-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	金Chorujun		
申请(专利权)人(译)	金哲 - 君		
当前申请(专利权)人(译)	金哲 - 君		
[标]发明人	キムチヨルジュン キムウン シンクァンスン キムヒヨンスー		
发明人	キム,チヨル-ジュン キム,ウン シン,クァン-スン キム,ヒヨン-スー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/12 A61K39/21 A61P31/18 C12N7/00 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/00 C07K14/16 C12N5/10 C12N15/06 C12N15/51 C12N15/63 C12N15/86		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/00 A61K2039/5258 C12N15/86 C12N2740/16023 C12N2740/16122 C12N2740/16222 C12N2770/36143 C12N2830/48		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/12 A61K39/21 A61P31/18 C12N7/00 C12Q1/70 G01N33/53.N G01N33/569.H		
代理人(译)	木岛隆一 金子 一郎		
审查员(译)	山隆行		
优先权	1020010000894 2001-01-08 KR		
其他公开文献	JP2004516846A JP2004516846A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

HIV-1的env, GAG, 亲, 所述的本发明表达pol基因的, 基于病毒α表达载体, 宿主细胞, 其中所述RNA转录物, 并转化。在本发明中, 通过使用表达载体表达HIV-1的Gag, Env, Pol和/或Pro蛋白, 产生由重组蛋白组成的HIV样颗粒。本发明的病毒样颗粒优选是成熟的感染性病毒颗粒, 可用作诊断HIV感染存在与否的诊断试剂盒的抗原, 可用作预防HIV感染的疫苗组合物。可以有效使用。

