

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-516846

(P2004-516846A)

(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12		4 B O 6 3
A 6 1 K 39/21	A 6 1 K 39/21		4 B O 6 5
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18		4 C O 8 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/00		

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-555262 (P2002-555262)	(71) 出願人	503246842 キム, チョルージュン
(86) (22) 出願日	平成14年1月8日 (2002.1.8)		大韓民国, 305-345 テジョン, ユ ソンーク, シンソンドン, ハンウル ア パートメント 103-801
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月8日 (2003.7.8)	(74) 代理人	100080034 弁理士 原 謙三
(86) 国際出願番号	PCT/KR2002/000031	(74) 代理人	100113701 弁理士 木島 隆一
(87) 国際公開番号	W02002/053757	(74) 代理人	100116241 弁理士 金子 一郎
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)	(72) 発明者	キム, チョルージュン
(31) 優先権主張番号	2001/00894		大韓民国, 305-345 テジョン, ユ ソンーク, シンソンドン, ハンウル ア パートメント 103-801
(32) 優先日	平成13年1月8日 (2001.1.8)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

(54) 【発明の名称】 HIV様粒子及びその用途

(57) 【要約】

本発明は、HIV-1のenv、gag、pro、pol遺伝子を発現させる、ウィルスをベースとした発現ベクター、そのRNA転写物及び形質転換された宿主細胞に関するものである。本発明は、前記発現ベクターを用いてHIV-1のGag、Env、Pol及び/又はPro蛋白質を発現させ、前記組換え蛋白質からなるHIV様粒子を製造した。本発明のウィルス様粒子は、好ましくは成熟、感染性ウィルス粒子であって、HIV感染有無を診断するための診断用キットの抗原として使用することができ、HIV感染を予防するためのワクチン組成物として有用に使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H I V - 1 の e n v 遺伝子 (6 2 6 4 - 8 8 7 9 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 g a g 遺伝子 (8 3 2 - 2 3 2 8 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、 ウィルス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 p S F V / e n v - g a g であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 3】

H I V - 1 の g a g 遺伝子 (8 3 2 - 2 3 2 8 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、 ウィルスをベースとした発現ベクター。

10

【請求項 4】

請求項 3 において、前記発現ベクターは p S F V / g a g - e n v であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 5】

H I V - 1 の e n v 遺伝子 (6 2 6 4 - 8 8 7 9 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 g a g 遺伝子 (8 3 2 - 2 3 2 8 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、H I V - 1 の p r o 遺伝子 (2 2 6 8 - 2 6 0 6 b p) 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。

20

【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 / e n v - g a g - p r o であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 7】

H I V - 1 の e n v 遺伝子 (6 2 6 4 - 8 8 7 9 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 g a g 遺伝子 (8 3 2 - 2 3 2 8 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、H I V - 1 の g a g p r o 遺伝子 (8 3 2 - 2 5 7 7 b p) 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。

30

【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 であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 9】

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 であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 10】

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、 ウィルスをベースとした発現ベクター。

40

【請求項 11】

請求項 10 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 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項において、C T E (c o n s t i t u t i v e t r a n s p o r t e l e m e n t) 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 13】

50

請求項 1 2 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 であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 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 であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 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 - M C T E であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 1 6】

請求項 1 2 において、前記発現ベクターは p S F V / g a g - e n v - M C T E であることを特徴とする発現ベクター。 10

【請求項 1 7】

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

【請求項 1 8】

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

【請求項 1 9】

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

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 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。 20

【請求項 2 1】

請求項 2 0 において、前記 H I V 様粒子は成熟 H I V 様粒子であることを特徴とする製造方法。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 において、前記成熟 H I V 様粒子が感染性であることを特徴とする方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 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 2 4】

請求項 2 3 において、動物細胞が安定的に形質転換された (s t a b l y t r a n s f o r m e d) ことを特徴とする宿主細胞。 30

【請求項 2 5】

免疫反応を起こすのに十分な量の、請求項 1 ~ 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 転写物を含むことを特徴とする A I D S ワクチン組成物。

【請求項 2 6】

免疫反応を起こすのに十分な量の、請求項 2 1 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 A I D S ワクチン組成物。

【請求項 2 7】

請求項 2 5 のワクチン組成物又は請求項 2 6 のワクチン組成物をヒトに投与することを特徴とする A I D S 予防法。

【請求項 2 8】

請求項 2 1 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。 40

【請求項 2 9】

(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 2 1 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。

【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 (H u m a n I m m u n o d e f i c i e n c y V i r u s - 1) は、後天性免疫不全症候群 (A c q u i r e d I m m u n o d e f i c i e n c y S y n d r o m e : 以下、「A I D S」という) の病因源である。H I V - 1はH I V - 2と共にレトロウィルスのレンチウイルス (L e n t i v i r i d a) に属し、感染性ビリオンは2つの同一の一重鎖 (s i n g l e - s t r a n d e d) からなるRNA (+) ゲノムをもっている。H I V - 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 (r e v e r s e t r a n s c r i p t a s e) によってRNAが二重鎖DNA (d o u b l e - s t r a n d e d D N A) 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。

10

【0002】

H I V - 1ゲノム (9 . 2 k b) はg a g、p o l、e n vの構造遺伝子 (s t r u c t u r a l g e n e) とt a t、r e v、n e f、v i f、v p u、v p xなどの付随遺伝子 (a c c e s s o r y g e n e) とから構成されている。図1にH I V - 1のゲノム構造を図式化した。

20

【0003】

H I VのG a g蛋白質は、g a g - p o lの全長RNAから55 k D aの前駆蛋白質 (P r 5 5 g a g) として発現される。蛋白質のN末端にミリスチレーションされており、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。P r 5 5 g a g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 (P r o) によってマトリック (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化する (G h e y s e n D . e t a l , C e l l , 5 9 , 1 0 3 - 1 1 2 (1 9 8 9) ; B r a y , M . e t a l , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 1 , 1 2 5 6 - 1 2 6 0 (1 9 9 4) ; C a n n , A . J . , a n d J . K a r n , A I D S 3 (S u p p l . 1) , S 1 9 - S 3 4 (1 9 8 9) ; R a t n e r , L . , W . e t a l . , N a t u r e 3 1 3 , 2 7 7 - 2 8 4 (1 9 8 5) ; W a i n - H o b s o n , S . e t a l . , C e l l 4 0 , 9 - 1 7 (1 9 8 5)) 。

30

【0004】

皮膜糖蛋白質 (e n v e l o p e g l y c o p r o t e i n) E n vは、スプライシングされたRNAから、g p 1 6 0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g p 1 2 0とC末端のg p 4 1蛋白質に切断され、このように生成されたg p 1 2 0は細胞膜外部 (e x t e r n a l s u r f a c e d o m a i n) に存在する糖蛋白質サブユニットを形成し、g p 4 1は膜貫通領域 (t r a n s m e m b r a n e d o m a i n) を構成する。成熟ビリオンではg p 1 2 0とg p 4 1が非共有結合してヘテロ二量体 (h e t e r o d i m e r) を形成しているが、これらはH I Vの感染性、細胞指向性 (c e l l u l a r t r o p i s m) 及び細胞病理 (c y t o p a t h o g e n i c i t y) に直接関与するものと知られている (R o b e y , E . a n d A x e l , R . , C e l l 6 0 , 6 9 7 - 7 0 0 (1 9 9 0)) 。このようにH I VのE n v蛋白質は、抗原性と密接した関連があるため、H I Vワクチンの製造において最も重要な研究対象である。

40

【0005】

プロテアーゼ (P r o) はg a g m R N Aの3'でリボソームフレームシフト (r i b

50

osomal frame shift)が生じて作られる前駆蛋白質 (Pr160 gag-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 (London), 331, 280-283 (1988); Sonigo, P. et al, Cell, 45, 375-385 (1986))。ProはPr160 gag-polポリプロテインの切断及びEnvのプロセシングに関与し、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))。

10

【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。

20

【0008】

「弱毒性ワクチン (Live attenuated vaccine)」は、例えば nef 遺伝子又は nef と vpr 遺伝子を同時に欠乏させたように、HIV 遺伝子の一部を欠損させたものであるが (Descrosiers RC., AIDS Res Hum Retroviruses, 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))、ウィ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。

30

【0009】

「組換え生ワクチン (Live recombinant vaccine)」は、非病原性ウィルスの非必須遺伝子を HIV 抗原で代替させた形態のワクチンである。文献には、ワクチニアウィルス (vaccinia virus)、ポックスウィルス (poxvirus)、カナリヤポックスウィルス (canarypox virus)、アビポックスウィルス (avipox virus)、ポリオウィルス (poliovirus)、インフルエザウィルス (Influenza virus) など gag、pol 又は env などの遺伝子を発現させ、或いは HIV の V3 loop などを含有した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); N

40

50

atuk R J . 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)) 。

【0010】

天然から分離し或いは遺伝工学的に発現させたHIV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、比較的容易に作ることができるという利点があるが、これもHIV抗原決定部位の一部のみを使用するものであって、全体ウィ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Env糖蛋白質gp120とgp160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)) 、CHO細胞で発現されたgp120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)) 。

【0011】

ワクチンをウィ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により免疫源が高くて安定的である。従って、遺伝子を含んでいない非感染性「ウィルス様粒子 (VLP ; 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RNAのないVLPを生産し、或いは組換えバキュロウィルス又はワクチニアウィルスを用いて、プロセッシングされていないGag蛋白質で構成されたVLP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)) gag - pol 遺伝子とenv 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、シンシウム抑制 (syncytium inhibiting) 、env - CD4 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。

【0012】

VLP形態のワクチンとしては、この他にもHIV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、HBVコア粒子、HBsAg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 (Gr

10

20

30

40

50

ene 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)。

【0013】

本発明者は、新しいAIDS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、AIDS疾病を予防する方法を提供することになった。

10

【0014】

〔発明の開示〕

本発明は、HIVのGag蛋白質を発現させる発現ベクター、HIVのEnv蛋白質を発現させる発現ベクター、HIVのGagとEnv蛋白質を同時に発現させる発現ベクター、HIVのGag polポリプロテインを発現させる発現ベクター、及びHIVのGag polポリプロテインとEnv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。

【0015】

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。

20

【0016】

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RNA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HIV様粒子(HIVLP)の製造方法及びその方法によって製造されたHIV様粒子を提供することにある。

【0017】

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

【0018】

また、本発明のさらに他の目的は、成熟HIV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RNA転写物を含むことを特徴とするAIDSワクチン組成物を提供することにある。

30

【0019】

また、本発明のさらに他の目的は、(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本発明の成熟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HIV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。

40

【0020】

〔発明を実施するための最良の形態〕

本発明は、HIV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HIVにはHIV-1、HIV-2、HTLV-1又はHTLV-2のようなヒトレトロウィルスが全て含まれる。

【0021】

「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

50

, 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及びその他のウイ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。

【0022】

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))。

【0023】

本発明の ウィルスは、好ましくは「セムリキ森林ウイルス(SFV: Semliki Forest virus)」と、「シンドビスウイルス(Sindbis virus)」である。さらに好ましくは、本発明の ウィルスはSFVである。本発明の具体例で使用された、SFVをベースとした発現ベクターpSFVは、SP6プロモータを有するプラスミドにSFVのcDNAゲノムを挿入したもので、SP67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26S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。

【0024】

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。pSFV-helperはSFV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、pSFV-helperを組換えpSFVベクターと共に同時トランスフェクションさせると、SFV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pSFVとpSFV-helperの構造を図2に示した。本発明で使用されるDNA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。

【0025】

本発明の一側面は、HIV-1のgag、gagpro、env、envとgag、envとgagとgagpro又はgag pro、gagpol又はgagpolとenv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。

【0026】

pro又は遺伝子を26Sサブゲノミックプロモータの下でそれぞれ挿入してGag、Env、Pol又はPro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。Proの発現はGag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 (1991))。

93); Magdeleine H. et al., J Virol. 72, 4819-1824 (1998); Joel G. et al., Virology, 244, 87-96 (1998)。本発明では、GagのプロセシングのためにProの発現を極大化するために、env遺伝子の後ろにgag pro又はgag pol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gag pro遺伝子をそれぞれ26Sプロモータに連結させ、或いはgag pol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gag 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/gag pro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gag pro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gag 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、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/gag pro-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、gag pro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、gag 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、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-gag pro-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gag mRNA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

50

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13）。

【0033】

本発明は、*HIV-1* の *gagpol* 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 *gagpol* 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。*pSFV/gagpol* は前記ベクターの例である（実施例14）。

10

【0034】

本発明は、*HIV-1* の *gag* 及び *env* 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 *gag* 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、*env* 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、*MCTE* 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】

pSFV/gag-envMCTE は前記ベクターの例である（実施例16）。

【0036】

本発明は、*HIV-1* の *gagpol* 及び *env* 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 *gagpol* 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、*env* 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、*MCTE* 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-gagpol-envMCTE* は前記ベクターの例である（実施例16）。

20

【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 *HIV-1* 構造蛋白質 *Gag*、*Pro* 及び/又は *Env*（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 *RNA* 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、*HIV-1* の *Gag*、*Pro* 及び/又は *Env* 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 *BHK/pSFV* と *COS/pSFV* であるが、本発明の発現システムはこれに制限されない。

30

【0039】

ウィルス発現ベクター又はその *RNA* 転写物は、通常のトランスフェクション方法、例えば *DEAE-Dextran*、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 *BHK-21* 細胞に導入することができる。本発明を例示する *pSFV* 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 *RNA* 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。

40

【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、その発現効率が增大する。本

50

発明は、ヘルパーウイルスを用いて作った本発明によるRNA転写物を含んでいる感染性ウイ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HIV-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。

【0041】

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HIVのcDNA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: CMV)プロモータとrev独立的な発現のためのCTE(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CTE遺伝子は、好ましくはMPMV(Mason-Pfizer monkey virus)の遺伝子である。

【0042】

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HIVLVPを製造する方法を提供する。本発明は、Gag蛋白質を発現させるベクターを宿主細胞に導入して、HIVのGagからなる未成熟ウイルス様粒子(HIVLVP)を製造する方法を提供する。HIVの場合、プロテアーゼによって切断されていないGag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、外来遺伝子を発現する発現ベクターとして使用できる。

【0043】

HIVはGag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。HIV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、Gagのみからなる組換えウイルス粒子にEnv蛋白質を挿入することはHIV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HIVのgag遺伝子を含有した前記発現ベクター及びenv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、HIVのGagとEnv蛋白質からなる未成熟ウイルス様粒子(HIVLVP)を製造する方法を提供する。

【0044】

同時トランスフェクションによるHIVLVP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HIVLVP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HIVのgagとenv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、HIV-1のGagとEnv蛋白質からなる未成熟HIV様粒子(HIVLVP)を製造する方法を提供する。

【0045】

HIVウイルスは、アSEMBL又はバツディング(budding)過程中、或いはその

後にプロテアーゼによってGag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。Gag蛋白質のみからなるHIVLPはそのサイズと模様などで天然のHIVLPとは大きい差異があり、またGagとEnvからなるHIVLPもプロテアーゼによってプロセシングされない限り、成熟ウィ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ために、天然に存在するHIVと最も類似の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。

10

【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様粒子の形成に十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。

20

【0047】

従って、本発明は、ひいては免疫反応を起こすのに十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。

30

【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分部、マイコバクテリアのトレハロースジマイコレート(trehalose dimycolate)、ホスホリピドリゾレシチン(phospholipid lysolécitin)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(dimethyldioctadecyl ammonium 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ート、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

40

50

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 (a l u m)、 t h r - M D P、 n o r - M D P、 M P T - P Eなどを挙げるができる。また、前記ワクチンは G M - C S F、 I L - 2、 I L - 1 2、 T N F及び I F N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。

【 0 0 5 0 】

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応じ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。

10

【 0 0 5 1 】

本発明は、H I V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H I V L Pと接触させ、(b)H I V L P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、H I V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H I V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。E L I S A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。

20

【 0 0 5 2 】

前記と関連した観点として、本発明は(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、請求項18の方法によって製造された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、(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。

【 0 0 5 3 】

本発明の成熟H I V様粒子は、酵素連結された免疫吸着検定(E L I S A)、R I A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ィルス(例えばH I V)H I V抗体及びレトロウィルス抗原(例えばH I V)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。E L I S A検定において、成熟H I V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H I V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(B S A)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

【 0 0 5 4 】

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B S A、ウシガンマグロブリン(B G G)及び/又はホスフェート緩衝塩水(P B S) / ツイーン(T w e e n)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P B S / 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

【 0 0 5 5 】

試験サンプルに結合した本発明の成熟H I V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

50

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】

複数のHIV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HIV様粒子を特定の表面上に固定させる。他の方法として、抗HIV抗体がいろいろのHIV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HIV様粒子を固定させることができる。単一のHIV分離体（例えば、LA1、MN、SF2又はHXB2）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HIV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HIV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。

10

【0057】

追加の診断様態として、免疫学的に区分されるHIV、例えばそれぞれ異なる部類に属するHIV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HIV分離体は、例えばLA1、MN、SF2、HXB2、又は原始HIV-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HIV様粒子はどのような免疫学的に区分されるHIV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。

20

【0058】

免疫学的に区分される成熟HIV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HIV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HIV又は抗原を検出し或いはHIVを中和させるために使用できるHIV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。

30

【0060】

さらに他の診断学的様態として、本発明の成熟HIV様粒子は、例えば診断又は治療のためのHIV感染者から採取した生物学的サンプル中でHIV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。

40

【0062】

〔実施例〕

〔実施例1〕 pSFV/gag及びpSFV/gagpro発現ベクターの製造

Gag蛋白質は、HIV-1のgagpolの全長RNAで発現されるビリオンの主な構成要素である。Gag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(VLP)をアセンブルすることができるものと知られている。Gag蛋白質はpol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(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

50

IV-1のgag遺伝子を ウィルスレプリコンに挿入してGagを発現させる発現ベクターを製造した。

【0063】

HIV clade E 遺伝子を (Genbank accession number U51188, Journal of Virology, 1996) 鋳型として使用した。pSFV/gagを作るために、Gagの全長遺伝子に該当するHIV-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。Gagと共に、プロテアーゼProを発現させるためにpSFV/gagproを製作した。HIV-1のgag、フレームシフト部位及び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 clade 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 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分間変性させた後、Taq polymerase 1μl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。

10

プライマー1:センス(序列1)

20

5' - GCGGATCCCGGGATGGGTGCGAGAGCGTCAATATTAAGT - 3'

プライマー2:アンチセンス(序列2)

5' - CGCGGATCCCTGTTACTGTGACAAAGGGGTCGTTGCCA
AA - 3'

プライマー3:アンチセンス(序列3)

5' - CGCGGATCCCTGCAGTTAAAGTACAACCAATCTGAGT
CAACA - 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

30

HIV-1のプロテアーゼ(Pro)は、ビリオンの 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DNA10μ、10xSP6バッファ(TaKaRa)5μl、10mM m7G(5')ppp(5')G(BM)5μl、100mM DTT
2.5μl、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(107 cells/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 P

40

50

ulser)。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)。

10

【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発現システムのウェスタンブロットではpSFV/gagの場合に比べて少量のGag蛋白質が検出された(図5、レイン3)。

【0067】

TNEバッファに浮遊しているウイルス粒子100μlにキモトリプシン(10mg/ml)5μl、50mM CaCl₂5μlを入れて氷で30分間反応させた後、アプロチニン(2mg/ml)45μlを入れて前記VLPを活性化させた。前記活性化された粒子を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, 1μg/ml PMSF)200μlで1時間反応させ、遠心分離(12000rpm、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15V、7mA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である。プロットはAB溶液と反応させた後、DAB溶液で発色させた(図6)(レイン1:pSFV/gagから得られたVLPで感染させたBHK-21細胞;レイン2:pSFV/gagproから得られたVLPで感染させたBHK-21細胞)。55kDaのバンドは、再感染結果、BHK-21細胞の細胞質でGag蛋白質が生成されたことを示す。従って、pSFV/gag又はpSFV/gagproから得られたVLPが、gag遺伝子を有する感染性VLPであることが分る。

20

30

【0068】

[実施例3] pSFV/gag又はpSFV/gagproを用いたVLPの製造
前記実施例2で作られたVLPには、SFVのコアからなるVLP(SFVLPgag又はSFVLPgagpro)とHIV-1コアを有するVLP(HIVLVPgagまたはSFVLPgagpro)とが混合されているので、HIV-1コアからなるVLPのみを発現させようと、実施例1で作製されたpSFV/gagとpSFV/gagproをそれぞれ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、HIVのp24(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IgGである。前記実験結果、形質転換されたBHK-21細胞でGag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BHK-2細胞;B:pSFV/gagで形質転換されたBHK-21細胞;C

40

50

: 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)。

【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。

【0070】

[実施例 4] p S F V / e n v 発現ベクターの製造

10

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 (G e n b a n k a c c e s s i o n n u m b e r U 5 1 1 8 8 , J o u r n a l o f V i r o l o g y , 1 9 9 6) 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 ' - C G C G C C T C G A G C G G G A T C C C A T G A G A G T G A A G G G G A C A C G G A - 3 '

プライマー 5 : アンチセンス (序列 5)

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

鋳型 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 (B o e h r i n g e r M a n n h e i m , G e r m a n y) 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 、T a q p o l y m e r a s e 1 0 X バッファ 5 μ l 、D . W . 3 7 μ l を入れて混合液を作った後、9 8 °C で 5 分間加温し、その後 T a q p o l y m e r a s e 1 μ l を添加した後、9 4 °C で 1 分、5 5 °C で 2 分、7 2 °C で 3 分に保たせる一連の反応を 3 0 回繰り返し行った。増幅された遺伝子を p S F V ベクターの B a m H I サイトに挿入して p S F V / e n v 発現ベクターを製作した (図 9)。

20

【0071】

[実施例 5] p S F V - h e l p e r 及び p S F V / e n v を用いた V L P の製造

30

H I V - 1 の E n v のみでは V L P を形成することができないので、p S F V - h e l p r と p S F V / e n v を用いて V L P を製造した。実施例 4 で製造された p S F V / e n v 発現ベクターを制限酵素 S p h I で処理して線状 DNA に作った後、P / C 処理した。この DNA 1 0 μ l 、1 0 x S P 6 バッファ (T a K a R a) 5 μ l 、1 0 m M m 7 G (5 ') p p p (5 ') G (B M) 5 μ l 、1 0 0 m M D T T 2 . 5 μ l 、r N T P m i x (1 0 m M A T P 、1 0 m M C T P 、1 0 m M U T P 、5 m M G T P 、B M) 5 μ l 、R N a s i n (B M) 2 μ l 、S P 6 R N A ポリメラーゼ (T a K a R a) 1 . 5 μ l 、D . W . 1 9 μ l) で混合液を作った後、3 7 °C で 1 時間 3 0 分間反応させた。m R N A 転写物 (p S F V / h e l p e r R N A 転写物 2 5 μ l 及び p S F V / e n v R N A 転写物 5 0 μ l) を P B S に浮遊させた B H K - 2 1 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 4 8 時間の後、上澄液を 3 5 0 0 r p m で、1 5 分間遠心分離した後超高速遠心分離 (S W 4 1 r o t o r , 2 h r , 3 0 , 0 0 0 r p m , 4 °C , B E C K M A N) してウィルス粒子を得た。このペレットは T N E (5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 4) , 1 0 0 m M N a C l , 0 . 5 m M E D T A) バッファに浮遊させて - 7 0 °C で保管した。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 1 0) (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 細胞 ; B : p S F V / e n v でトランスフェクションされた B H K 細胞)。1 次抗体として g p 1 6 0 に対するモノクローナル抗体 (1 m g / m l)、2 次抗体として、ビオチン化された抗マウス I g G (5 μ l / m l) を使用し、A B 溶液 (a v i d i n 5 μ l , b i o t i n 5 μ

40

50

l / P B S 1 M l , V E C T O R) に 3 0 分 間 反 応 さ せ た 後 、 D A B (3 , 3 ' - d i a m i n o b e z i d i n e) 溶 液 (ベ ク タ ー) で 発 色 さ せ た 。

【 0 0 7 2 】

p S F V / e n v で ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン さ れ た 細 胞 で E n v 蛋 白 質 が 発 現 さ れ た 。

【 0 0 7 3 】

T N E バ ッ フ ァ に 浮 遊 し て い る ウ イ 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 V L P を 活 性 化 さ せ た 。 前 記 粒 子 を ウ イ ル ス 7 0 % 単 一 層 の (m o n o l a y e r e d) 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 て 2 日 間 培 養 し た 。 2 日 後 に 細 胞 溶 解 バ ッ フ ァ (c e l l l y s i s b u f f e r : 1 % N P 4 0 , 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 6) , 1 5 0 m M N a C l , 2 m M E D T A , 1 μ g / M l P M S F) 2 0 0 μ l で 1 時 間 反 応 さ せ た 後 、 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 プ 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 ェ ク シ ョ ン し た 後 、 特 異 的 抗 体 を 用 い て ウ ェ ス タ ン プ 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 あり 、 プ 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 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 。

10

20

【 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 セ ン ブ ル 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 (G h e y s e n D . e t a l . , C e l l , 5 9 , 1 0 3 - 1 1 2 (1 9 8 9) ; L a s k y , L . A . e t a l . , S c i e n c e , 2 4 9 , 9 3 2 - 9 3 5 (1 9 8 6) ; L a s k y , L . A . e t a l . , C e l l , 5 0 , 9 7 5 - 9 8 5 (1 9 8 7)) 。 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 。

30

【 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 。

40

【 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

50

O₄ - アセテートバッファ状態で反応させた。RNA分離キット (Viral RNA purification kit; Viogene) を用いてRNAを分離し、RT-PCRとPCRを行った。gag遺伝子のためには650bp程度のp24遺伝子を増幅し、env遺伝子のためには350bp程度のgp41の一部を増幅させた。

【0077】

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 DTT、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 (dNTP; 25 mM; Takara) 及びプライマーを入れた後、総20 μ lにして42 °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pol遺伝子から由来した逆転写酵素 (Gibco BRL)) を入れて42 °Cで50分間反応させてcDNAを作った。gag RNA に対しては1 μ lの100 pmolのプライマー6を、env RNAのためにはプライマー7を使用した。プライマー6: アンチセンス (序列 6)

5' - CCCAAGCTTTTAGCATGCTGTCATCATTTTC - 3'

プライマー7: アンチセンス (序列 7)

5' - GGTTCTGCAGAAGCTTCCCTTGTTATTTTCAAACCA - 3'

生成されたRNA/DNAハイブリッドを変性させた後、70 °Cで15分間逆転写酵素の活性を抑制させた。このように生成されたcDNAをZtaq DNAポリメラーゼ (Takara) 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、gag RNA 検索; プライマー9とプライマー7、env RNA 検索)。

プライマー8: センス (序列 8)

5' - CCCAAGCTTTCATCAGGCCTTATCACCT - 3'

プライマー9: センス (序列 9)

5' - TCCCCCGGGAAGCTTGCAGCAGCATCTGTTG - 3'

鋳型として前記のRT-PCRで生成されたcDNA 10 μ l、2.5 mM dNTP (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、Ztaq polymerase 10Xバッファ 5 μ l、D.W. 28 μ l、Ztaq polymerase (Takara) 1 μ lを入れて混合液を作った後、94 °Cで5分間変性し、その94 °Cで1分、55 °Cで1分、72 °Cで1分の一連の反応を35回行い、72 °C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、UVイリュミネーション (illumination) で観察した。

【0078】

p24遺伝子はpSFV/gag RNA転写物のみを発現させて得られたHIVLP又はpSFV/gagとpSFV/env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HIVLPで増幅された (図13のレイン1及び2)。ところが、gp41遺伝子はいずれのVLPでも増幅されなかった (図13のレイン1ないし3)。前記結果は只gag遺伝子を持ったRNAのみがVLP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: pSFV/gagから得られたVLP; レイン2と3: pSFV/gagとpSFV/envの同時トランスフェクションによるVLP; レイン1と2はp24プライマーを用いて増幅したもので、レイン3はp41プライマーを用いて増幅したものである。650bpはgag遺伝子部位を、350bpはenv遺伝子部位を示す)。

【0079】

[実施例8] 欠損SFVLPの感染によるVLPの生産
前記実施例2及び実施例5から得られたVLPをin vitroで活性化させてCOS-1細胞に感染させた後、VLP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VLPとをAIDS患者の血清とp24に対するポリクローナル抗体 (ウサギ) とp24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14

)。 (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 , 1 0 , 1 3) ; S F V L P g a g による感染 (レイン 2 , 5 , 8 , 1 1 , 1 4) ; 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 , 1 2 , 1 5) ; 細胞溶解物 (レイン 1 , 2 , 3 , 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2) ; V L P (レイン 4 , 5 , 6 , 1 3 , 1 4 , 1 5)) 。

【 0 0 8 0 】

図 1 4 の A と B において、 g a g 遺伝子を含有した欠損 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。

10

【 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 (B i o g e n e s i s , C a t . N o . 4 9 9 9 - 8 6 0 7) 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 C O S - 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 の前駆体がプロセシング或いは変性されることができると考えられる。

20

【 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、鋳型として 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 (B o e h r i n g e r M a n n h e i m , G e r m a n y) 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 、 T a q p o l y m e r a s e 1 0 X バッファ 5 μ l 、 D . W . 3 7 μ l を入れて混合液を作った後、 9 8 ° C で 5 分後、 T a q p o l y m e r a s e 1 μ l を添加し、その後 9 4 ° C で 1 分、 5 5 ° C で 1 分、 7 2 ° C 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

30

プライマー 1 0 : センス (序列 1 0)

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

プライマー 1 1 : アンチセンス (序列 1 1)

5 ' - C A A C C C G G G T C G C G A T T A A G T G T C A A T A G G A C T A A T - 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) 。

40

【 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 を鋳型として 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 1 2 : センス (序列 1 2)

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

プライマー 1 3 : アンチセンス (序列 1 3)

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

50

前記で製造した p S F V / p r o を鋳型として、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ッ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。 10

【0085】

[実施例 10] 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 (e n h a n c e d c h e m i l u m i n e s c e n t s u b s t r a t e) 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。 20

【0086】

[実施例 11] p S F V / e n v - g a g - p r o の発現による V L P の製造
前記実施例 9 で製造された p S F V / e n v - g a g - p r o 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。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させた後、4 8 時間後に細胞を A I D S 患者の血清、g p 1 6 0 に対するモノクローナル抗体、p 2 4 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 1 9）（A：陰性対照群；B：患者の血清；C：g p 1 6 0 に対するモノクローナル抗体；D：p 2 4 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 2 6 S サブゲノミックプロモータから G a g、E n v 及び P r o 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。 30

【0087】

[実施例 12] 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
p S F V / C T E ベクターを製造するために、p G E M 7 f z (-) / M P M V を鋳型として下記のプライマー 1 4 とプライマー 1 5 を用いて増幅した後、p S F V の B a m H I と S m a I サイトに挿入した（図 2 0）。前記ベクターに実施例 1 で製造した p S F V / g a g p r o の g a g p r o を B a m H I 処理して p S F V / C T E の B a m H I サイトに挿入して p S F V / g a g p r o - C T E を製造した（図 2 1）。p S F V / g a g p r o - C T E ベクターは p S F V / g a g p r o 序列の後に M a s t o n - P f z i e r m o n k e y ウィルスの C T E 遺伝子を挿入したものである。 40

【0088】

前記 p S F V / g a g p r o - C T E を鋳型として、2 6 S サブゲノミックプロモータを含んだ g a g p r o 全長遺伝子と C T E 遺伝子を P C R で増幅し、実施例 9 で製作された 50

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 1 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)、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 $^{\circ}$ Cで5分後、Taq polymerase 1 μ lを添加し、その後94 $^{\circ}$ Cで1分、55 $^{\circ}$ Cで1分、72 $^{\circ}$ C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。

プライマー14:センス(序列14)

5' - AATGGATCCCTCCCTGTGAGCTAGACT - 3'

プライマー15:アンチセンス(序列15)

5' - AATGATATCAGATCTCCAAGACATCATCCGGGCA - 3'

[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 1 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 $^{\circ}$ Cで5分後、Taq polymerase 1 μ lを添加し、その後94 $^{\circ}$ Cで1分、55 $^{\circ}$ Cで1分、72 $^{\circ}$ C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' - CACAGGCCTATAGGGAAAATCTGGCCTTC - 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 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Gag pol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、Gag pol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/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 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分間変性させ、その後Taq polymerase 1μl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' - TTAGGATCCATGGGTGCGAGAGCGTCA - 3'

プライマー19:アンチセンス(序列 21)

5' - CGCGGATCCCTAATCCTCATTTCTGTCTACC - 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-helperRNA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/gagpol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/gagpol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/gagpolをトランスフェクションしたBHK-21細胞内では殆どのPr55がプロセシングされて多量のp24が発現され、上澄液ではプロセシングされた成熟VLPを発見することができた。

【0095】

[実施例16] pSFV/gag-entMCTEとpSFV/gagpol-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/gpolのSmaIサイトに挿入することにより、pSFV/gpol-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。

10

20

30

40

50

【0096】

pS F V / g a g - e n v M C T E を作るために、まず p S F V / g a g を新しく構築した。実施例1で作られた p S F V / g a g の g a g 遺伝子の前には S m a I サイトを含んでいるので、S m a I 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 G a g の全長遺伝子に該当する H I V - 1 の塩基序列 (8 3 2 - 2 1 1 3 b p) を P C R で増幅して前記実施例1と同一の方法で製造した。

【0097】

p S F V / g a g - e n v M C T E は、実施例12で製造された p S F V / M C T E の B a m H I サイトに、前記実施例4と同一の方法で製造された p S F V / e n v M C T E (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 M C T E に対するプライマー15 (アンチセンス) を用いて26 e n v M C T E 遺伝子を増幅した後、p S F V / g a g の S m a I サイトに挿入することにより製造した (図28) 。

【0098】

p S F V / g a g p o l - e n v M C T E は、前記の方法で26S e n v M C T E 遺伝子を増幅した後、p S F V / g a g p o l の S m a I サイトに挿入することにより製造した (図29) 。本発明の p S F V / g a g p o l - e n v - M C T E ベクターは、ブダペスト条約下の国際寄託機関である K o r e a n C u l t u r e C e n t e r o f M i c r o o r g a n i s m s に寄託番号 K C C M - 1 0 3 4 8 で寄託された。

【0099】

[実施例17] p S F V / g a g - e n v M C T E 及び p S F V / g a g p o l - e n v M C T E を用いた V L P の生産

p S F V / g a g - e n v M C T E を 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 - 2 0 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、細胞を A I D S 患者の血清、p 2 4 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 e n v 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 : p 2 5 p 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) 。前記実験結果、形質転換された B H K - 2 1 細胞で G a g 蛋白質だけでなく E n v 蛋白質が発現されたことを確認することができた。

【0100】

p S F V / g a g p o l - e n v M C T E 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 : p 2 4 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 : e n v 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 B H K - 2 1 細胞で G a g p o l 蛋白質だけではなく E n v 蛋白質が発現されたことを確認することができた。

【0101】

p S F V / g a g - e n v M C T E 及び p S F V / g a g p o l - e n v M C T E 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48時間後、その培地の上澄液から V L P を分離して p 2 4 に対するポリクローナル抗体、e n v に対するモノクローナル抗体で E C L 方法を用いてウェスタンブロットした (図32) (A : 患者の血清 ; B : e n v に対するモノクローナル抗体 ; レイン1、4 : p S F V / g a g から得られた V L P ; レイン2、5 : p S F V / g a g - e n v M C T E から得られた V L P ; レイン3、6 : p S F V / g a g p o l - e n v M C T E から得られた V L P) 。前記の結果により、p S F V / g a g p o l - e n v M C T E を発現させた場合、E n v を含み、プロセシングされた成熟 V L P を生産することができた。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は H I V - 1 のゲノム構造を示す概要図である。

【図2】

図2はpS F Vベクター及びpS F V - h e l p e rの構造を示す概要図である。

【図3】

図3はpS F 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4】

図4はpS F 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5】

図5はpS F V - h e l p e rとpS F V / g a g、又はpS F V - h e l p e rとpS F V / g a g p r oRNA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。

10

【図6】

図6はpS F V - h e l p e rとpS F V / g a g、又はpS F V - h e l p e rとpS F V / g a g p r oRNA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*i n v i t r o*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。

【図7】

図7はpS F V / g a g又はpS F V / g a g p r oRNA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。

20

【図8】

図8はpS F V / g a g (A) 又はpS F V / g a g p r o (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pS F V / e n v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pS F V - h e l p e rRNA転写物と共にpS F V / e n vRNA転写物をBHK - 21細胞にトランスフェクションした後、gp160に対するモノクローナル抗体で免疫化学ステイニングしてgp160の発現を確認した写真である。

30

【図11】

図11はpS F V - h e l p e rRNA転写物と共にpS F V / e n vRNA転写物をBHK - 21細胞にトランスフェクションして得た欠損SFV粒子をさらに*i n v i t r o*活性化してBHK - 21細胞に感染させ、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。

【図12】

図12はpS F V / g a gとpS F V / e n vRNA転写物を同時にBHK - 21細胞にトランスフェクションした後、gp160に対するモノクローナル抗体(B)又はAIDS患者の血清(C)で細胞を免疫化学ステイニングしてHIV - 1 EnvとGag蛋白質が同時に発現されたことを示す写真である。

40

【図13】

図13はpS F V / g a gRNA転写物、又はpS F V / g a gとpS F V / e n vRNA転写物を同時にBHK - 21細胞にトランスフェクションしてそれぞれVLPを得た後、これらの粒子内にパッケージングされたRNAをRT - PCRとPCR分析した結果を示す写真である。

【図14】

図14はpS F V - h e l p e rとpS F V - g a gRNA転写物、又はpS F V - h e l p e rとpS F V / e n vRNA転写物をBHK - 21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SFV粒子を*i n v i t r o*活性化させてCOS - 1細胞に再感染させた結果、HIV - 1のGagとEnvからなるVLPが生成されたことを示す

50

ウェスタンブロット写真である。

【図15】

図15はpSFV/pro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pSFV/env-gag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pSFV/env-gag-pro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pSFV/env-gagのRNA転写物をBHK-21細胞にトランスフェクションして得たVLP又は細胞溶解物を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。 10

【図19】

図19は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した結果、HIV-1のGag、Env及びPro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pSFV/CET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pSFV/gagpro-CTE発現ベクターの製造過程を示す概要図である。 20

【図22】

図22はpSFV/env-gag-gagpro-CTE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pSFV/env-gag-gagpro-CTE発現ベクターの製造過程として、gagの3'末端で生ずるフレームシフト塩基序列を除去したgagproをpSFV/env-gagに挿入したことを示す概要図である。

【図24】

図24はpSFV/gagpolの製造過程を示す概要図である。

【図25】

図25はpSFV/gagpolをBHK-21の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Gag及びGagpolポリプロテインの発現を確認した写真である。 30

【図26】

図26はpSFV/gagpolのRNA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結果を示す写真である。

【図27】

図27はpSFV/envMCTEの製造過程を示す概要図である。 40

【図28】

図28はpSFV/gag-envMCTEの製造過程を示す概要図である。

【図29】

図29はpSFV/gagpol-envMCTEの製造過程を示す概要図である。

【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。

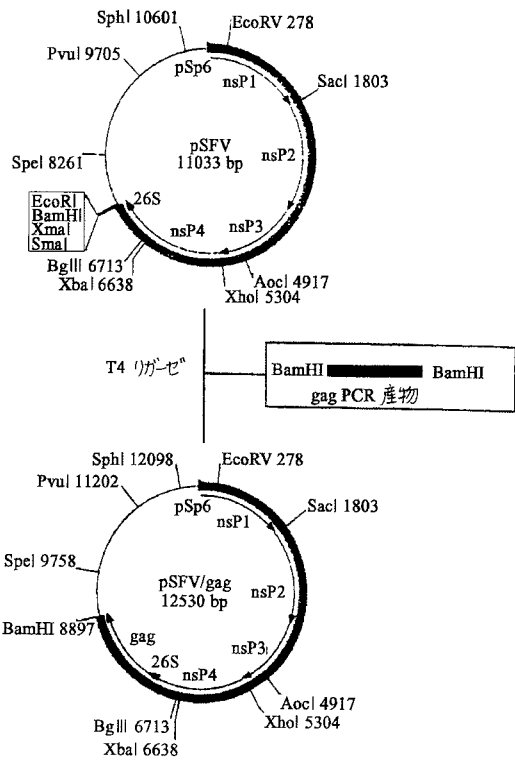
【図31】

図 3 1 は p S F V / g a g p o l - e n v M C T E 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 2 4 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 e n v 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 G a g p o l ポリプロテイン及び E n v 蛋白質の発現を確認した写真である。

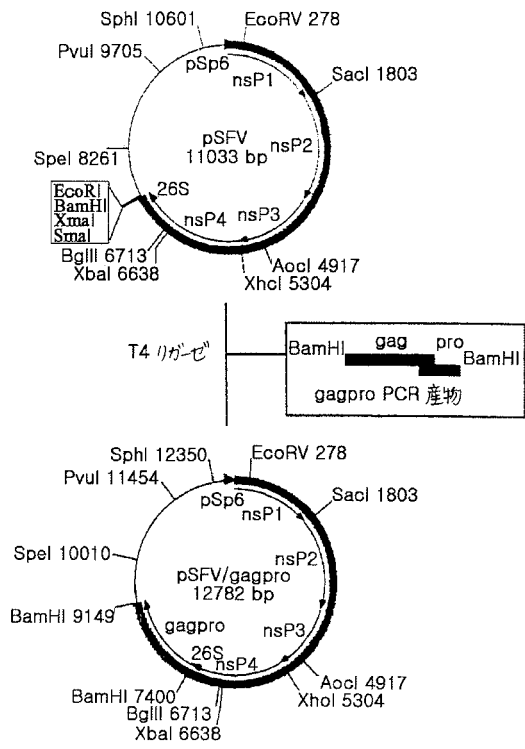
【 図 3 2 】

図 3 2 は p S F v / g a g - e n v M C T E 及び p S F V / g a g p o l - e n v M C T E 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、48 時間後、細胞を p 2 4 に対するポリクローナル抗体及び e n v に対するモノクローナル抗体で 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。

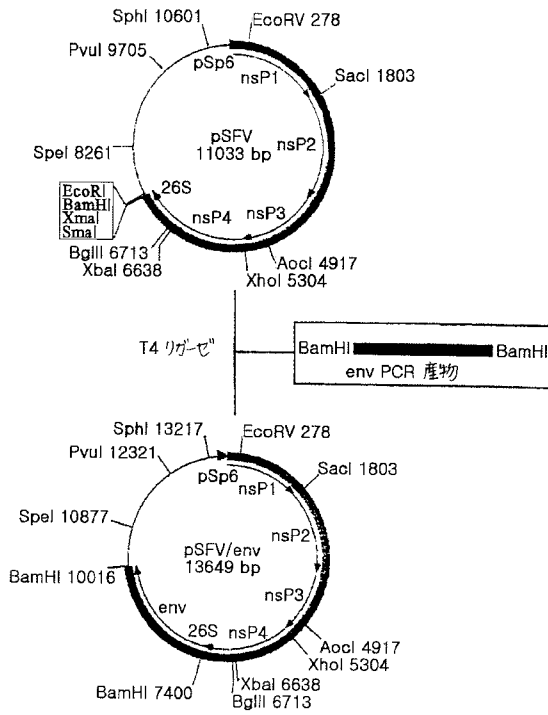
【 図 3 】



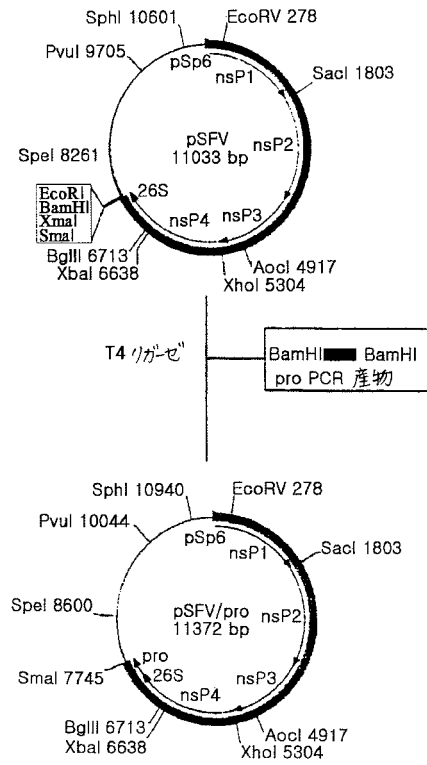
【 図 4 】



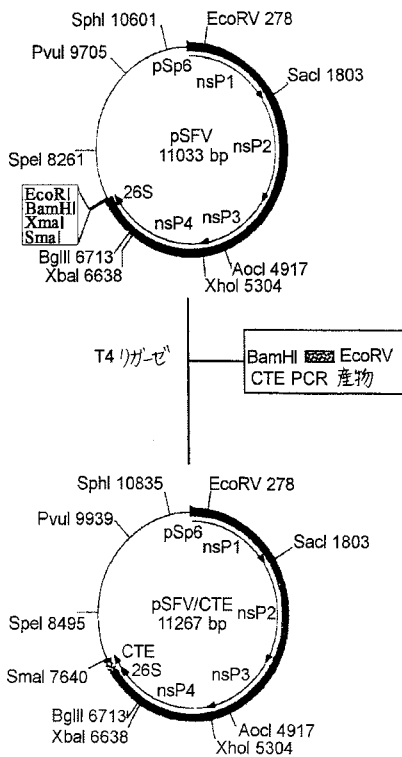
【 図 9 】



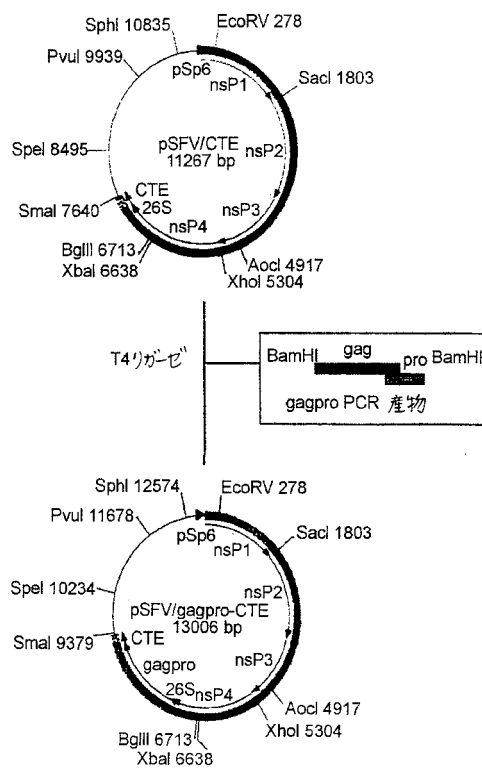
【 図 15 】



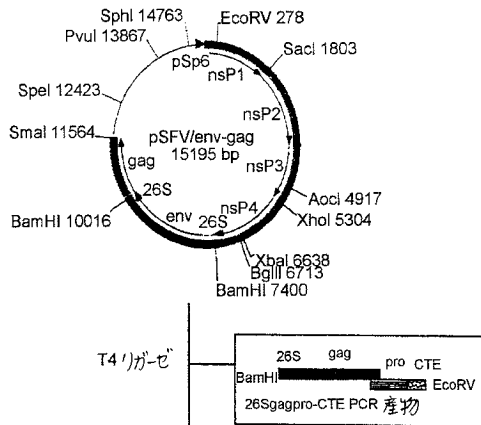
【 図 20 】



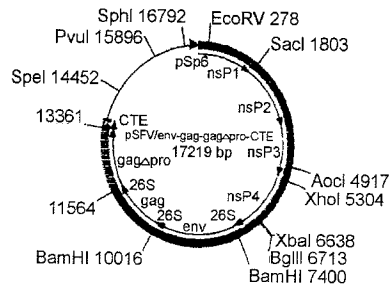
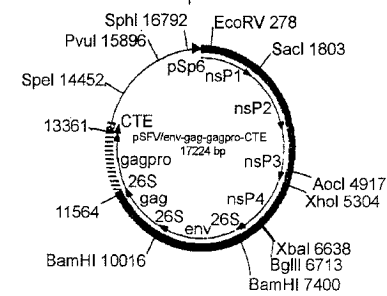
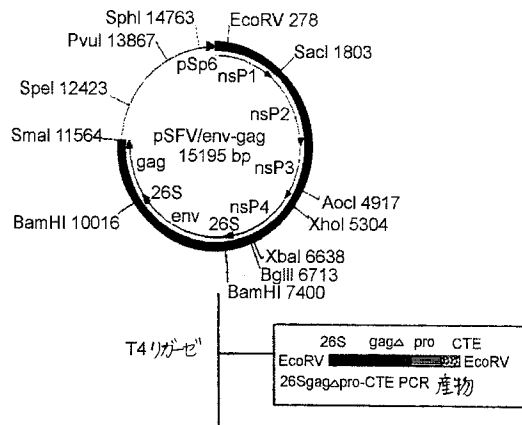
【 図 21 】



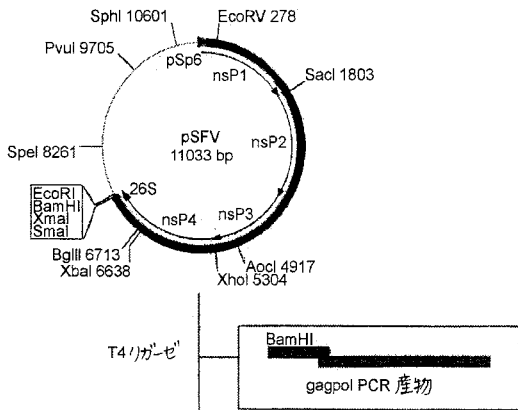
【 図 2 2 】



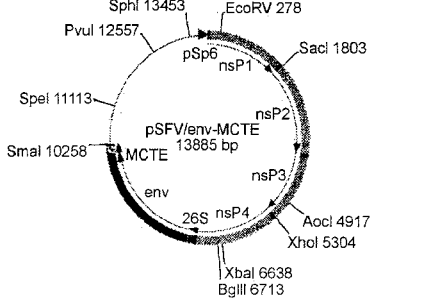
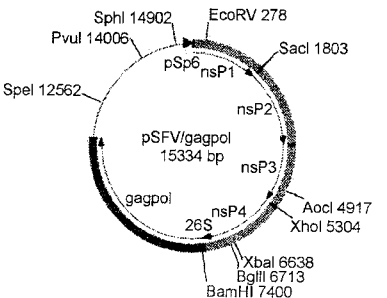
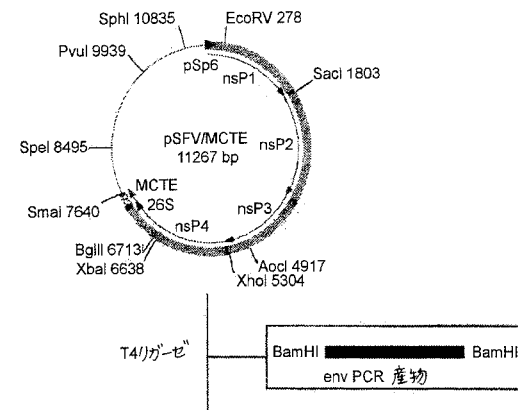
【 図 2 3 】



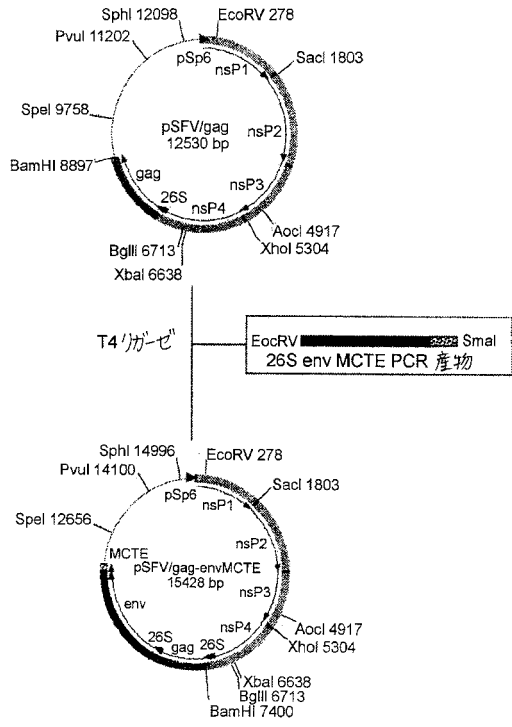
【 図 2 4 】



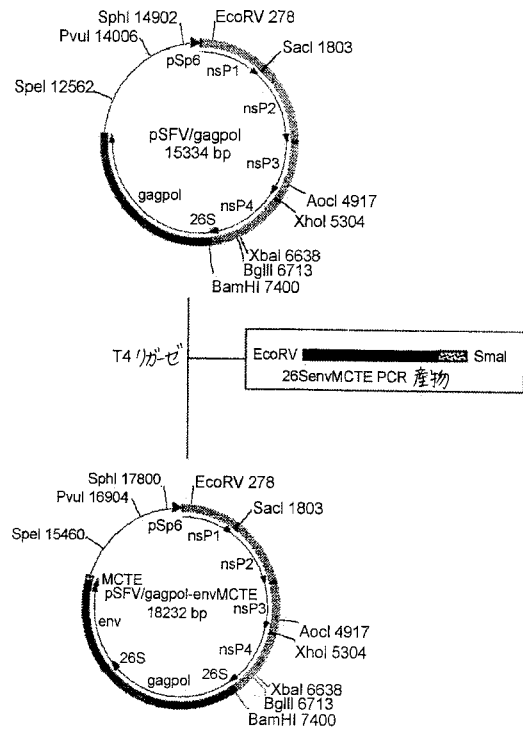
【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



【 図 2 9 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053757 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 15/63, 15/51, 15/06
- (21) International Application Number: PCT/KR02/00031
- (22) International Filing Date: 8 January 2002 (08.01.2002)
- (25) Filing Language: Korean
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 2001/00894 8 January 2001 (08.01.2001) KR
- (71) Applicants and
(72) Inventors: **KIM, Chul-Joong** [KR/KR]; 103-801 Hamweol Apt., Sinsong-dong, Yuseong-gu, 305-345 Daejeon (KR). **KIM, Eun** [KR/KR]; 112-2002 Bodeu Apt., 422-7 Taepyeongsing-dong, Jung-gu, 301-150 Daejeon (KR). **SHIN, Kwang-Soon** [KR/KR]; 402-104 Expo Apt., Jeonmin-dong, Yuseong-gu, 305-762 Daejeon (KR). **KIM, Hyun-Soo** [KR/KR]; 1-308 Jugong Apt., 391 Doryong-dong, Yuseong-gu, 305-340 Daejeon (KR).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.
- (74) Agents: **SON, Min** et al.; 17th floor, City Air Tower 159-9, Samsung-dong, Gangnam-gu, 135-973 Seoul (KR).



WO 02/053757 A1

(54) Title: HIV-LIKE PARTICLES AND THE USE THEREOF

(57) Abstract: Disclosed are alphavirus-based expression vectors expressing env,gag,pro, and/or pol genes of HIV-1, their transcripts, and transformed host cells. The present invention describes the expression of the Gag,Env,Pol and/or Pro Proteins using the above expression vectors, and HIV-like particles(HIVLPs) composed of the above recombinant proteins. The virus-like particles (VLPs) of the present invention, as the mature and infective particles, are very useful as an antigen for a diagnostic kit for HIV infection as well as for vaccine composition for prevention of HIV infection.

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

1

HIV-LIKE PARTICLES AND THE USE THEREOF**TECHNICAL FIELD**

The present invention relates to an expression vector which expresses Gag
5 protein of HIV, an expression vector which expresses Env protein of HIV, an
expression vector which expresses both Gag and Env proteins simultaneously, an
expression vector which expresses Gagpol polyprotein of HIV and an expression
vector which expresses both Gagpol polyprotein and Env protein simultaneously.

BACKGROUND ART

10 Human Immunodeficiency Virus (HIV) is known as the causative agent of
Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Especially, HIV-1 and HIV-2
belongs to the subgroup *Lentiviridae* of retroviruses, which carry a single-stranded
RNA. Once in a susceptible host cell, the RNA genome is reverse-translated by
15 viral reverse transcriptase to generate double-stranded DNA, which becomes
integrated into the host's chromosome, resulting in provirus.

In order to better understand the background of the present invention, with
reference to Fig. 1, there is given the structure of the HIV-1 genome 9.2 kb in size.
The HIV-1 genome possesses structural genes consisting of gag, pol and env, and
20 accessory genes including tat, rev, nef, vif, vpu and vpx.

A HIV Gag polyprotein precursor, Pr55gag, is expressed from full-length
gag-pol RNA with a size of 55 kDa. A HIV Gag precursor is transported to the
inner surface of the cell plasma membrane by a N-terminal myristate moiety, where
directing the assembly of virions. Maturation of virions requires the proteolytic

cleavage of the Pr55gag by protease (Pro) encoded by the pol gene of HIV into matrix (MA, p17), capsid (CA, p24), nucleocapsid (NA, p9) and p6 proteins (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)).

The envelope glycoprotein (Env) precursor, gp160, is expressed from the spliced RNA. In virus-infected cells, the precursor is cleaved by protease from the host or the virus into gp120 subunit at the N-terminal side and gp41 subunit at the C-terminal side, which are properly targeted to a plasma membrane with anchorage on the external surface and insertion into the cell membrane, respectively. In the mature virion, gp120 and gp41 subunits form a heterodimer in which the two subunits are non-covalently associated, which is known to be directly responsible for the infectivity, cellular tropism and cytopathogenicity of HIV (Robey, E. and Axel, R., Cell 60, 697-700 (1990)). Because of the close relation to immunogenicity, the Env protein of HIV is a target for the development of the HIV vaccines.

The protease (Pro) is produced from self-cleavage of Pr160 gag-pol precursor, translated by ribosomal frame shift at 3' end of gag mRNA region while translating gag-pol mRNA (Jacks, T. and Varmus, H. E. Science 230, 1237-1242 (1985); Jacks, T. et al, Nature 331, 280-283 (1988); Sonigo, p. et al, Cell 45, 375-385 (1986)). The protease participates in the processing of the Pr160gag-pol polyprotein and env protein, resulting in mature infectious virions (Kohl, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4686-4690 (1988)).

To date, suggested AIDS vaccines include inactivated vaccines, attenuated vaccines, recombinant live vaccines, virus-like particle vaccines, and subunit vaccines.

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

3

The inactivated whole virus vaccines are prepared by chemically or physically treating isolated viral particles to destroy their infectivity. This kind of vaccine is easy to prepare and is capable of using most epitopes, in contrast, it may cause diseases when the virus is not completely inactivated, on the other hand, the strong treatment for the complete inactivation may cause destruction of many epitopes. Although there are some successful reports on the inactivated SIV vaccines (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)), it is not considered useful as a safe and effective AIDS vaccine because suspicion has been raised that the successful immunization resulted from action by xeno-antigen which the cultivated host cells harbor.

The live attenuated vaccines are prepared by partial deletion in the HIV genome, such as deletion of nef gene or nef and vpr genes (Descrosiers R. C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 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)). However, such vaccines can regain the deleted genes in vaccinated animals, allowing them to be infectious. Accordingly, the live attenuated vaccines may not be completely safe because they can cause AIDS in vaccinated individuals (or animals).

The live recombinant vaccines are vectors in which nonessential genes of non-pathogenic viruses are replaced with genes coding HIV immunogens. There was disclosed an expression of gag, pol or env gene and an expression of an immunogenic region including V3 loop of HIV as a chimeric form in vaccinia virus,

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

4

poxvirus, canarypox virus, avipox virus and poliovirus, or influenza virus (Tartaglia J. et al., *Virology*, 188, 217-232 (1992); Abimiku A. et al., *Nature Med*, 1, 321-329 (1995); Natuk R. J. 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)). As this technology, in general, uses a part of the protein as a vaccine material, it cannot provide an efficient immunogen. In addition, the live recombinant vectors are unstable (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)).

The subunit vaccines are subunits of proteins encoded by HIV, which are naturally isolated or expressed by recombinant DNA technology. These vaccines can be easily manufactured, but they have a different conformation from original proteins existing in viral particles. Recombinant Env glycoproteins, gp120 and gp160, were expressed using mammalian and insect cell expression systems (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)). Upon being injected into chimpanzees, gp120 subunit vaccine expressed in the CHO cells could not confer protection against a viral challenge experiment (Berman, P. W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 5200-5204 (1988)).

Generally, vaccines of viral particle form are more immunogenic and stable than those of subunit form. There was recently developed a new technology in which the non-infectious virus-like particles (VLPs) that do not carry genetic

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

5

materials were used as vaccines. For example, mutation in packaging genes can provide a VLP without an RNA genome, and a VLP containing unprocessed gag protein can be prepared using recombinant baculovirus or vaccinia virus (Gorelink R. J. et al., J Virol 64, 3207-3211 (1990); Gheysen D. E. et al., Cell 59, 103-112(1989)).

5 It was also reported that virus-like particles were produced from the cells co-transfected with two recombinant vaccinia viruses containing gag-pol gene and env gene, respectively (Haffar O. K. et al., Virology, 183, 487-495(1991)). Such pseudo-particles were effective for production of neutralizing antibodies, env-CD4 protecting antibodies, and syncytium inhibition, but they have the drawbacks in their not being
10 mature virus particles and lack of infectivity.

As other forms of virus-like particles containing immunodeterminant of HIV, there were described hybrid particles including poliovirus capsowector, hepatitis B virus (HBV) core particles, HBsAg particles and yeast retrotransposon virus-like particles. But, these hybrid particles contain only the partial region of the
15 immunodeterminant of HIV, resulting in non-effective vaccines (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)).

The inventors of the present invention attempted to develop a novel AIDS
20 vaccine with mature virus-like particles using an alphavirus vector system. The inventors believe the virus-like particles will provide the way to prevent AIDS.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

It is an object of the present invention to provide an expression vector

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

6

expressing Gag protein, an expression vector expressing Env protein of HIV, an expression vector simultaneously expressing Gag and Env proteins of HIV, an expression vector expressing Gagpol polyprotein of HIV, and an expression vector simultaneously expressing Gagpol polyprotein and Env protein of HIV.

5 It is another object of the present invention to provide transformants transformed with the above expression vector.

It is a further object of the present invention to provide HIV-like particles (HIVLPs), a preparation method thereof, and use thereof, in which the above expression vector or its RNA transcript is introduced into animal cells.

10 It is still a further object of the present invention to provide a method of detecting HIV using a mature HIV-like particle and its application in diagnosis of HIV infections.

It is a yet further object of the present invention to provide a vaccine composition comprising the mature HIV-like particles, and also provide an AIDS
15 vaccine composition comprising the expression vector or its RNA transcript.

It is a still further object of the present invention to provide a method of detecting the existence of antibodies specific for HIV antigens in a test sample, comprising the steps of: (a) collecting a test sample which may contain specific antibodies against HIV; (b) reacting the test sample with the mature HIV-like particle
20 prepared according to the method of claim 21 under a condition which allows the antigen-antibody immune complex formation; and (c) detecting antigen-antibody complexes.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

7

Fig. 1 is a brief view showing a genome structure of HIV-1;

Fig. 2 is a restriction map showing structures of expression vectors pSFV and pSFV-helper;

Fig. 3 is a schematic diagram showing a process for construction of an
5 expression vector pSFV/gag;

Fig. 4 is a schematic diagram showing a process for construction of an
expression vector pSFV/gagpro;

Fig. 5 is a photograph showing western blotting of HIV-like particles with an
AIDS patient serum, where the HIV-like particles were produced in BHK-21 cells
10 transfected with pSFV-helper and pSFV/gag, or pSFV-helper and pSFV/gagpro, and
RNA transcript of pSFV/gagpro;

Fig. 6 is a photograph showing western blotting of HIV-like particles with an
AIDS patient serum, where the HIV-like particles were produced in infected BHK-21
cells with in vitro activated HIV-like particles, prepared from BHK-21 cells
15 transfected with pSFV-helper and pSFV/gag, or pSFV-helper and pSFV/gagpro, and
RNA transcript of pSFV/gagpro;

Fig. 7 is a photograph showing a result of immunocytochemistry for Gag
protein in BHK-21 cells transfected with pSFV/gag or pSFV/gagpro vector, staining
with anti-p24 polyclonal antibody;

Fig. 8 is a photograph showing an electro-microscopically observed result for
negative-staining of VLPs, isolated from supernatant from a cultivated medium of
BHK-21 cells transfected with pSFV/gag vector (A) or pSFV/gagpro RNA transcript
20 (B)(X140,000);

Fig. 9 is a schematic diagram showing a process for construction of a

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

8

pSFV/env expression vector;

Fig. 10 is a photograph showing a result of immunocytochemistry for Gag protein in BHK-21 cells transfected with pSFV/env RNA transcript and pSFV-helper RNA transcript, staining with anti-gp160 monoclonal antibody;

5 Fig. 11 is a photograph showing western blotting of cell lysates of BHK-21, infected with in vitro activated defective SFV particles, with an AIDS patient serum, where the defective SFV particles prepared from BHK-21 cells transfected with pSFV/env RNA transcript and pSFV-helper RNA transcript;

10 Fig. 12 is a photograph showing a result of immunocytochemistry for Gag and Env proteins of HIV-1 in BHK-21 cells co-transfected with pSFV/gag and pSFV/env RNA transcript, staining with anti-gp160 monoclonal antibody (B) or with an AIDS patient serum (C);

15 Fig. 13 is a photograph showing agarose gel electrophoresis pattern for RT-PCR and PCR products of RNA genome packaged in VLPs, which produced in BHK-21 cells transfected with pSFV/gag RNA transcript, or with pSFV/gag and pSFV/env RNA transcript;

20 Fig. 14 is a photograph for western blotting showing production of VLPs composed of Gag and Env in infected BHK-21 cells with in vitro activated defective SFV particles, prepared in BHK-21 cells co-transfected with pSFV-helper and pSFV/gag RNA transcript, or with pSFV-helper and pSFV/env RNA transcript;

Fig. 15 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/pro;

Fig. 16 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/env-gag;

Fig. 17 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/env-gag-pro;

Fig. 18 is a photograph showing western blotting of cell lysates or VLPs from BHK-21, transfected with pSFV/env-gag RNA transcript, with AIDS patient serum;

5 Fig. 19 is a photograph for immunocytochemistry of BHK-21 cells transfected with RNA transcript of pSFV/env-gag-pro, showing expression of Gag, Env and Pro proteins;

Fig. 20 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/CTE;

10 Fig. 21 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/gagpro-CTE;

Fig. 22 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/env-gag-gagpro-CTE;

15 Fig. 23 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/env-gag-gagApro-CTE, showing the insertion of gagApro gene, prepared from deletion of a sequence responsible for ribosomal frameshifting at 3' end of gag mRNA region into pSFV/env-gag vector;

Fig. 24 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/gagpol;

20 Fig. 25 is a photograph for immunocytochemistry showing expression of Gag and Gagpol polyproteins in BHK-21 cells transfected with pSFV/gagpol vector, with the use of an anti-p24 polyclonal antibody and an anti-protease polyclonal antibody;

Fig. 26 is a photograph for Western blotting with anti-p24 polyclonal antibody in BHK-21 cells transfected with pSFV/gagpol RNA transcript;

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

10

Fig. 27 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/envMCTE;

Fig. 28 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/gag-envMCTE;

5 Fig. 29 is a schematic diagram showing a process for construction of an expression vector pSFV/gagpol-envMCTE;

Fig. 30 is a photography for immunocytochemistry showing expression of Gag and Env proteins in BHK-21 cells transfected with pSFV/gag-envMCTE vector, with the use of an anti-p24 polyclonal antibody and an anti-protease polyclonal antibody;

10 Fig. 31 is a photography for immunocytochemistry showing expression of Gagpol polyprotein and Env protein in BHK-21 cells transfected with pSFV/gagpol-envMCTE vector, with the use of an anti-p24 polyclonal antibody, an anti-protease polyclonal antibody, and an anti-env monoclonal antibody;

15 Fig. 32 is a photograph for Western blotting in BHK-21 cells transfected with RNA transcripts of pSFV/gag-envMCTE and pSFV/gagpol-envMCTE, with the use of an anti-p24 polyclonal antibody, and an anti-env monoclonal antibody.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

20 The present invention provides alphavirus-based expression vectors expressing structural proteins of HIV. The terms "HIV" used in the present invention includes all kinds of human retrovirus such as HIV-1, HIV-2, HTLV-1 and HTLV-2.

The terms "Alphaviruses" used in the present invention includes virus species

which are categorized into alphavirus and their subtypes in the field of biotechnology and virology such as Estern 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
5 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 and other viruses which have been categorized into
10 alphaviruses by the International Committee on Taxonomy of Viruses.

Alphaviruses, which belong to the *Togaviridae* family, are enveloped positive-strand RNA viruses with a broad range of susceptible cells including insects, birds, and mammalian animals. An alphavirus RNA genome is itself infectious and encodes RNA replicase, allowing alphavirus to be used as an expression vector
15 capable of performing RNA replication and translation (Liljestrom, P. and Graoff, Biotechnology, 9, 1356-1361(1991)).

It is preferable that Alphavirus is selected from "Semliki Forest virus" (SFV) and "Sindbis virus", and most preferable, Alphavirus is selected from Semliki Forest virus (SFV). An SFV-based expression vector, pSFV, provided in an embodiment of
20 the present invention, is prepared from insertion of a SFV cDNA genome into a plasmid harboring SP6 promoter, providing in vitro translation using SP6 polymerase and expression of foreign genes inserted instead of structural genes, under the control of 26S subgenomic promoter.

An in vivo packing system is necessary for introduction of recombinant RNA

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

12

into cells by infection. A pSFV-helper vector contains a RNA replication signal of SFV and genetic information to express structural genes, but it lacks a packaging signal for genomic RNA. Accordingly, when the pSFV vector is co-transfected with the pSFV-helper, there can be viral particles produced which carry only recombinant RNA inside of SFV structure proteins. Upon infecting susceptible cells, the viral particles express recombinant genes, but cannot reconstitute viral particles. With reference to Fig. 2, there is illustrated the structures of pSFV and pSFV-helper vectors used in an embodiment of the present invention. All DNA vectors and their RNA transcripts utilized in the present invention are within the range of the present invention.

In an aspect of the present invention, there are provided alphavirus-based expression vectors carrying gag, gagpro, gagpol and env gene, respectively, an expression vector carrying env-gag genes, an expression vector carrying env-gagpro genes, an expression vector carrying env-gag-gagpro genes, an expression vector carrying env-gag-gag Δ pro genes and an expression vector carrying gagpol-env genes, where each gene of HIV is regulated under the alphavirus subgenomic promoter by separately inserting the genes into the downstream of 26S subgenomic promoter. It is known that expression of Pro synthesis is dependent on the amount of Gag protein (Velissarios K. et al., *Virology*, 193, 661-672(1993); Magdeleine H. et al., *J Virol*, 72, 4819-4824(1998); Joel G. et al., *Virology*, 244, 87-96(1998)). To achieve maximum expression of Pro protein through processing of Gag protein, there were constructed expression vectors characterized in that gag Δ pro gene, in which nucleotides responsible for ribosomal frameshifting are deleted at the junction between gag and pro genes, or gagpro gene was linked to 26S promoter, respectively, in addition that

env gene located at the downstream of gagpol gene was linked to 26S promoter.

The present invention provides an alphavirus-based expression vector in which gag gene of HIV-1 is operably linked to a promoter. As used herein, the term "operably linked" means that the DNA sequences being linked are typically contiguous and in reading frame. In an embodiment of the present invention, a pSFV/gag vector is described (refer to Example 1). The present invention provides an alphavirus-based expression vector in which gagpro gene is operably linked to a promoter. A pSFV/gagpro vector is exemplified in an embodiment of the present invention (refer to Example 1). Also, the present invention provides an alphavirus-based expression vector in which an HIV-1 env gene is operably linked to a promoter. A pSFV/env vector is exemplified in an embodiment of the present invention (refer to Example 4).

The present invention provides an alphavirus-based vector simultaneously expressing HIV-1 env and gag. More preferably, the present invention provides an alphavirus-based expression vector comprising the nucleotide sequence of HIV env, operably linked to a first subgenomic promoter, and the nucleotide sequence of HIV gag, operably linked to the second subgenomic promoter. In an embodiment of the present invention, plasmid pSFV/env-gag is exemplified (refer to Example 9). Also, the present invention provides an alphavirus-based vector comprising the nucleotide sequence of HIV pro, operably linked to a promoter. In an embodiment of the present invention, plasmid pSFV/pro is exemplified (refer to Example 9).

In a further aspect of the present invention, there is provided an alphavirus vector simultaneously expressing env, gag and pro genes of HIV-1. More preferably, the present invention provides an alphavirus-based expression vector comprising env, gag and pro genes were operably linked to a first, second and third subgenomic

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

14

promoter, respectively. The vector pSFV/env-gag-pro is exemplified (refer to Example 9).

The present invention provides an alphavirus vector expressing a gagpro gene of HIV-1 and a gene encoding constitutive transport element (CTE), and more preferably an alphavirus-based expression vector comprising a gagpro gene operably linked to a promoter in addition to a gene encoding CTE. The vector pSFV/pagpro-CTE is exemplified (refer to Example 9).

Also, the present invention provides an alphavirus vector expressing env, gag, gagpro genes of HIV-1 and a gene encoding CTE, and more preferably an alphavirus-based expression vector comprising env, gag and gagpro genes operably linked to a first, second and third subgenomic promoter, respectively, in addition to a gene encoding CTE. The vector pSFV/env-gag-gagpro-CTE is exemplified (refer to Example 12).

The present invention provides an alphavirus vector expressing env, gag, and gag Δ pro genes of HIV-1 and a gene encoding CTE, and more preferably an alphavirus-based expression vector comprising env, gag and gag Δ pro genes operably linked to a first, second and third subgenomic promoter, respectively, in addition to a gene encoding CTE. Herein, it should be noted that the gag Δ pro means a gagpro gene prepared from deletion of nucleotide sequence at the junctional region between gag and pro genes, providing an open reading frame and allowing expression of pro protein without frame-shift translation at 3' end of gag mRNA. Exemplified is pSFV/env-gag-gag Δ pro-CTE vector (refer to Example 13).

The present invention provides an alphavirus vector expressing a full-length gagpro gene of HIV-1, and more preferably an alphavirus-based expression vector

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

15

comprising a full-length gagpro gene operably linked to a downstream of a subgenomic promoter, with an embodiment of pSFV/gagpol vector (refer to Example 14).

The present invention provides an alphavirus vector simultaneously
5 expressing env and gag genes of HIV-1, and more preferably an alphavirus-based expression vector comprising env and gag genes operably linked to a first and second subgenomic promoter, respectively, in addition to a gene encoding MCTE. Exemplified is pSFV/gag-envMCTE vector (refer to Example 16).

The present invention provides an alphavirus vector simultaneously
10 expressing gagpol and env genes of HIV-1, and more preferably an alphavirus-based expression vector comprising gagpol and env genes operably linked to a first and second subgenomic promoter, respectively, in addition to a gene encoding MCTE. Exemplified is pSFV/gagpol-envMCTE vector (refer to Example 16).

The expression vectors of the present invention can be prepared, with some
15 modification, using recombinant DNA technology known in the field to which the present invention belongs.

The present invention provides a method of preparing HIV-1 structural proteins including Gag, Pro and/or Env in the form of precursors or processed subunits with the use of alphavirus-based expression vectors which are described
20 above. The alphavirus-based expression vectors of the present invention can express proteins in a wide range of host cells. In addition, the present invention provides a method of preparing Gag, Pro and/or Env proteins of HIV-1 by expressing the expression vectors or their RNA transcripts in host cells, and more preferably, in animal cells. It is preferable that the animal cells are prepared from birds,

mammalians, reptiles, amphibians, insects and fishes (aquatic animals), and examples of mammalians include humans, monkeys, hamsters, rats (or mice), and pigs. Most preferably, an expression system consisting of a host cell and a vector is BHK-21 cells/pSFV vector or COS cells/pSFV vector, but the expression system of the present invention is not limited to them.

The alphavirus expression vectors and their RNA transcripts can be introduced into animal cells, such as BHK-21 cells, by a conventional transfection method including DEAE dextran mediated transfection, calcium-phosphate coprecipitation, and more preferably, electroporation. In an embodiment of the present invention, RNA transcript of pSFV vector was efficiently transfected into a host cell by electroporation. Also, the above transfection methods can be used for cotransfection.

Expression of foreign genes in animal cells can be maximized by the introduction of infectious viral particles. Regarding this, the present invention provides a method of preparing the above proteins of HIV, comprising an infection of host cells with an infectious viral particle harboring RNA transcripts, which is generated using a helper virus. In Examples 2 and 6, the method is exemplified. HIV-1 proteins, produced by infecting host cells with defective viral particles generated with the use of a helper virus or RNA transcripts of the expression vectors of the present invention, can be isolated using conventional methods, including ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and gel filtration chromatography.

In addition, the present invention provides host cells transiently transformed with RNA transcripts of the expression vectors of the present invention and VLP

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

17

harboring recombinant RNA, and also provides host cells permanently transformed with the expression vectors. The permanently transformed cells can be provided as an animal cell line having a cytomegalovirus (CMV) promoter necessary for integration of cDNA of HIV genome into chromosome of host cells, a gene encoding
5 constitutive transport element (CTE) for reverse transcriptase-independent expression, and an anti-neomycin gene as a selective marker. The CTE gene, more preferably, is a gene encoding MPMV (Mason-Pfizer monkey virus).

The present invention provides a method of preparing an infectious HIVLP using the expression vectors and the host cells described above, and more particularly,
10 a method of preparing a Gag-containing immature HIVLP by introducing an expression vector expressing Gag protein into host cells. When Gag is not processed by protease, mature viral particles are not generated, resulting in immature virus-like particles (VLPs). "Virus-like particle (VLP)" means a virus particle, which is not identical to wild-type (mature) viral particles, but has similar physicochemical
15 properties to wild types. An "Immature virus-like particle (immature VLP)" is a viral particle showing the morphology characteristic of viral particles while it is unable to complete the processing necessary for production of wild virions. "Replicon" means a self-replicating RNA containing indispensable genes for gene replication and is thus capable of being used as an expression vector for expression of
20 foreign genes while virus proliferates by combination to foreign genes.

HIV with only Gag protein is capable of producing immature viral particles without infectivity. Also, it is known that neutralizing antibodies against HIV mainly bind to epitopes located at an envelope (Env) protein that has a variable amino acid sequence. Thus, the Env protein is a main target for development of HIV

vaccines, with growing concerns for the development of a Gag-containing recombinant viral particle carrying Env protein. To obtain such a HIV vaccine, the present invention provides a method of preparing an immature HIVLP composed of Gag and Env proteins by simultaneously expressing the two proteins in host cells, 5 which co-transfected with expression vectors harboring gag and env genes.

On the other hand, the co-transfection method used for the production of HIVLP requires many steps and is not effective. To overcome these problems, the inventors of the present invention used a recombinant plasmid carrying 2 or 3 target genes, offering an economic and effective method in preparing and recovering HIVLP. 10 Accordingly, the present invention provides a method of producing an immature HIVLP composed of Gag and env proteins, supplied by inserting each of gag and env genes into the downstream of each promoter of alphavirus replicon and introducing the resulting replicon vector into host cells.

During an assembly or budding process, or in a viral particle, gag protein is 15 cleaved by protease, and the cleaved subunit proteins assemble, producing mature particles. The HIVLP composed of only gag protein varies greatly in size and morphology from a natural HIVLP. Also, unless a HIVLP composed of Gag and Env undergoes the processing by protease, mature viral particles cannot be produced. To induce an effective immune response, it is important to provide similar 20 immunogens (antigens) to a wild type HIV. Accordingly, production of mature HIVLP is a strong tool for preparation of a HIV vaccine. In the present invention, the inventors developed a method of producing a mature HIVLP through the simultaneous expressions of Gag and Pro proteins, or Gag, Env and Pro proteins. The "mature virus-like particle (mature VLP)" referred to (defined) as the HIVLP that

has structural proteins completely processed by protease (Pro) and shows similar morphology and size to a wild type HIV. In the present invention, it was found that a great deal of mature HIVLP was produced when gagpol and env genes were simultaneously expressed.

5 The HIV-like particle (HIVLP) is considered to be a most preferable form for HIV vaccines or for antigens for diagnosing of HIV infections. However, expression of Gag, Env, and/or protease in each different vector to produce HIVLP is complex and ineffective, in addition that it is very difficult to establish a stable cell line producing HIVLP. In the present invention, there was successfully developed
10 an alphavirus-based expression vector simultaneously expressing Gag, Env and protease at amounts large enough to produce HIVLP, as well as successfully prepared and isolated an infectious HIVLP.

The present invention further provides a method of preparing enough amount of the above expression vectors for induction of immune response, a vaccine
15 composition including RNA transcripts of the expression vectors or the HIVLP, and a method of preventing or treating AIDS comprising administration of the vaccine composition. Preferably, the HIVLP is mature HIVLP, immature HIVLP, infectious HIVLP or noninfectious HIVLP, and most preferably, mature HIVLP. Due to its three dimensional structure, HIVLP, when it used as a vaccine, induces excellent
20 immune response.

The vaccine composition of the present invention can be administered to human in a type suitable to living bodies. The type suitable to living bodies refers to a type of material capable of being administered to living bodies with a higher effect of treatment or prevention than its toxic effect. The materials can be administered to

animals, and more preferably to humans.

The vaccine of the present invention may additionally include a suitable diluent, excipient and/or carrier. The excipient includes a suitable adjuvant capable of improving immunogenicity of the vaccine. The adjuvant can be selected from the
5 group consisting of endotoxin lipid-A of Gram(-) bacteria, trehalos dimycolate of *Mycobacterium* species, phospholipid lysolecitin, dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA), a polyoxypropylene-polyoxyethylene (POP-POE) block copolymer, aluminum hydroxide, and liposome. The carrier may be anything unless there are induced unwanted antibodies in administered individuals. Especially, various
10 suitable carriers or diluents such as saline, buffered saline, and a mixture of saline and non-specific serum albumin may be used for the present invention. The pharmaceutical composition may include a vehicle, a buffer, an anti-oxidant, carbohydrate such as glucose, sucrose or dextrin and a chelating agent such as EDTA, and additionally include water, saline, glycerol, ethanol, an emulsifier, a moistening
15 agent, or a pH adjusting agent.

The vaccine composition may include an adjuvant capable of enhancing immune response. Examples of the adjuvant include aluminum hydroxide (alum), thr-MDP, nor-MDP, and MPT-PE. Also, the vaccine may include cytokine such as GM-CSF, IL-2, IL-12, TNF and IFN, which are known to enhance the immune
20 response.

The dosage of vaccine may be dependent on factors such as health condition, age, sex, body weight and immune response capability of vaccine. Also, the dosage may vary in order to achieve the maximal response. For example, the vaccine may be administrated at a same amount every day, or the dosage may be gradually reduced

in an emergency. The vaccine may be administered subcutaneously, intravenously, intramuscularly, orally, or intradermally as usual. The inhalation or suppository administration can be applied. The booster administration can be given after 4 to 6 weeks.

5 The present invention provides a diagnostic kit for HIV infection and a diagnostic method using thereof. The diagnostic kit comprises the steps of: (a) reacting HIVLP with a biological sample from an animal, especially human; and (b) detecting binding of an antibody in the sample to the HIVLP. Also, there is provided a method of diagnosis of HIV infection using the diagnostic kit. Methods
10 to measure the binding degree between antigen and antibody are well known in the field to which the present invention belongs. ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) is one of the applicable methods. The antigen-antibody binding in the diagnosis can be performed directly or competitively.

From the viewpoints above, the present invention provides a method of
15 detection antibodies specific against HIV antigen in the test sample, comprising the steps of: (a) collecting a test sample suspected to contain antibodies specific against HIV; (b) reacting the test sample with the mature HIV-like particles prepared according to the method described in example 18 under a condition which allows antigen-antibody immune complex to form in the sample; and (c) detecting the
20 antigen-antibody complexes formed in the test sample.

The mature HIV-like particles of the present invention, as an antigen, can be useful for performing immunoassay including ELISA, RIA and other non-enzymatically linked antibody tests, or for detecting retrovirus antigens (e.g. HIV antigen) and anti-retrovirus antibodies (e.g. anti-HIV antibody). The mature HIV-

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

22

like particles, in ELISA, can be attached onto a specific surface, such as a well of polystyrene microtitration plates, where proteins can bind. The plates are washed to remove the unbound mature HIV-like particles. After removing incompletely attached mature HIV-like particles by washing, the plate is blocked with a non-specific protein such as bovine serum albumin (BSA) or casein, reducing non-specific binding of the mature HIVLP to the surface.

Thereafter, clinical or biological samples may be applied on the fixed surface, allowing immune complex (antigen-antibody complex) formation. Herein, the sample may be diluted with a diluent such as BSA, bovine gammaglobulin (BGG), or a phosphate buffered solution (PBS)/Tween solution, followed by incubation at 25°C and subsequently at 37°C for 2 to 4 hours. Non-immune complexes are then removed from the surface by washing. The washing can be performed by PBS/Tween or boric acid buffered solutions.

After washing, a qualitative or qualitative test could be performed by adding a specific secondary antibody to a first antibody, which formed an immune complex with the mature HIVLP. In the case that the sample comes from humans, a secondary antibody is specific against mainly IgG among human immunoglobulins. To easily detect the immune complex, a secondary antibody is conjugated with an enzyme capable of using a chromogenic substrate, thus allowing qualitative analysis using a spectrophotometer.

To identify multiple antibodies reacting with multiple HIV isolates, multiple HIV-like particles, immunologically different, could be attached to a specific surface. To detect an anti-HIV antibody recognizing a conserved epitope among HIV isolates, one or a limited number of mature HIVLP could be attached. To identify antibodies

reacting with one HIV isolate (e.g. LA1, MN, SF2 or HXB2), one mature HIVLP specific to the HIV isolate of the present invention could be attached. This additional diagnostic system can be applied for detection of a specific HIV isolate in clinical tests and medical or medical law fields.

5 In addition, another diagnostic method could be necessary to identify immunologically different HIV isolates, which belong to different classification. Examples of the immunologically different HIV isolates include LA1, MN, SF2, HXB2 and primary HIV-1 isolates. In an aspect of this diagnostic method, the mature HIVLP of the present invention could be useful for production of antibodies
10 including monoclonal antibodies capable of specifically recognizing the immunologically different HIV isolates. It is possible that the mature HIVLP of the present invention, which is immunologically different, may be used as a vaccine and a diagnostic immunogen. A mixture combining mature HIVLPs could be provided for protection and/or diagnosis of mixed-isolates. In this case, the mixture of
15 immunogens may be called a "cocktail".

A composition having immunogenic properties of the present invention, in the non-mixed or cocktail form, can be used for detecting HIV antigen(s) in a sample including a biological sample, or for producing a HIV-specific antibody (including monoclonal antibody) to neutralize HIV.

20 In a further diagnostic application, the mature HIVLP of the present invention can be used for stimulating HIV-specific T-cells in biological samples obtained from HIV-infected patients with an aim for diagnosis and therapy.

The present invention will be explained in more detail with reference to the following examples in conjunction with the accompanying drawings. However, the

following examples are provided only to illustrate the present invention, and the present invention is not limited to them.

EXAMPLE 1 : Construction of expression vectors, pSFV/gag and pSFV/gagpro

5 Gag protein of HIV and its proteolytic cleavage products are the major structural components of the virion, and Gag itself is sufficient to direct assembly and release of virus-like particles without any other viral proteins. Gag protein is cleaved by viral protease (PR) encoded by pol gene, generating matrix (MA, p17), capsid (CA, p24), nucleocapsid (NA, p9), and p6, which are assembled to produce
10 mature viral particles (Gheysen D. et al, Cell, 59, 103-112 (1989)). Therefore, in this study, there was constructed an expression vector capable of expressing Gag by inserting a gag gene into a replicon, as follows. To amplify full-length a gag gene, PCR was performed with a primer set consisting of primers 1 and 2, below, using HIV clade E genome (Genbank accession No. U51188, Journal of Virology, 1996),
15 containing full-length gag gene(832 to 2328 bp), as a template. Also, to amplify a pro gene in addition to a gag gene, PCR was performed with primers 1 and 3, below, using HIV clade E genome, containing a gag gene, frame shift site and a pro gene(832 to 2577 bp), as a template. In the two cases, a PCR mixture was prepared as follows: plasmid pUHD (100ng/ μ l) carrying full-length HIV-1 clade E genome, used as the
20 template, was mixed with 4 μ l of 2.5mM dNTP (Boehringer Mannheim(BM), Germany), 1 μ l of sense primer (100pmol/ μ l), 1 μ l of antisense primer (100pmol/ μ l), 5 μ l of 10XTaq polymerase buffer, 37 μ l distilled water. The PCR mixture was pre-incubated at 98°C for 5 min, and then supplemented with 1 μ l of Taq polymerase, followed by a PCR reaction of 30 cycles in which each cycle was composed of 1 min

at 94°C, 2 min at 55°C, and 3 min at 72°C. The amplified products for HIV-1 gag and gagpro were cloned into BamHI site of pSFV vector, respectively, giving recombinant vectors, pSFV/gag (refer to Fig. 3) and pSFV/gagpro (refer to Fig. 4).

Primer 1: Sense (SEQ ID NO.: 1)

5'-GCGGATCCCGGATGGGTGCGAGAGCGTCAATATTAAGT-3'

Primer 2: Antisense (SEQ ID NO.: 2)

5'-CGCGGATCCCTGTTACTGTGACAAGGGGTCGTTGCCAAA-3

Primer 3: antisense (SEQ ID NO.: 3)

5'-CGCGGATCCCTGCAGTTAAAGTACAACCAATCTGAGTCAACA-3'

10

EXAMPLE 2 : Production of VLP using pSFV-helper and pSFV/gag, or pSFV-helper and pSFV/gagpro

Protease (Pro) of HIV-1 was activated during or after the budding of virion, and was involved in the processing of structural polyproteins including Gag and Gagpol precursors. In this example, the recombinant vectors prepared in Example 1, pSFV/gag and pSFV/gagpro, were expressed with pSFV-helper in host cells.

pSFV/gag and pSFV/gagpro vectors were completely linearized with the use of a restriction enzyme PvuI, and purified by phenol/chloroform extraction. A reaction mixture was prepared from 10 μ l of the plasmid 10 μ l of DNA, 5 μ l of 10 \times SP6 buffer (TaKaRa), 2.5 μ l of 100mM DTT, 5 μ l of rNTP mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM UTP, 5 mM GTP, BM), 2 μ l of Rnasin(BM), 1.5 μ l of SP6 RNA polymerase (TaKaRa) and 19 μ l distilled water, and then incubated at 37°C for 1 hour 30 min. Transfection was then performed by electroporation, as follows: with 25 μ l (1 μ g) of pSFV-helper RNA transcripts, 50 μ l of the resulting RNA transcript

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

26

of gag or gagpro gene was added to 800 μ l of BHK-21 cells (10^7 cells/ml) suspended in PBS (phosphate buffered saline, 1.37 mM Sodium Chloride, 0.02mM Potassium Chloride, 0.1mM Phosphate buffer/ml), and electroporation was then carried out at room temperature in a 0.4 cm electroporation cuvette using a Bio-Rad Gene Pulser, with two pulses of 830 V/25 μ F. 48 hours after trasfection, the cultivated medium was centrifuged at 3500 rpm for 15 min and the obtained supernatant was then ultra-centrifuged for 2 hr at 30,000 rpm at 4 $^{\circ}$ C using a Beckman SW41 rotor, giving a pellet containing viral particles. The pellet was resuspended in TNE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) and stored at -70 $^{\circ}$ C. The defective VLPs contained in the pellet were eletrophoresed by a SDS-polyacrylamide gel, and were analyzed by Western blotting using serum from AIDS patients (refer to Fig. 5, lane M: negative control; lane 1: VLP produced from pSFV-helper and pSFV/lacZ; lane 2: VLP produced from pSFV-helper and pSFV/gag; lane 3: VLP produced from pSFV-helper and pSFV/gagpro). In lane 2 of figure 5, Gag protein was detected. This indicates that Gag protein was expressed in BHK-21 cells transfected with pSFV/gag RNA transcripts, and HIVLPs composed of Gag protein were released into culture medium with SFVLP. It was revealed that pSFV/gagpro, prepared for expressing Pro protein as well as Gag protein produced less Gag protein than pSFV/gag (refer to lane 3 of Fig. 5). BHK-21 cells were infected with the produced viral particles, as follows: to activate defective VLPs, 100 μ l of suspension of defective VLPs in TNE buffer was incubated with 5 μ l of chymotrypsin (10 mg/ml), 5 μ l of 50 mM CaCl₂ for 30 min on ice, and 45 μ l of Aprotinin (2 mg/ml, Sigma, USA) was then added to terminate the protease activity. The activated VLPs were added to monolayerd BHK-21 cells with 70% confluency and then incubated for 90

min at 37°C under 5% CO₂, allowing for infection of BHK-21 with the VLPs. Culture medium was then aspirated, and a new medium was refed and incubation was preceded for 48 hours. The BHK-21 cells were lysed with 200 μ l of a lysis buffer (1% NL40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 μ g/ml PMSF), and centrifuged at 12000 rpm for 5 min at 4°C. The supernatant was mixed with a sample buffer and then boiled for 5 min. The denatured samples were separated by SDS-PAGE (12%). The separated proteins were transferred onto a PVDF membrane (BM) for 2 hrs under a condition of 15 V and 7 mA, and Western blotting was performed using specific antibodies, where serum from AIDS patients was used as a first antibody and biontynylated anti-human IgG as a second antibody. The membrane was then reacted with an avidin-biotin solution and the color was developed with DAB solution (refer to Fig. 6, lane 1: BHK-21 cells infected with VLP from pSFV/gag; lane 2: BHK-21 cells infected with VLP from pSFV/gagpro). As a result of reinfection, the band of 55 kDa presented that Gag proteins were produced in cytoplasm of BHK-21 cells. Therefore, these results suggest that VLP obtained from pSFV/gag or pSFV/gagpro contains a gag gene and is infectious.

Example 3 : Production of VLP using pSFV/gag or pSFV/gagpro expression vectors

VLPs prepared in Example 2 are a mixture of VLP composed of a core of SFV (SFVLPgag or SFVLPgagpro) and VLP composed of a core of HIV-1 (HIVLPgag or SFVLPgagpro). To obtain only VLPs composed of a core of HIV-1, pSFV/gag and pSFV/gagpro prepared in Example 1 were transcribed in vitro and transfected into BHK-21 cells without pSFV-helper RNA transcripts according to the method of the above Example 2. The transfected cells were fixed with cold absolute

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

28

methanol, cooled at -20°C , for 4 to 6 min, blocked with 1% gelatine, and immunostained with a anti-p24 (capsid) polyclonal antibody (anti-rabbit) and then a secondary antibody, biontylated anti-rabbit IgG. As a result, it was found that that Gag protein was expressed in the transfected BHK-21 cells (refer to Fig. 7, A: negative control, BHK-21 cells not transfected; B: BHK-21 cells transfected with pSFV/gag; C: BHK-21 cells transfected with pSFV/gagpro). Gag proteins were detected in the cytoplasm, and VLPs were isolated from supernatant from the cultivated medium by using the method from Example 2, and observed under an electron microscope (Fig. 8, A: VLPs from pSFV/gag; B: VLPs from pSFV/gagpro). It was found that VLP (HIVLPgag) composed of only Gag proteins was produced even when pSFV/gag or pSFV/gagpro RNA transcripts were expressed without pSFV-helper RNA transcripts.

EXAMPLE 4 : Construction of pSFV/env expression vector

To amplify a gp160 gene of HIV, PCR was performed with a primer set consisting of primers 4 and 5, below, using HIV clade E genome (Genbank accession No. U51188, Journal of Virology, 1996), containing a gp 160 gene between 6264 to 8879 bp, as a template.

Primer 4: sense (SEQ ID NO.: 4)

5'-CGCGCCTCGAGCGGGATCCCATGAGAGTGAAGGGGACACGGA-3'

Primer 5: antisense (SEQ ID NO.: 5)

5'-AATGGATCCTATAGCAAAGCCCTTCCAAGCCC-3'

A PCR mixture was prepared as follows: plasmid pUHD (100 ng/ μl) carrying full-length HIV-1 clade E genome, used as the template, was mixed with 4 μl of 2.5mM dNTP (BM, Germany), 1 μl of sense primer (100 pmol/ μl), 1 μl of

antisense primer (100 pmol/ μl), 5 μl of *Taq* polymerase 10X buffer, and 37 μl distilled water. The PCR mixture was pre-incubated at 98°C for 5 min, and then supplemented with 1 μl of *Taq* polymerase, followed by a PCR reaction of 30 cycles in which each cycle was composed of 1 min at 94°C, 2 min at 55°C, and 3 min at 5 72°C. The amplified product for gp160 gene was cloned into BamH I site of pSFV vector, giving a recombinant vector, pSFV/env (refer to Fig. 9).

EXAMPLE 5 : Production of VLP using pSFV-helper and pSFV/env expression vectors

10 Because only Env of HIV-1 cannot produce VLP, VLP was prepared from pSFV-helper and pSFV/env. The vector pSFV/env prepared in Example 4 was completely linearized with Sph I and purified by phenol/chloroform extraction. To obtain RNA transcripts of an env gene, a reaction mixture was prepared from 10 μl of the linearized plasmid DNA, 5 μl of 10 \times SP6 buffer (TaKaRa), 5 μl of 10 mM 15 m7G(5')ppp(5')G(BM), 2.5 μl of 100 mM DTT, 5 μl of rNTP mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM UTP, 5 mM GTP, BM), 2 μl of Rnasin (BM), 1.5 μl of SP6 RNA polymerase (TaKaRa), and 19 μl distilled water, and incubated at 37°C for 1 hour 30 min. Transfection was then performed according to the same electroporation as Example 2, with the exception of the use of 50 μl of pSFV/env RNA transcripts 20 and 25 μl of pSFV/helper RNA transcripts as RNA transcripts. 48 hours after transfection, the cultivated medium was centrifuged at 3500rpm for 15 min and the supernatant was then ultra-centrifuged(2 hr, 30,000 rpm, 4°C) using a Beckman SW41 rotor, giving a pellet containing viral particles. The pellet was resuspended in TNE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) and stored at -

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

30

70°C. Also, the transfected cells were fixed with cold absolute methanol, cooled at -20°C, for 4 to 6 min, blocked with 1% gelatine, and immunostained with an anti-gp160 monoclonal antibody (1 mg/ml) and secondarily with biontnylated anti-mouse IgG (5 μ l/ml). The infected cells were then incubated with an AB solution (5 μ l

5 avidin, 5 μ lbiotin /1ml PBS, VECTOR) for 30 min and color was developed with a DAB (3,3'-diaminobezidine) solution (VECTOR) (refer to Fig. 10, A: a negative control, non-transfected BHK cells; B: BHK cells transfected with pSFV/env vector). As a result, it was found that Env protein was expressed in the transfected BHK-21 cells with pSFV/env vector.

10 To activate VLPs, 100 μ l of suspension of viral particles in TNE buffer was incubated with 5 μ l of chymotrypsin (10 mg/ml), 5 μ l of 50mM CaCl₂ for 30 min on ice, and 45 μ l of Aprotinin (2 mg/ml, Sigma, USA) was then added to terminate the protease activity. The activated VLPs were added to monolayerd BHK-21 cells with 70% confluency and then incubated for 90 min at 37°C under 5% CO₂, allowing

15 for infection of BHK-21 with the VLPs. Culture medium was then aspirated, and a new medium was refed and incubation was preceded for 48 hours. After incubation, BHK-21 cells were lysed with 200 μ l of a lysis buffer (1% NL40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 μ g/ml PMSF), and centrifuged(12000 rpm, 5 min, 4°C). The supernatant was mixed with a sample buffer and then boiled for 5 min.

20 The denatured samples were separated by SDS-PAGE (12%). The separated proteins were transferred onto a PVDF membrane (BM) for 2 hrs under a condition of 15 V and 7 mA, and Western blotting was performed using specific antibodies, where serum from AIDS patients was used as a first antibody and biontinylated anti-human IgG as a second antibody. The membrane was then reacted with an avidin-biotin

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

31

solution and the color was developed with DAB solution (refer to Fig. 11, lane 1: a negative control, BHK-21 cells; lane 2: BHK-21 cells transfected with VLP). As a result that BHK-21 cells were infected with in vitro activated VLPs, it was found that Env proteins were produced in cytoplasm of BHK-21 cells, demonstrating production
5 of infectious SFVLPenv.

EXAMPLE 6 : Production of VLP using pSFV/gag and pSFV/env expression vectors

It is well known that Gag protein of HIV directs assembly of immature VLP and Env protein of HIV is a major target for development of neutralizing antibodies
10 (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)). Therefore, in order to incorporate Env protein into viral particles composed of Gag protein, RNA transcripts of pSFV/gag prepared in Example 1 and pSFV/env prepared in Example 4 were co-transfected into susceptible host cells. The expression vectors, pSFV/gag and
15 pSFV/env, were transcribed in vitro according to the same method as Example 2 (without pSFV-helper), and co-transfected into BHK-21 cells. At 48 hr after transfection, the transfected cells were immunostained with AIDS patient serum and an anti-gp160 monoclonal antibody capable of recognizing Env protein. The sample immunostained with the AIDS patient serum (refer to C of Fig. 12) showed much
20 more staining than that with the anti-gp160 antibody (refer to B of Fig. 12). This result indicates that there was produced HIVLP composed of Gag and Env proteins of HIV-1(Fig 12 A: negative control; B: anti-gp160 monoclonal antibody; C: AIDS patient serum).

Example 7 : Analysis of HIV-like particle-associated nucleic acids

We investigated whether VLPs prepared in Examples 3 and 6, through transfection with only pSFV/gag RNA transcripts, or co-transfection with both pSFV/gag and pSFV/env RNA transcripts, respectively, carry nucleic acid or not.

5 The VLPs were passed through a 10% sucrose cushion. Other RNA and DNA contamination was eliminated by a digestion with 1 mg RNase A and 70 Unit of RNase-free DNase I at room temperature for 1 hr in a Mg2SO4-acetate buffer. RNA was purified with a viral RNA purification kit (Viogene), and PCR was then carried out using the purified RNA, where there was amplified a mRNA fragment of 650bp

10 in size as a product for gag, especially p24, and a mRNA fragment of 350bp as a product for env. For RT-PCR of the purified RNA, the RNA was mixed with 4 μ l of 5 Superscript II reverse transcriptase buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.5, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 μ l of 0.1 M DTT and 4 μ l of deoxynucleoside triphosphates (dNTP; 25 mM each; TaKaRa) and a primer, and distilled water up to 20 μ l. The

15 mixture was incubated for 2 min at 42 °C, and supplemented with 1 μ l of superscript II reverse transtriptase (from pol gene of Molony Murine Leukemia virus (Gibco BRL)), followed by incubation for 50 min at 42 °C to give first DNA strands in the form of a RNA/DNA hybrid. Herein, there were used 1 μ l of Primer 6 of 100 pmol for gag RNA, 1 μ l of Primer 7 of 100 pmol for env RNA.

20 Primer 6: antisense (SEQ ID NO.: 6)

5'-CCCAAGCTTTIAGCATGCTGTCATCATTTC-3

Primer 7: antisense (SEQ ID NO.: 7)

5'-GGTCTGCAGAAGCTTCCTTGITATTCAAACCA-3

The RNA/DNA hybrids were denatured and the reverse transtriptase was

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

33

inactivated by incubation for 15 min at 70°C. DNA amplification was done with Z tag DNA polymerase (TaKaRa) and a primer set (Primer 8 and Primer 6 for gag RNA detection; Primer 9 and Primer 7 for env RNA detection) using cDNA made from the above RT-PCR as a template. Herein, 10 µl of the template cDNA was mixed with

5 4 µl of 2.5mM dNTP (BM, Germany), 1 µl of sense primer (100 pmol/µl), 1 µl of antisense primer (100 pmol/µl), 5 µl of 10X Z Taq polymerase buffer, 28 µl of distille waster and 1 µl of Z Taq polymerase (TaKaRa). The PCR mixture was pre-incubated for 5 min at 94°C for denaturation, and then PCR was performed with 35 cycles where each cycle consisted of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1 min 72°C,

10 followed by incubation of 7 min at 72°C.

Primer 8: sense (SEQ ID NO.: 8)

5'-CCCAAGCTTCATCAGGCCTTATCACCT-3

Primer 9: sense (SEQ ID NO.: 9)

5'-TCCCCGGGAAGCTTGCGCAGCAGCATCTGTTG-3

15 The amplified products were applied to an agarose gel and visualized under UV illumination after ethidium bromide staining. It was found that a p24 gene was amplified at HIVLP gained after transfection of only pSFV/gag RNA transcripts as well as HIVLP gained after co-transfection of both pSFV/gag and pSFV/env RNA transcripts (refer to lanes 1 and 2 in Fig. 13). In contrast, amplication of the gp41

20 gene was not detected at all in the two VLPs (refer to lanes 1 and 3 in Fig. 13). This result suggests that only RNA corresponding to the gag gene was packaged into VLPs (refer to Fig. 13, lane 1: VLP from pSFV/gag; lanes 2 and 3: VLP from co-transfection of pSFV/gag and pSFV/env; lanes 1 and 2 were amplified with the use of primers for p24, lane 3 was amplified by the use of primers for gp41; a 650 bp

fragment is a PCR product for gag gene and a 350 bp fragment for the env gene).

EXAMPLE 8 : Production of VLP by infection of defective SFVLP

We investigated whether or not VLPs were produced when VLPs obtained
5 from Examples 2 and 5 were in vitro activated and infected COS-1 cells. After cell
lysate and VLPs were obtained from the supernatant of a cultivated medium, prepared
from the infected COS-1 cell with VLP from Example 2 or 5, they were analysed by
western-blot with AIDS patient serum, anti-p24 polyclonal antibody (anti-rabbit) and
anti-p24 monoclonal antibody (refer to Fig. 14, A: AIDS patient serum; B: anti-p24
10 polyclonal antibody; C: anti-p24 monoclonal antibody; a negative control (lanes 1, 4,
7, 10, and 13); infection with SFVLPgag (lanes 2, 5, 8, 11, and 14); co-infection with
SFVLPgag and SFVLPenv (lanes 3, 6, 9, 12, and 15); cell lysate (lanes 1, 2, 3, 7, 8, 9,
10, 11, and 12); VLP (lanes 4, 5, 6, 13, 14, and 15)).

As shown in A and B in Fig. 14, when COS-1 cells infected with the
15 defective SFVLP containing the gag gene, Gag protein was detected in the cytoplasm
of COS-1 cells (lanes 2, and 8) and VLPs from supernatant. In addition, both Gag
and Env proteins were detected in the cytoplasm of COS-1 cells (lanes 3, and 9) and
VLPs from supernatant (lane 6) when COS-1 cells co-infected with SFV replicon
containing both each gag and env genes. Accordingly, it was confirmed that, when
20 Gag and Env proteins were simultaneously expressed in a cell, VLPs composed of the
two proteins were produced. As shown in C of Fig. 14, upon Western blotting with an
anti-p24 monoclonal antibody (Biogenesis, Cat. No. 4999-8607), there was detected a
Gag precursor Pr55 and p24 proteins. This explains that a Gag precursor could be
processed or denatured in COS-1 cells without protease of HIV-1.

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

35

EXAMPLE 9 : Construction of expression vectors, pSFV/env-gag and pSFV/env-gag-pro

To obtain a pro gene (from 2268 to 2606 bp in HIV-1 clade E genome) containing a 26S subgenomic promoter, PCR was performed with a mixture consisting of, pUHD (100 ng/ μ l) containing whole HIV-1 Clade E genome, 4 μ l of 2.5 mM dNTP (BM, Germany), 1 μ l of sense primer (100 pmol/ μ l), 1 μ l of antisense primer (100 pmol/ μ l), 5 μ l of 10X *Taq* polymerase buffer, 37 μ l distilled water, and 1 μ l of *Taq* polymerase, and a thermal cycle of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1 min 72°C was repeated 40 times.

10 Primer 10: sense (SEQ ID NO.: 10)

5'-CCAAGATCTATGACAGCCTCCTCCTTTAGTTTC-3'

Primer 11: antisense (SEQ ID NO.: 11)

5'-CAACCCGGGTCGCGATTAAGTGCAATAGGACTAAT-3'

The amplified product of the pro gene was cloned into a *Sma*I site of a muticloning site of pSFV using *Eco*RV and a *Sma*I recognition sequence in both ends of the primers, generating pSFV/pro vector (refer to Fig. 15). To construct pSFV/env-gag vector, a 26S *gag* gene was primarily amplified using the vector pSFV/*gag* prepared in Example 1 as a template, in the presence of Primer 12 (sense) for 26S subgenomic promoter and Primer 2 (antisense) for a *gag* gene. The amplified 26S *gag* gene was then inserted into the *Sma*I site of the vector pSFV/env (refer to Fig. 16).

Primer 12: sense (SEQ ID NO.: 12)

5'-CCGGAIATCACCTCTACGGCGGCCTA-3'

Primer 13: antisense (SEQ ID NO.: 13)

5'-CGCCCGGGTTACTGTGACAAGGGGTCGTTGCCAAA-3'

Using the pSFV/pro vector as a template, a 26S pro gene was amplified with a primer set of Primer 12 (sense) for a 26S subgenomic promoter and Primer 11 (antisense) for pro gene, and the amplified product was then inserted into the SmaI site of a pSFV/env-gag vector, giving a pSFV/env-gag-pro vector (refer to Fig. 17). Herein, the nucleotide sequence of the amplified pro gene is in part deleted at N-terminus and gained at C-terminus, in comparison with a pro gene of gagpro in Example 1. Thus obtained sequence for a pro gene contains a nucleotide sequence necessary for self-processing (Viviane V. et al., J. Gen. Virol. 73, 639-651 (1992)). The vector pSFV/env-gag-pro was deposited with Korean Culture Center of Microorganisms(KCCM), one of international depository authorities, on Dec. 2000, as Accession NO. KCCM-10233, under the Budapest Treaty on the international Recognition of the Deposit of Microorganisms for the purpose of Patent Procedure.

15 EXAMPLE 10 : Production of VLP through expression of pSFV/env-gag vector

To produce gag-containing VLPs into which Env protein is incorporated, the Gag and Env protein genes were cloned into a Semliki Forest Virus (SFV) replicon in the same plasmid with separate subgenomic promoters, as described in Example 9. RNA transcripts of the resulting pSFV/env-gag vector of Example 9 were transfected into BHK-21 cells. At 48 hr after trasfection, the transfected cell lysates and VLPs obtained from the supernatant were analyzed by Western blot with AIDS patient serum, followed by ECL (enhanced chemiluminescence) assay (refer to Fig. 18, lane 1: negative control; lanes 2, and 3: cell lysate; lanes 4, and 5: cell supernatant). As a result, both Gag and Env proteins were detected in VLPs, demonstrating env and gag

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

37

genes cloned on the same plasmid, in which the expression of the two genes were separately controlled under different subgenomic promoters, were simultaneously expressed in the same cell, allowing production of VLP by the interaction of the two proteins. In Fig. 18, in the supernatant of a cultivated medium, band for Gag protein was shown in a slightly smaller size than in cell lysate because of being pushed by a high content of albumin of 65 kDa.

EXAMPLE 11 : Production of VLP through expression of pSFV/env-gag-pro vector

The pSFV/env-gag-pro vector prepared in Example 9 was transfected into host cells and expression levels for the three genes were examined. RNA transcripts of pSFV/env-gag-pro were transfected into BHK-21 cells. At 48 hr after trasfection, the transfected cells were immunostained with AIDS patient serum, anti-gp160 monoclonal antibody, anti-p24 polyclonal antibody, and anti-protease polyclonal antibody (anti-sheep) (refer to Fig. 19, A: a negative control; B: AIDS patient serum; C: anti-gp160 monoclonal antibody; D: anti-p24 polyclonal antibody; E: anti-protease polyclonal antibody). As a result, Gag, Env, and Pro proteins were all detected. Accordingly, it indicates that Gag, Env, and Pro were separately expressed under different 26S subgenomic promoters, demonstrating that there can be expressed each of three foreign genes, separately linked to a subgenomic promoter of an alphavirus-based expression vector

EXAMPLE 12 : Construction of pSFV/env-gag-gagpro-CTE expression vector

To primarily make a pSFV/CTE vector, PCR was performed with Primers 14 and 15 using pGEM 7fz(-)/MPMV plasmid DNA as a template. The amplified CTE

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

38

gene was inserted into a region between a BamHI site and a SmaI site of pSFV (refer to Fig. 20). A Gagpro gene excised from pSFV/gagpro, prepared in Example 1 by digestion with BamHI, was cloned into a BamHI site of the vector pSFV/CTE, giving pSFV/gagpro-CTE (refer to Fig. 21). A CTE gene from Maston-Pfizer monkey virus was then inserted behind a pSFV/gagpro, generating pSFV/gagpro-CTE vector.

To finally construct pSFV/env-gag-gagpro-CTE, using the vector pSFV/gagpro-CTE as a template, a full-length gagpro gene containing 26S subgenomic promoter and a CTE gene were amplified by PCR with primers 12 and 15. The resulting product was inserted into a SmaI site of the vector pSFV/env-gag of Example 9 (refer to Fig. 22). A PCR mixture was prepared as follows: 1 μ l of pSFV/gagpro-CTE was mixed with 4 μ l of 2.5 mM dNTP (BM, Germany), 1 μ l of sense primer (100 pmol/ μ l), 1 μ l of antisense primer (100 pmol/ μ l), 5 μ l of 10X *Taq* polymerase buffer and 37 μ l distilled water. The PCR mixture was pre-incubated at 98°C for 5 min, and then supplemented with 1 μ l of *Taq* polymerase, followed by PCR reaction of 40 cycles in which each cycle consisted of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 2 min at 72°C. The vector pSFV/env-gag-gagpro-CTE was deposited with Korean Culture Center of Microorganisms(KCCM), one of international depository authorities, on Dec. 2000, as Accession No. KCCM-10234, under the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure.

Primer 14 sense (SEQ ID NO.: 14)

5'-AATGGATCCCCTCCCCTGTGAGCTAGACT-3'

Primer 15 antisense (SEQ ID NO.: 15)

5'-AATGATATCAGATCTCCAAGACATCATCCGGCAA-3'

EXAMPLE 13 : Construction of pSFV/env-gag-gagΔpro-CTE expression vector

gagΔpro was prepared from deletion of conserved five Ts at a signal for ribosomal frame shift from a gagpro sequence, as follows. Using the vector pSFV/gag of Example 1 as a template, amplified was a portion containing 26S subgenomic promoter and gag gene (832-2113), located upstream of site, with the use of Primer 12 and Primer 16, below. Herein, a PCR mixture was prepared as follows: 1 μl of pSFV/gag was mixed with 4 μl of 2.5mM dNTP (BM, Germany), 1 μl of sense primer (100pmol/μl), 1 μl of antisense primer (100 pmol/μl), 5 μl of 10X *Taq* polymerase buffer and 37 μl distilled water. The PCR mixture was pre-
10 incubated at 98°C for 5 min, and then supplemented with 1 μl of *Taq* polymerase, followed by a PCR reaction of 40 cycles in which each cycle consisted of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1 min at 72°C. The amplified product was inserted into pGEMT vector (Promega). Also, a full-length pro gene, with the exception of the conserved sequence of a signal for frameshifting, was amplified using the vector
15 pSFV/gagpro-CTE of Example 12 as a template with a primer set of Primer 15 and 17, and then inserted into pGEMT vector, according to the same procedure described above.

Primer 16 antisense (SEQ ID NO.: 16)

5'-AATAGGCCTGTCITTCAGTGCAGTCTT-3'

20 Primer 17 sense (SEQ ID NO.: 17)

5'-CACAGGCCTATAGGAAAATCTGGCCTTC-3'

The two obtained genes were digested with restriction enzyme *StuI* and ligated, generating gagΔpro. In this step, Asn (Asparagine) was substituted with Tyr (Tyrosine), and two Phe(Phenylalanine) deleted with the deletion of conserved five Ts.

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

40

gag Δ pro was then digested with EcoRV and inserted into a SmaI site of the vector pSFV/env-gag, giving pSFV/env-gag-gag Δ pro-CTE vector (refer to Fig. 23).

(SEQ ID NO.: 18) F F R E

CAG GCT AATTT TTT AGG GAA Ribosomal frame shift site of gag-pol
5 mRNA

Q A N

(SEQ ID NO.: 19)

CAG GCC TAT AGG GAA Mutation site of Gag Δ pro

Q A Y R E

10

EXAMPLE 14 : Construction of pSFV/gagpol expression vector

To prepare an expression vector expressing a Gagpol polyprotein, a gagpol gene of HIV-1 was inserted into an alphavirus replicon. A full-length gagpol gene (832-5132bp) of HIV-1 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with
15 Primers 18 and 19 using HIV-1 Clade E genome as a template. A PCR mixture was prepared as follows: plasmid pUHD (100ng/ μ l) carrying full-length HIV-1 clade E genome, used as the template, was mixed with 4 μ l of 2.5mM dNTP (BM, Germany), 1 μ l of sense primer (100pmol/ μ l), 1 μ l of antisense primer (100pmol/ μ l), 5 μ l of 10X *Taq* polymerase buffer and 37 μ l distilled water. The
20 PCR mixture was pre-incubated at 98°C for 5 min, and then supplemented with 1 μ l of *Taq* polymerase, followed by a PCR reaction of 40 cycles in which each cycle consisted of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 3 min at 72°C.

Primer 18: sense (SEQ ID NO.: 20)

5'-TTAGGATCCATGGGTGCGAGAGCGTCA-3'

Primer 19: antisense (SEQ ID NO.: 21)

5'-CGCGGATCCCTAATCCTCATTCTGTCTACC-3'

The amplified product was inserted into a BamHI site of pSFV vector, giving a pSFV/gagpol vector (refer to Fig. 24).

5

EXAMPLE 15 : Preparation of VLP using pSFV/gagpol vector

To produce VLP composed of processed HIV-1 core proteins, the vector pSFV/gagpol prepared in Example 14 was in vitro transcribed and transfected into BHK-21 cells without pSFV-helper RNA transcripts according to the same method as Example 2. The transfected cells were fixed with cold absolute methanol, cooled at -20°C, for 4 to 6 min, blocked with 1% gelatine, and immunostained with AIDS patient serum, anti-p24 polyclonal antibody and anti-pro polyclonal antibody (refer to Fig. 25, A: a negative control; B: AIDS patient serum; C: anti-p24 polyclonal antibody; D: anti-pro polyclonal antibody). It was found that Gagpol polyprotein as well as Gag protein was expressed in the transfected cells. BHK-21 cells were transfected with pSFV/gagpol RNA transcripts, after an incubation period of 48 hr, the transfected cell lysates and VLPs from the supernatant were analyzed by Western blotting with an anti-p24 polyclonal antibody, followed by ECL assay (refer to Fig. 26, lanes 1 and 4: a negative control; lanes 2 and 5: sample from pSFV/gag; lanes 3 and 6: sample from pSFV/gagpol; cell lysate (lanes 1, 2, and 3); VLP (lanes 4, 5, and 6)).

As shown in Fig. 26, BHK-21 cells transfected with pSFV/gag vector expressed only Pr55 and released immature VLPs. In contrast, BHK-21 cells transfected with pSFV/gagpol vector expressed p24 in addition to Pr55, and released processed mature VLPs, as a result processed Pr55 positively regulated the expression

of p24.

EXAMPLE 16 : Construction of pSFV/gag-envMCTE and pSFV/gagpol-envMCTE expression vectors

- 5 To produce mature VLP carrying Env protein, an env gene containing 26S subgenomic promoter and MCTE was amplified and inserted into a SmaI site of the vector pSFV/gagpol, giving pSFV/gagpol-envMCTE vector. Also, as a comparative construct, pSFV/gag-envMCTE vector was prepared. To construct pSFV/gag-envMCTE vector, primarily, pSFV/gag vector was newly prepared. Because the
- 10 vector pSFV/gag made in Example 1 contains a SmaI site in front of the gag gene, a full-length gag gene (832-2328 bp) of HIV-1 was again amplified by PCR using Primer 18 without SmaI site and Primer 2 according to the same method as Example 1. Next, pSFV/envMCTE (refer to Fig. 27) was prepared by inserting an env gene at a BamHI site of pSFV/MCTE according to the same method as Example 4.
- 15 26SenvMCTE was amplified by using pSFV/envMCTE as a template with Primer 12 (sense) for 26S subgenomic promoter and Primer 15 (antisense) for MCTE, and inserted into a SmaI site of pSFV/gag vector, finally giving pSFV/gag-envMCTE (refer to Fig. 28). Also, the amplified 26SenvMCTE gene was inserted into SmaI site of the vector pSFV/gagpol, giving pSFV/gagpol-envMCTE vector (refer to Fig. 29).
- 20 The vector pSFV/gagpol-env-MCTE was deposited with Korean Culture Center of Microorganisms, one of international depository authorities, on Dec. 2001, as Accession No. KCCM-10348, under the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure.

EXAMPLE 17 : Production of VLP using pSFV/gag-envMCTE and pSFV/gagpol-envMCTE expression vectors

pSFV/gag-envMCTE was in vitro transcribed, and the transcript was transfected into the BHK-21 cells without pSFV-helper RNA transcripts according to the same method as Example 2. The transfected cells were fixed with cold absolute methanol, cooled at -20°C, for 4 to 6 min, blocked with 1% gelatine, and immunostained with AIDS patient serum, anti-p24 polyclonal antibody, anti-pro polyclonal antibody and anti-env monoclonal antibody (refer to Fig. 30, A: a negative control; B: AIDS patient serum; C: anti-p24 polyclonal antibody; D: anti-env polyclonal antibody). It was found that Env protein as well as Gag protein was expressed in the transfected cells.

Also, a pSFV/gagpol-envMCTE vector was transfected using the same method as Example 2 (refer to Fig. 31, A: a negative control; B: AIDS patient serum; C: anti-p24 polyclonal antibody; D: anti-pro polyclonal antibody; E: anti-env monoclonal antibody). It was also revealed that Env protein as well as Gagpol protein was expressed in the transfected cells. In addition, at 48 hr after trasfection of the RNA transcripts of pSFV/gag-envMCTE and pSFV/gagpol-envMCTE into the BHK-21 cells, VLPs isolated from supernatant of the cultivated medium were analyzed by Western blotting with anti-p24 polyclonal antibody and anti-env monoclonal antibody, followed by ECL assay (refer to Fig. 32, A: AIDS patient serum; B: anti-env monoclonal antibody; lanes 1, and 4: sample from pSFV/gag; lanes 2, and 5: sample from pSFV/gag-envMCTE; lanes 3, and 6: sample from pSFV/gagpol-envMCTE). As a result, it was discovered that, when pSFV/gagpol-envMCTE expressed, there were produced processed mature VLPs carrying Env

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

44

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 16, lines 5-15.	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution Korean Culture Center of Microorganisms(KCCM)	
Address of depositary institution (including postal code and country) 361-221, Yurim B/D, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, SEOUL 120-091, Republic of Korea	
Date of deposit 11/12/2000	Accession Number KCCM 10233
C. ADDITIONAL INDICATIONS (as applicable) This information is continued on an additional sheet: <input type="checkbox"/>	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application Authorized officer	For international Bureau use only <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1998)

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 38, line 10-20.	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution Korean Culture Center of Microorganisms(KCCM)	
Address of depositary institution(including postal code and country) 361-221, Yurim B/D, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, SEOUL 120-091, Republic of Korea	
Date of deposit 11/12/2000	Accession Number KCCM 10234
C. ADDITIONAL INDICATIONS(leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE(if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS(leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

46

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 42, line 15-24.	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depository institution Korean Culture Center of Microorganisms(KCCM)	
Address of depository institution (including postal code and country) 361-221, Yurim B/D, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, SEOUL 120-091, Republic of Korea	
Date of deposit 21/12/2001	Accession Number KCCM 10348
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
<p align="center">For receiving Office use only</p> <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application Authorized officer	<p align="center">For international Bureau use only</p> <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1998)

What Is Claimed Is :

1. An alphavirus-based expression vector comprising the nucleotide sequence (6264-8879 bp) of HIV env, operably linked to a first subgenomic promoter, and the nucleotide sequence (832-2328 bp) of HIV gag, operably linked to a second subgenomic promoter.
2. The expression vector as set forth in claim 1, which is plasmid pSFV/env-gag.
3. An alphavirus-based expression vector comprising the nucleotide sequence (832-2328 bp) of HIV gag, operably linked to a first subgenomic promoter, and the nucleotide sequence (6264-8879 bp) of HIV env, operably linked to a second subgenomic promoter.
4. The expression vector as set forth in claim 3, which is plasmid pSFV/gag-env.
5. An alphavirus-based expression vector comprising the nucleotide sequence (6264-8879 bp) of HIV env, operably linked to a first subgenomic promoter, the nucleotide sequence (832-2328 bp) of HIV gag, operably linked to a second subgenomic promoter, and the nucleotide sequence (2268-2606 bp) of HIV pro, operably linked to a third subgenomic promoter.

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

48

6. The expression vector as set forth in claim 5, which is plasmid pSFV/env-gag-pro.
7. An alphavirus-based expression vector comprising the nucleotide
5 sequence (6264-8879 bp) of HIV env, operably linked to a first subgenomic promoter, the nucleotide sequence (832-2328 bp) of HIV gag, operably linked to a second subgenomic promoter, and the nucleotide sequence (832-2577 bp) of HIV gagpro, operably linked to a third subgenomic promoter.
- 10 8. The expression vector as set forth in claim 7, which is plasmid pSFV/env-gag-gagpro.
9. The expression vector as set forth in claim 7, which is plasmid pSFV/env-gag-gagΔpro.
- 15 10. An alphavirus-based expression vector comprising the nucleotide sequence (832-5132 bp) of HIV gagpol, operably linked to a first subgenomic promoter, and the nucleotide sequence (6264-8879 bp) of HIV env, operably linked to a second subgenomic promoter.
- 20 11. The expression vector as set forth in claim 10, which is plasmid pSFV/gagpol-env.
12. The expression vector as set forth in any one of claims 1 to 11,

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

49

which further comprises a constitutive transport element (CTE).

13. The expression vector as set forth in claim 12, which is plasmid pSFV/env-gag-gagpro-CTE.

5

14. The expression vector as set forth in claim 12, which is plasmid pSFV/env-gag-gagApro-CTE.

15. The expression vector as set forth in claim 12, which is plasmid pSFV/gagpol-env-MCTE

10

16. The expression vector as set forth in claim 12, which is plasmid pSFV/gag-env-MCTE.

17. An expression vector deposited in the Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) with accession No. KCCM-10233.

15

18. An expression vector deposited in the Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) with accession No. KCCM-10234.

20

19. An expression vector deposited in the Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) with accession No. KCCM-10348.

20. A method of preparing HIV-like particles, comprising the steps of

WO 02/053757

PCT/KR02/00031

50

introducing the expression vector of any one of claims 1 to 19 or its RNA transcript into animal cells, and allowing the expression vector and the RNA to produce HIV-like particles.

5 21. The method as set forth in claim 20, wherein the HIV-like particles are mature HIV-like particles.

 22. The method as set forth in claim 21, wherein the mature HIV-like particles are infectious.

10

 23. A host cell transformed with one selected from the expression vectors of any one of claims 1 to 19.

 24. The host cell as set forth in claim 23, wherein the host cell is stably transformed with the expression vector.

15

 25. An AIDS vaccine composition comprising a sufficient amount of the expression vectors of any one of claims 1 to 19 or its RNA to induce immune response.

20

 26. An AIDS vaccine composition comprising a sufficient amount of mature HIV-like particles prepared according to the method of claim 21 to induce immune response.

WO 02/053757

51

PCT/KR02/00031

27. A method of vaccinating humans against AIDS comprising administration of the AIDS vaccine composition of claim 25 or 26 to the humans.

28. A diagnostic kit for HIV infection comprising the mature HIV-like
5 particles prepared according to the method of claim 21.

29. A method of detecting antibodies specific against HIV antigens in the test sample, comprising the steps of:

(a) collecting a test sample suspected to containing antibodies specific
10 against HIV;

(b) reacting the test sample with the mature HIV-like particles prepared according to the method of claim 21 under a condition which allows antigen-antibody immune complex to form in the sample; and

(c) detecting the antigen-antibody complexes formed in the test sample.

15

FIG. 1

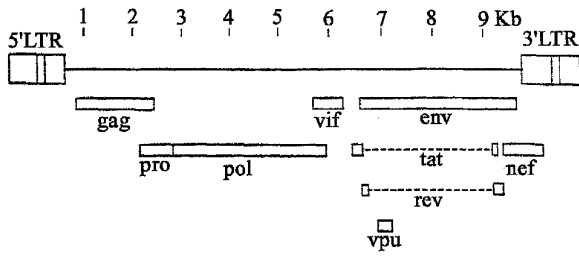


FIG. 2

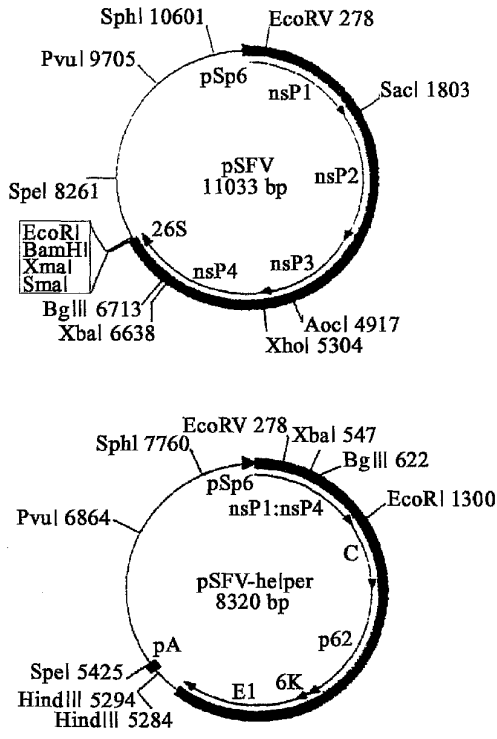


FIG. 3

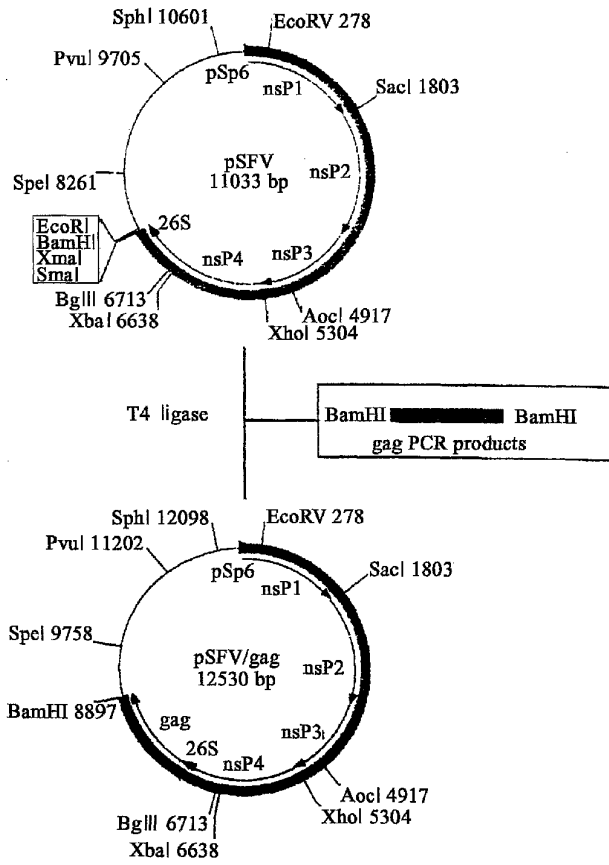
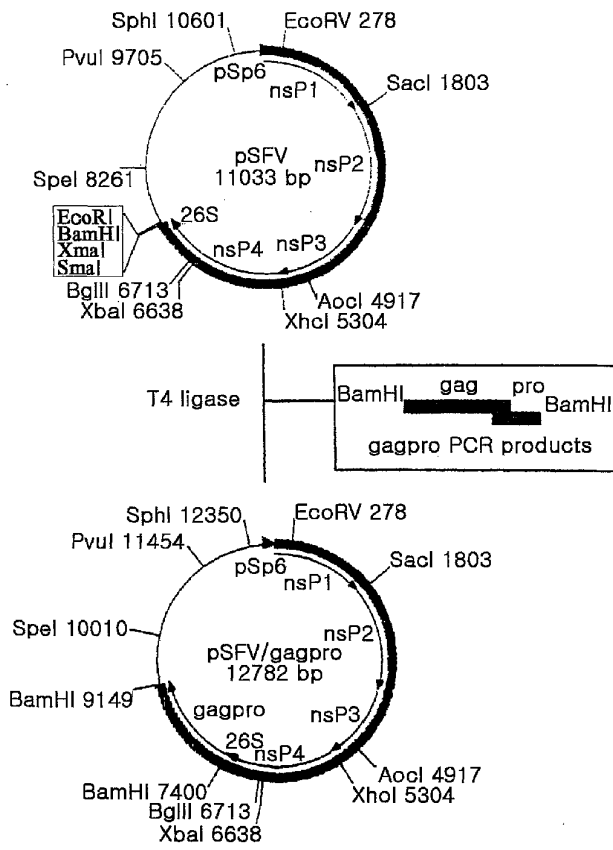


FIG. 4

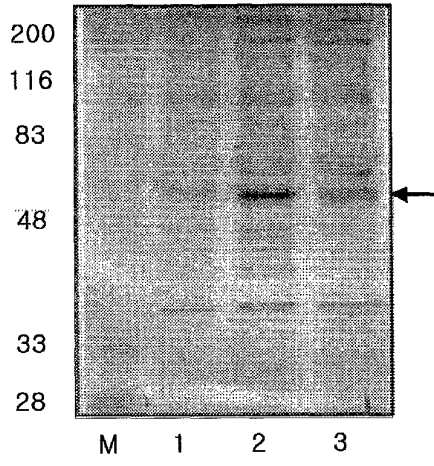


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

5/32

FIG. 5

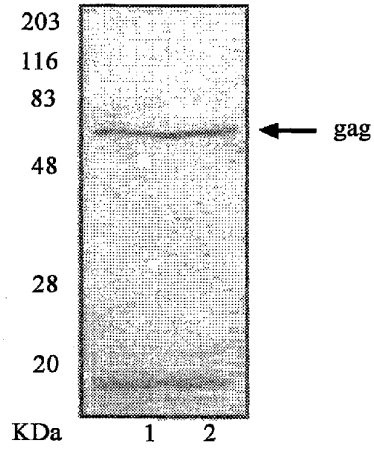


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

6/32

FIG. 6

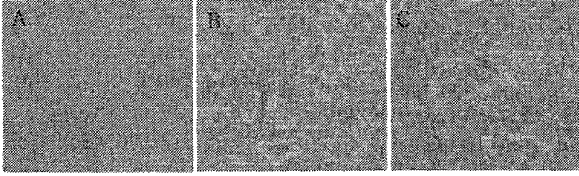


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

7/32

FIG. 7



WO 02/053757

PCT/KR02/00031

8/32

FIG. 8

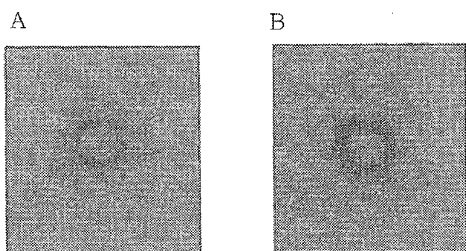
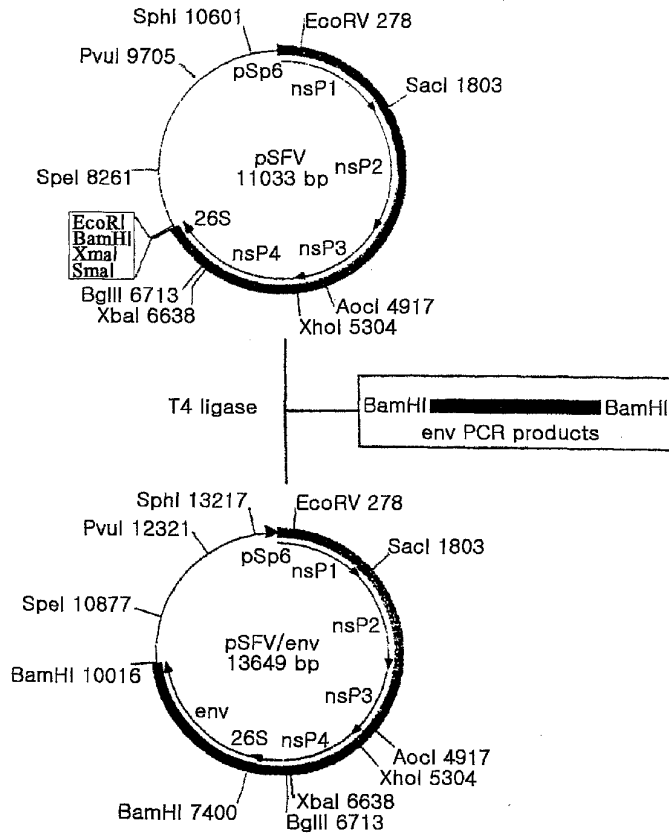


FIG. 9

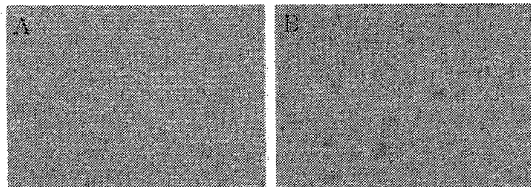


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

10/32

FIG. 10

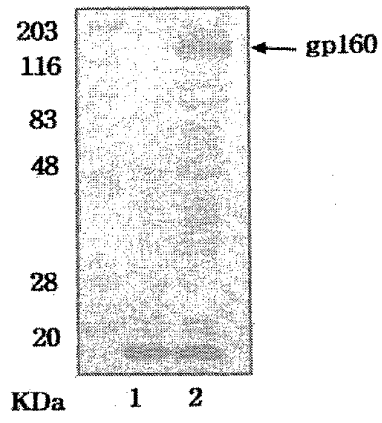


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

11/32

FIG. 11

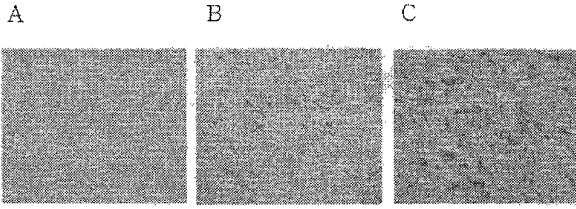


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

12/32

FIG. 12

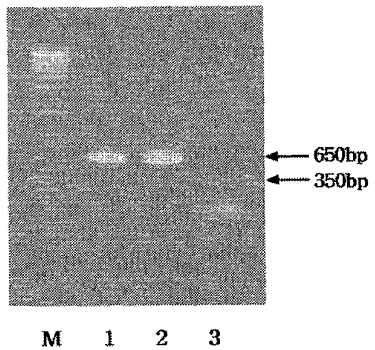


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

13/32

FIG. 13



WO 02/053757

PCT/KR02/00031

14/32

FIG. 14

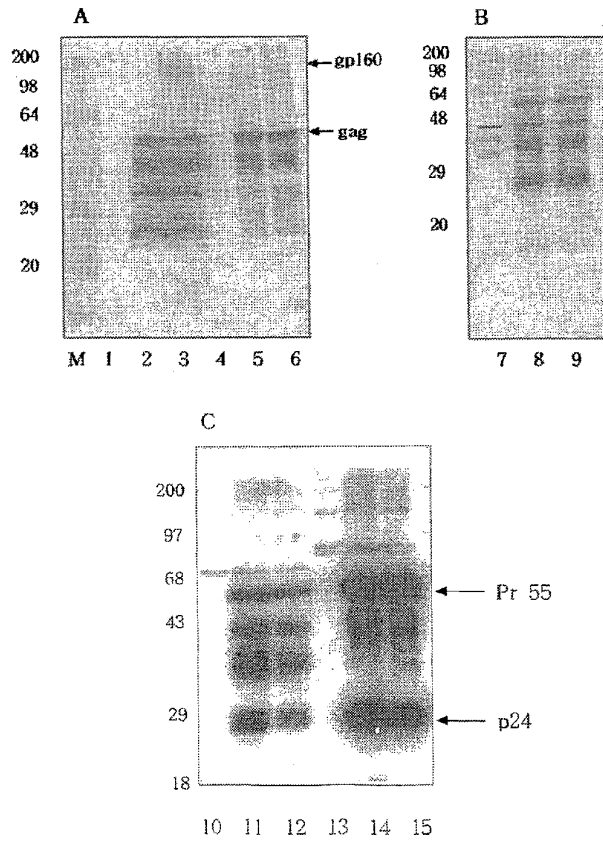
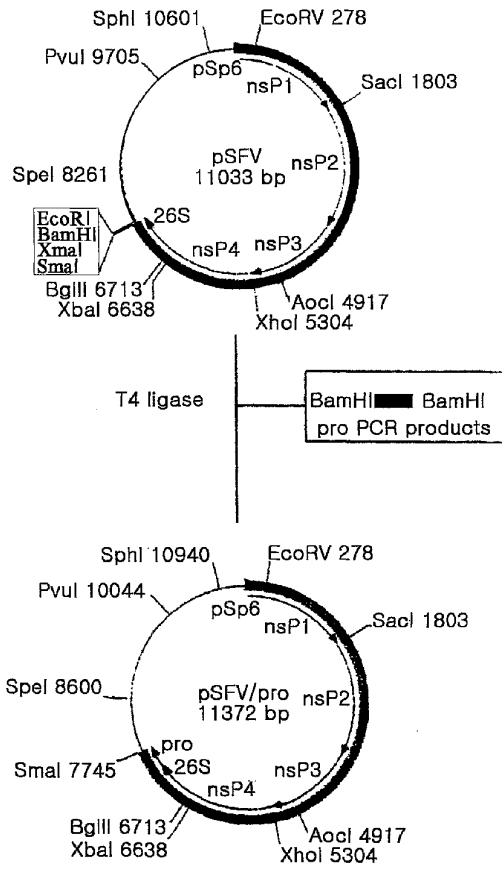
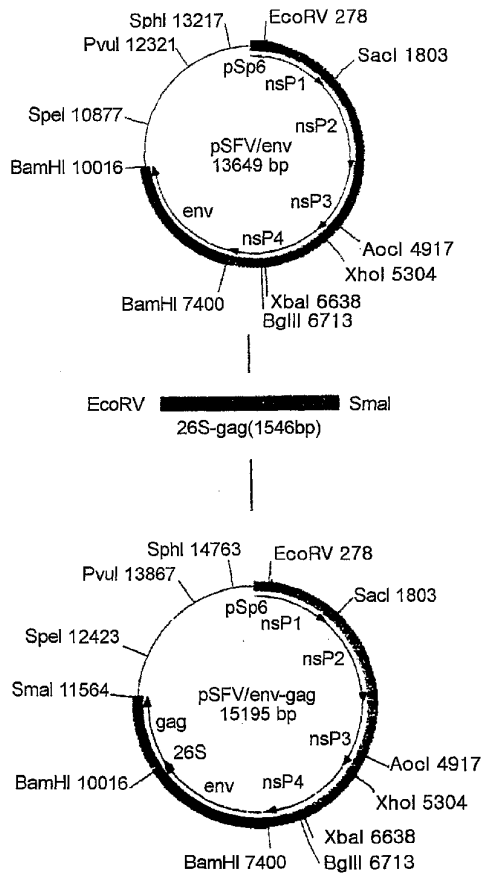


FIG. 15



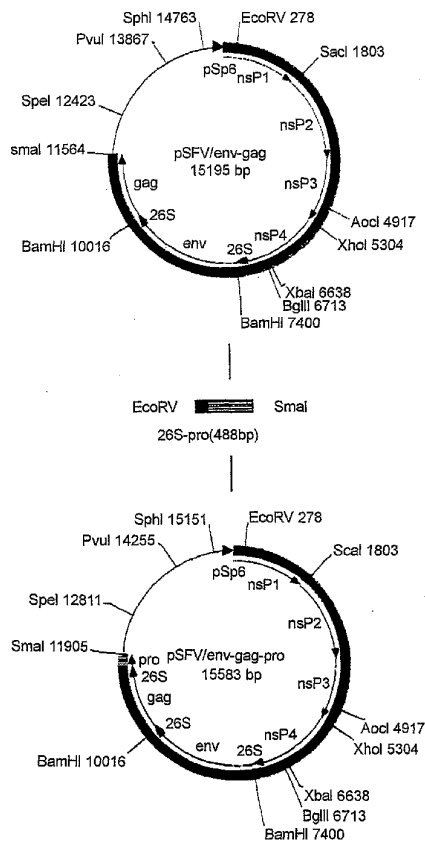
16/32

FIG. 16



17/32

FIG. 17



WO 02/053757

PCT/KR02/00031

18/32

FIG. 18

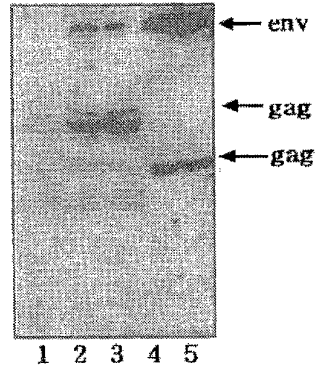
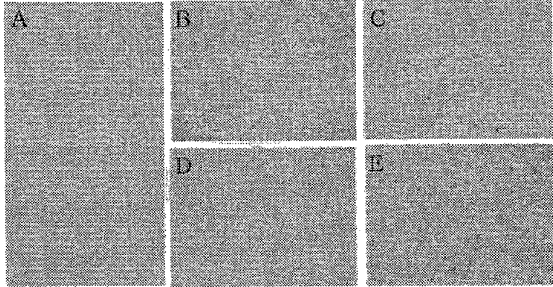


FIG. 19



20/32

FIG. 20

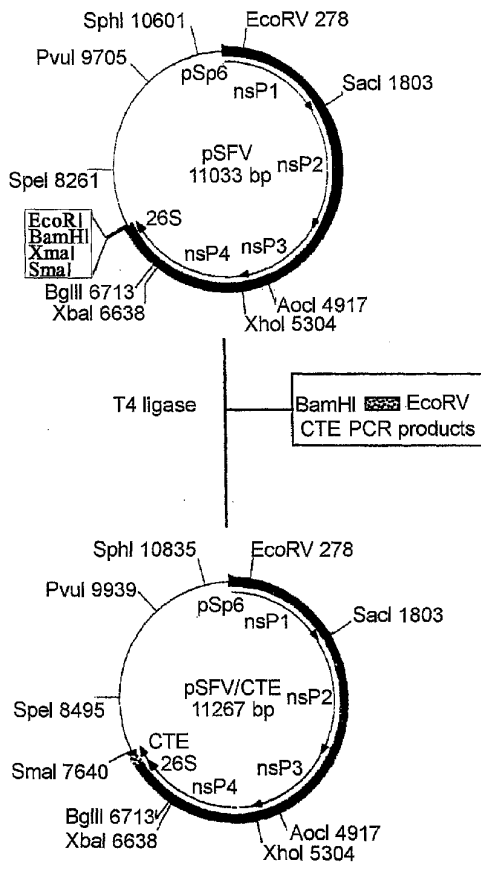


FIG. 21

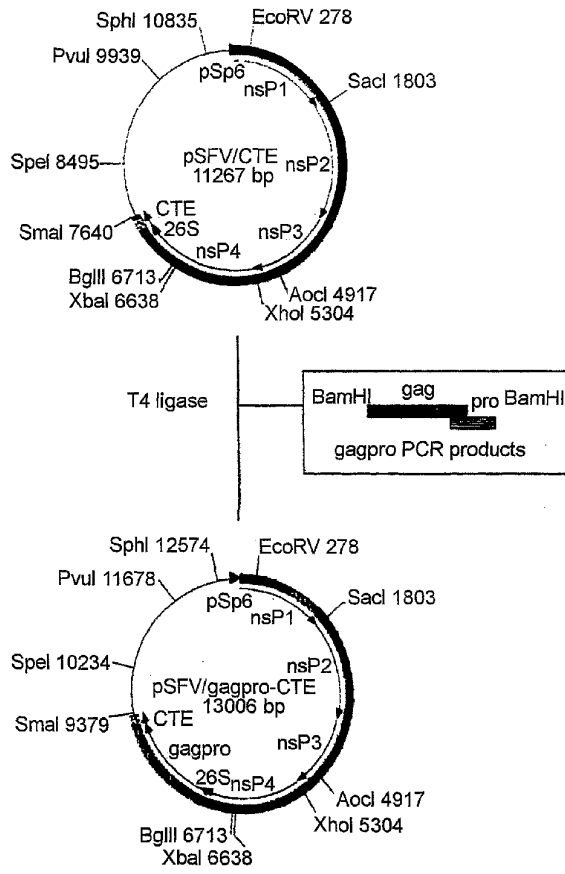


FIG. 22

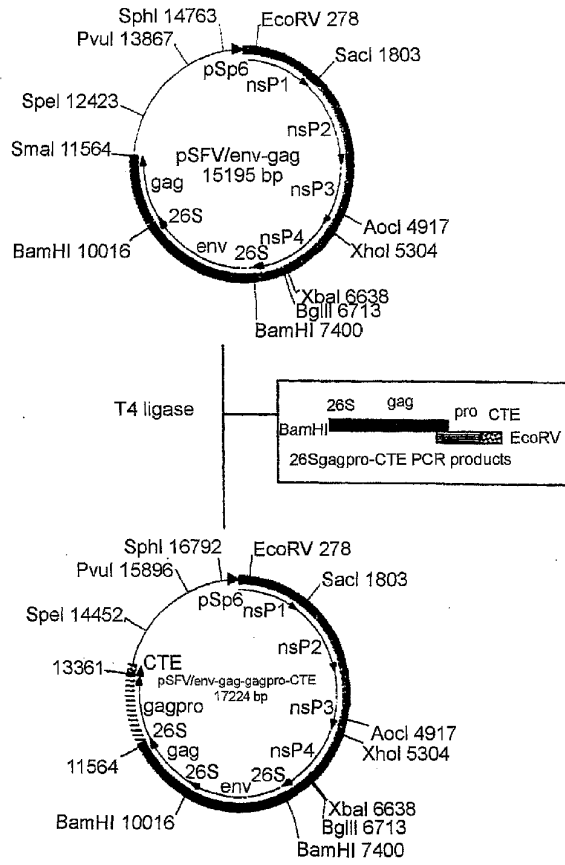


FIG. 23

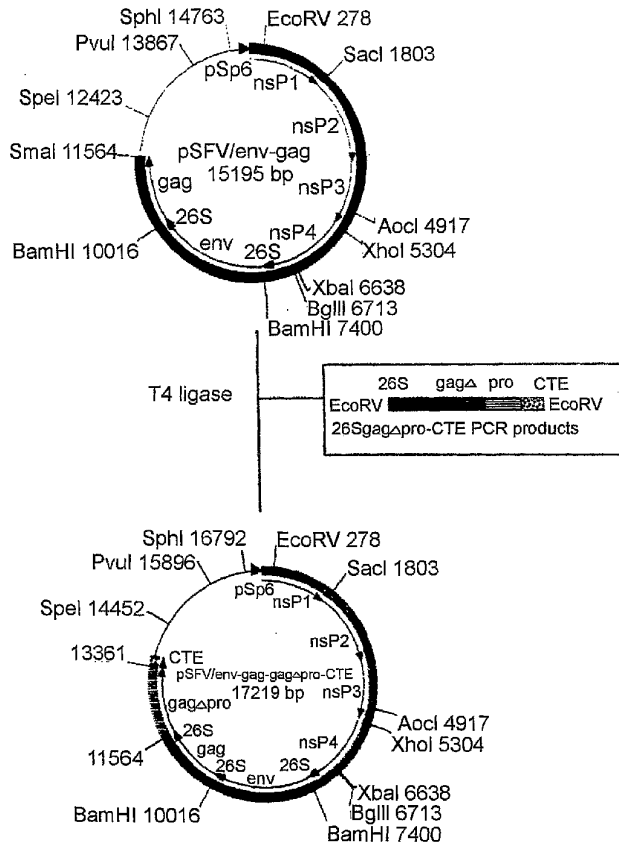


FIG. 24

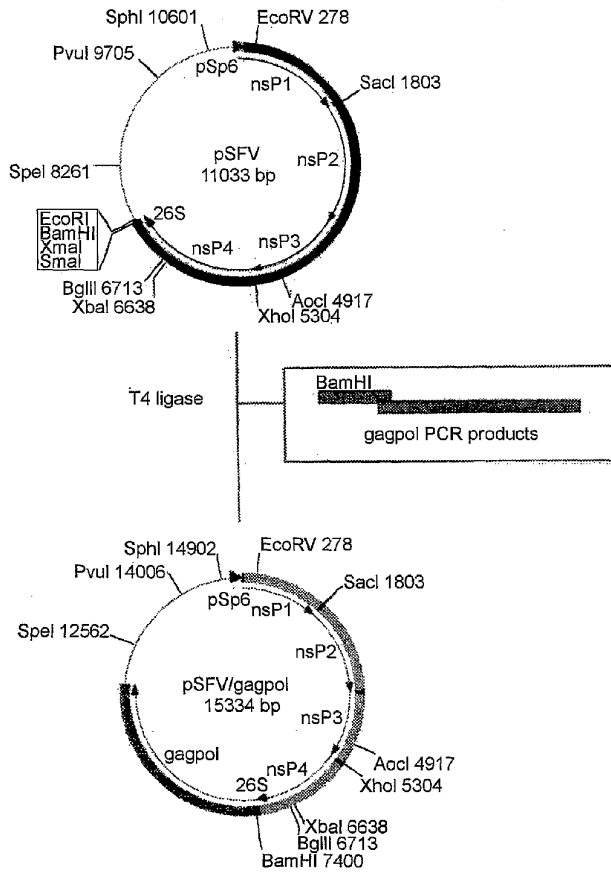
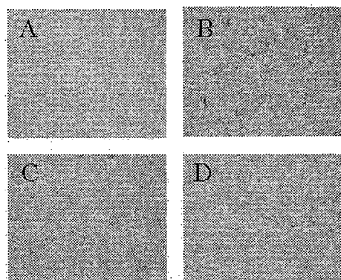


FIG. 25

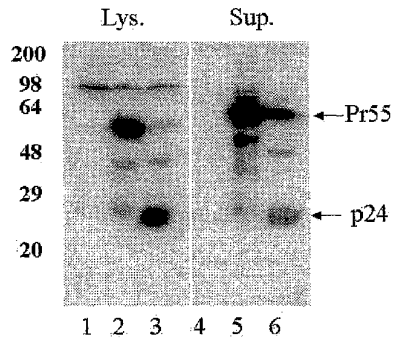


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

26/32

FIG. 26



27/32

FIG. 27

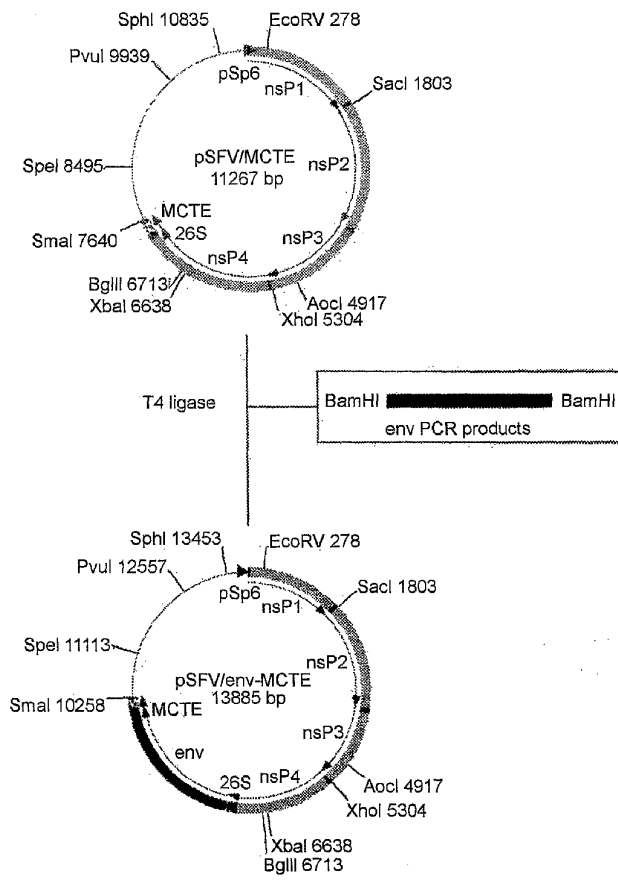


FIG. 28

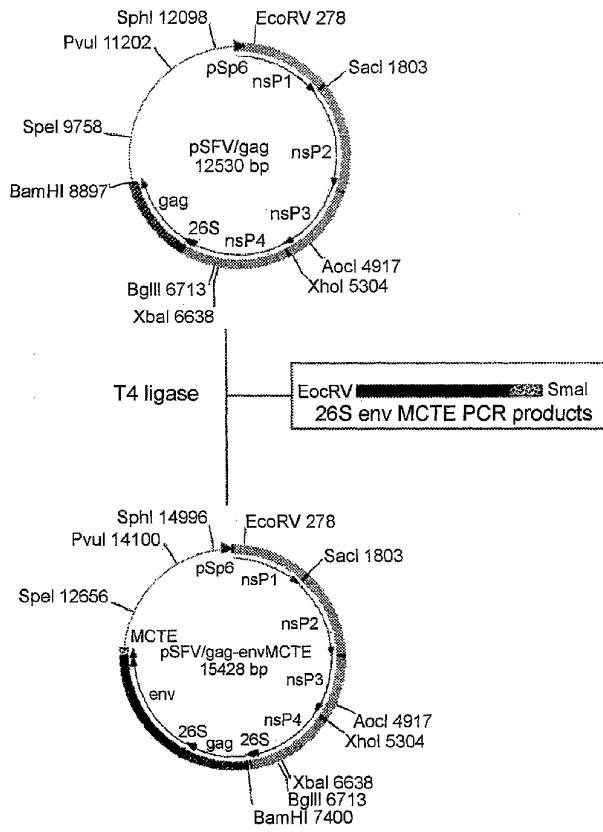


FIG. 29

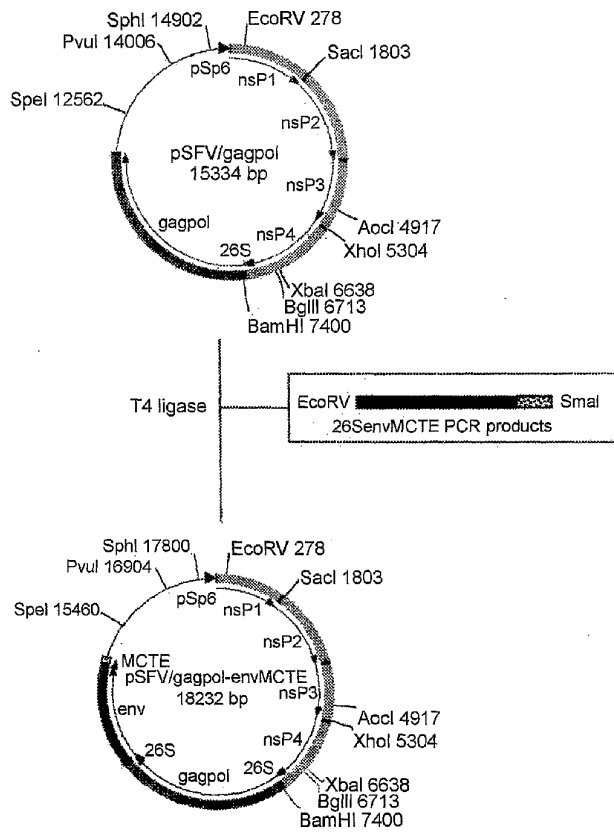
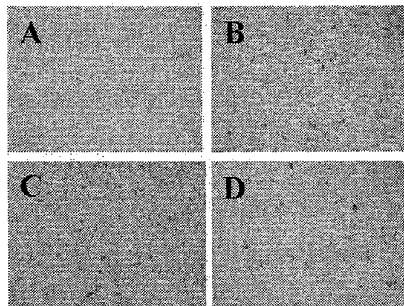


FIG. 30

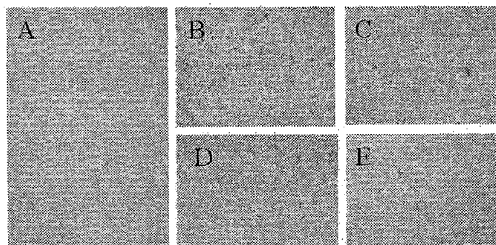


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

31/32

FIG. 31

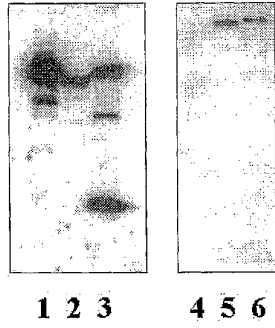


WO 02/053757

PCT/KR02/00031

32/32

FIG. 32



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR02/00031
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC7 C12N 15/63, C12N 15/51, C12N 15/06 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/63, C12N 15/51, C12N 15/06, C12N 1/20 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA, PubMed, GenBank, Espacenet, PAJ, USPTO, "HIV", "gag", "env", "protease", "vector", "vaccine" F		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Fang Z.Y. et al., "Efficient human immunodeficiency virus (HIV)-1 Gag-Env pseudovirus formation elicited from mammalian cells by canarypox HIV vaccine candidate", J. Infect. Dis., 180(4), 1122-32, 1999, see abstract	1-6, 12, 15-17 & 20-27
Y	WO 97/31115 A2 (Merek & CO., Inc. et al.), 28 Aug. 1997.	1-4, 12, 16, 17 & 20-27
Y	WO 00/39304 A2 (Chiron Corp.), 06 Jul. 2000.	1-4, 7-9, 12-14, 16-18 & 20-27
Y	EP 753381 A1 (Immuno-Ag), 12 Jan. 1997.	10-11, 12, 15 & 20-27
Y	US 5,770,428 A (Wisconsin Alumni Res. Foundation), 23 Jun. 1998.	10-12, 15 & 19-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 APRIL 2002 (11.04.2002)		Date of mailing of the international search report 12 APRIL 2002 (12.04.2002)
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 920 Dursan-dong, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, Cheo Young Telephone No. 82-42-481-5594

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR02/0031
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 27	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claim 27 is directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the vaccine composition of claim 25 or 26.
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to part of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Search Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be established without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims. It is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR02/06031

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 97/31115 A2	28 Aug. 1997	AU 729,231 A2 JP 2000-505299 T2	25 Jan. 2001 09 May 2000
WO 00/39304 A2	06 Jul. 2000	EP 1,141,313 A2 EP 1,141,314 A2 EP 1,141,315 A2 WO 00/39302 A2 WO 00/39303 A2	30 Dec. 1999 30 Dec. 1999 30 Dec. 1999 07 Jul. 2000 07 Jul. 2000
EP 753581 A1	12 Jan. 1997	None	
US 5,770,428 A	23 Jun. 1998	EP 611,822 A2 JP 06-261764 A2 US 5,554,524 A	24 Aug. 1994 20 Sep. 1994 10 Sep. 1996

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 7/00	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/569	H
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 5/00	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 キム, ウン

大韓民国, 3 0 1 - 1 5 0 テジョン, チュン - ク, テピョン - ドン 4 2 2 - 7, ボドネ アパ
ートメント 1 1 2 - 2 0 0 2

(72) 発明者 シン, クァン - スン

大韓民国, 3 0 5 - 7 6 2 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 4 0 2 - 1 0 4

(72) 発明者 キム, ヒョン - スー

大韓民国, 3 0 5 - 3 4 0 テジョン, ユソン - ク, ドリョン - ドン 3 9 1, ジュゴン アパー
ートメント 1 - 3 0 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 DA02 EA02 FA02 GA11 HA12
4B063 QA18 QA19 QQ10 QR60 QS24 QS28
4B065 AA90X AA96Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C085 AA03 BA61 BA65 CC08 DD62 EE01

专利名称(译)	HIV样颗粒及其用途		
公开(公告)号	JP2004516846A	公开(公告)日	2004-06-10
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		
[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	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/21 A61P31/18 C07K14/16 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/06 C12N15/09 C12N15/51 C12N15/63 C12N15/86 C12Q1/70 G01N33/569		
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 C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ10 4B063/QR60 4B063/QS24 4B063/QS28 4B065/AA90X 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA61 4C085/BA65 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01		
代理人(译)	木島隆一 金子 一郎		
优先权	1020010000894 2001-01-08 KR		
其他公开文献	JP4178029B2 JP2004516846A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及基于甲病毒的表达载体，它们的RNA转录物和表达HIV-1 env，gag，pro，pol基因的转化宿主细胞。在本发明中，使用上述表达载体表达HIV-1 Gag，Env，Pol和/或Pro蛋白，以产生由上述重组蛋白组成的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，并且可以用作诊断HIV感染存在或不存在的诊断试剂盒的抗原，以及用于预防HIV感染的疫苗组合物。它可以有效地使用。

(5) Int. Cl. 7		F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A G 1 K	39/12	A G 1 K 39/12	4 B O 6 3
A G 1 K	39/21	A G 1 K 39/21	4 B O 6 5
A G 1 P	31/18	A G 1 P 31/18	4 C O 8 5
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N 7/00	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 118 頁) 最終頁			
(21) 出願番号	特願2002-555262 (P2002-555262)	(71) 出願人	503246842 キム、チョル-ジュン
(86) (22) 出願日	平成14年1月8日 (2002. 1. 8)		大韓民国, 305-345 テジョ: ソング、シンソング、ハンウ、 パートメント 103-801
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月8日 (2003. 7. 8)	(74) 代理人	100080034 弁理士 原 謙三
(86) 国際出願番号	PCT/KR2002/000031	(74) 代理人	100113701 弁理士 木島 隆一
(87) 国際公開番号	W02002/053757	(74) 代理人	100116241 弁理士 金子 一郎
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002. 7. 11)	(72) 発明者	キム、チョル-ジュン 大韓民国, 305-345 テジョ: ソング、シンソング、ハンウ、 パートメント 103-801
(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)		