

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 540768

(P2002 - 540768A)

(43)公表日 平成14年12月3日(2002.12.3)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 35/76	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/76		39/12	4 B 0 2 4
38/00		39/395	D 4 B 0 6 4
39/12			S 4 C 0 8 4
39/395		48/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 43数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 599775(P2000 - 599775)

(86)(22)出願日 平成12年2月19日(2000.2.19)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月17日(2001.8.17)

(86)国際出願番号 PCT/DE00/00525

(87)国際公開番号 W000/49038

(87)国際公開日 平成12年8月24日(2000.8.24)

(31)優先権主張番号 199 08 752.0

(32)優先日 平成11年2月19日(1999.2.19)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(31)優先権主張番号 199 08 766.0

(32)優先日 平成11年2月19日(1999.2.19)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 シューベルト ユーリッヒ
アメリカ合衆国 メリーランド州 ベセズ
ダ ムープル アベニュー 4616

(71)出願人 ヘンケレン ベーター
ドイツ国 ベルリン シュルゼ - ボイセン
- ストラッセ 25

(71)出願人 レイ ビクトル
ドイツ国 ウォルフエンビュッテル エル
ピンガー ストラッセ 6

(72)発明者 シューベルト ユーリッヒ
ドイツ国 ウルスタッド ジェナイシュ
ストラッセ 51

(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト免疫不全ウイルス1型 (H I V - 1) ウイルス性調節タンパク質R (V p r) の合成ペプチドおよびその適用

(57)【要約】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)のウイルス性調節タンパク質R(Vpr)に由来した(複数の)合成ペプチド、特に96アミノ酸の完全長Vprタンパク質(sVpr¹⁻⁹⁶)、47アミノ酸長のN末端(sVpr¹⁻⁴⁷)、49アミノ酸長のC末端断片(sVpr⁴⁸⁻⁹⁶)に加えて、これらの断片(sVpr¹⁻²⁰およびsVpr²¹⁻⁴⁰)、並びに更にsVpr¹⁻⁹⁶の約15個アミノ酸長断片の化学合成に関する。HIV-1調節タンパク質の断片または完全長産物として、Vprおよびそのドメインの分子的および構造的な特徴付けのための、更にはVprペプチド配列に対する抗Vpr抗体の開発のための生物学的アッセイにおいて、これらの産物を使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)のウイルス性調節タンパク質R(Vpr)を含む合成ペプチド。

【請求項2】 ペプチドが以下のように特徴付けられる、請求項1記載の方法：

- 2.1. 96アミノ酸長のVprタンパク質(sVpr¹⁻⁹⁶)；
- 2.2. 47アミノ酸長のN末端ペプチド(sVpr¹⁻⁴⁷)；
- 2.3. 49アミノ酸長のC末端ペプチド(sVpr⁴⁸⁻⁹⁶)；さらに、
- 2.4. これらのペプチドの断片、例えば
 - 2.4.1. エピトープの特徴付けおよび等電点電気泳動に関する、重複する約15アミノ酸長のペプチド；
 - 2.4.2. Vprの個々のドメインの構造的および機能的特徴付けのための、約20アミノ酸長ペプチド、特に
 - 2.4.2.1. ペプチドsVpr¹⁻²⁰；および
 - 2.4.2.2. ペプチドsVpr²¹⁻⁴⁰。

【請求項3】 ペプチドが以下のように特徴付けられる、請求項1および請求項2のいずれか一項記載のペプチド：

- 3.1. 以下の配列を含む、96アミノ酸の完全長Vpr-タンパク質sVpr¹⁻⁹⁶

H - Met - Glu - Gln - Ala - Pro - Glu - Asp - Gln - Gly - Pro - Gln - Arg - Glu - Pro - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe - Pro - Arg - Ile - Trp - Leu - His - Asn - Leu - Gly - Gln - His - Ile - Tyr - Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala - Gly - Val - Glu - Ala - Ile - Ile - Arg - Ile - Leu - Gln - Gln - Leu - Leu - Phe - Ile - His - Phe - Arg - Ile - Gly - Cys - Arg - His - Ser - Arg - Ile - Gly - Val - Thr - Arg - Gln - Arg - Arg - Ala - Arg - Asn - Gly - Ala - Ser - Arg - Ser - OH

；

- 3.2. 47アミノ酸長のN末端ペプチドsVpr¹⁻⁴⁷

H - Met - Glu - Gln - Ala - Pro - Glu - Asp - Gln - Gly - Pro - Gln - Arg - Glu - Pro - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe - Pro - Arg - Ile - Trp - Leu - His - Asn - Leu - Gly - Gln - His - Ile - Tyr - NH₂

;

3.3. 49アミノ酸長のC末端ペプチドsVpr⁴⁸⁻⁹⁶

Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala - Gly - Val - Glu - Ala - Ile - Ile - Arg - Ile - Leu - Gln - Gln - Leu - Leu - Phe - Ile - His - Phe - Arg - Ile - Gly - Cys - Arg - His - Ser - Arg - Ile - Gly - Val - Thr - Arg - Gln - Arg - Arg - Ala - Arg - Asn - Gly - Ala - Ser - Arg - Ser-OH

;

3.4. 15アミノ酸長ペプチドからなるこれらのペプチドの断片：

3.4.1. sVpr¹¹⁻²⁵

Gln - Arg - Glu - Pro - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - Glu - Leu - Leu - Glu - Glu

;

3.4.2. sVpr⁴¹⁻⁵⁵

Asn - Leu - Gly - Gln - His - Ile - Tyr - Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala

;

3.4.3. sVpr⁴⁶⁻⁶⁰

Ile - Tyr - Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala - Gly - Val - Glu - Ala - Ile

;

3.4.4. sVpr⁵⁶⁻⁷⁰

Gly- al-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Leu-Phe-Ile

;

3.5. 約20アミノ酸長のペプチドとして、

3.5.1. sVpr¹⁻²⁰ (Asn^{5,10,14}) の形式のペプチドsVpr¹⁻²⁰

H-Met - Glu - Gln - Ala - Asn - Glu - Asp - Gln - Gly - Asn - Gln - Arg - Glu - Asn - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu-NH₂,

;

3.5.2. sVpr²¹⁻⁴⁰ (Asn³⁵) の形式のペプチドsVpr²¹⁻⁴⁰

H-Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe - Asn - Arg - Ile - Trp - Leu - His-NH₂

。

【請求項4】 C末端Vprペプチドの合成がパーキンエルマー (Perkin Elmer) 合成装置を用いてセリン樹脂上で行われ、全てのN末端ペプチドがポリスチレンポリオキシエチレン樹脂上で合成され、かつ全てのペプチドがFmoc保護基ストラテジーを用いて合成される、請求項1～請求項3のいずれか一項記載の、ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)のウイルス性調節タンパク質R(Vpr)由来の合成ペプチドを作製する方法。

【請求項5】 合成保護基の末端が、合成終了時に、95%トリフルオロ酢酸、3%トリイソプロピルシラン、およびペプチド配列に依存した2%～5%エタンジチオールからなる切断混合物を用いて切断され、樹脂が分離される、請求項4記載の方法。

【請求項6】 粗ペプチドが、アセトニトリル中のTFAおよび水の直線勾配を用いた、シリカゲルカラム上のHPLCクロマトグラフィーによって精製される、請求項4および請求項5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】 治療および診断の用途のための、ヒト免疫不全ウイルス1型(

HIV-1)のウイルス性調節タンパク質R(Vpr)由来の合成ペプチドの適用。

【請求項8】 以下のような、請求項7記載の適用：

- 8.1. 生物学的アッセイにおける：
 - 8.1.1. 血清学的試験システムの開発のための適用；
 - 8.1.2. Vpr抗原捕獲ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)の開発のための適用；
- 8.2. HIVペプチド配列に対する抗体作製のための適用；
- 8.3. 抗ウイルス試薬の作製のための適用；
- 8.4. 潜在的なVpr阻害剤のスクリーニングのための試験システムの開発のための適用；
- 8.5. Vprの病理学的機構を調べるための、細胞培養物および動物モデルの開発のための適用；
- 8.6. Vprおよびそのドメインの構造解析のための適用；
- 8.7. 遺伝子治療における適用に関する、ウイルスのインビトロでの集合およびベクターの開発における適用のための適用。

【請求項9】 タンパク質が、N末端ドメインが4個のプロリン残基のうち1個、数個または全てのいずれかが突然変異されているsVprに由来する、請求項7および請求項8のいずれか一項記載の適用。

【請求項10】 Vprに特異的なポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体または抗血清を作製するための、請求項7～請求項9のいずれか一項記載の適用。

【請求項11】 エピトープの異なるVpr特異的抗体作製のための、請求項7～請求項10のいずれか一項記載の適用。

【請求項12】 血清学的試験システムにおける、請求項7～請求項11のいずれか一項記載の適用。

【請求項13】 Vpr抗原(Ag)ELISAにおける、請求項7～請求項12のいずれか一項記載の適用。

【請求項14】 Vpr-Ag-ELISA技法の較正のための標準抗原としての、請求項7～請求項13のいずれか一項記載の適用。

【請求項15】 HIV感染した個体の末梢血中のウイルス性VprのVpr濃度の

検出および推定のための、請求項7～請求項8のいずれか一項記載の適用。

【請求項16】 Vpr阻害剤の特徴付けのためのインビトロ試験システムのための、請求項7および請求項8のいずれか一項記載のsVprタンパク質の適用。

【請求項17】 Vpr欠損HIV変異体に感染した細胞培養物中の内因性ウイルス性Vprの機能を補完するための、請求項7および請求項8のいずれか一項記載の適用。

【請求項18】 Vpr欠損HIV変異体に感染した初代ヒトリンパ球培養物中の内因性ウイルス性Vprの機能を補完するための、請求項7、請求項8および請求項17のいずれか一項記載の適用。

【請求項19】 Vpr欠損HIV変異体に感染した初代ヒト単球/マクロファージ培養物中の内因性ウイルス性Vprの機能を補完するための、請求項7、請求項8、請求項17および請求項18のいずれか一項記載の適用。

【請求項20】 以下のような試薬を特徴付けるための、請求項7～請求項19のいずれか一項記載の適用：

- a) Vprと、例えば糖質コルチコイド受容体のような細胞因子、転写因子、並びにDNAと相互作用する他の酵素および因子との相互作用を阻害する試薬；
- b) Vprの転写活性化活性を阻害し、ステロイドホルモンに対するVpr活性を調節、妨害または阻害する試薬；
- c) それ自身におけるまたはHIV前融合複合体(preintegration complex)の他の成分との複合体におけるVprの輸送を調節、妨害、または阻害し、さらにHIV集合(assembly)時のウイルス粒子の出芽(budding)におけるVprのキャプシド形成を調節、妨害または阻害する試薬；
- d) Vprに誘導された細胞周期停止を調節、妨害または阻害し、さらに細胞分化および細胞増殖に対するVprの作用を調節、妨害または阻害する試薬；
- e) Vprの細胞傷害性作用を調節、妨害または阻害する試薬；
- f) イオンチャネル活性を調節、妨害または阻害する試薬。

【請求項21】 Vpr阻害剤を特徴付けるインビボ試験システムのための、請求項7および請求項8記載のsVprタンパク質の適用。

【請求項22】 請求項20記載の機能の特徴付けのための動物モデル試験に

おける、請求項7および請求項8記載のsVprタンパク質の適用。

【請求項23】 濃縮ペプチド溶液の作製のための、請求項7および請求項8記載のsVprタンパク質の適用。

【請求項24】 Vpr特異的阻害剤の作製のための、請求項7、請求項8および請求項23のいずれか一項記載のsVprタンパク質の適用。

【請求項25】 VprのN末端ドメインの柔軟性を低下させる構造安定化因子の適用のための、請求項7、請求項8、請求項21および請求項24のいずれか一項記載のsVprタンパク質の適用。

【請求項26】 構造安定化因子が以下のものである、請求項25記載の適用：

- a) Vprに結合するDNA修復酵素HHR23AのUBA2ドメイン；
- b) Vpr特異的免疫グロブリンのFab断片；
- c) ウイルス因子、特に、ウイルス集合過程においてVprと相互作用するHIV-1 Gagポリタンパク質前駆体Pr55^{Gag}の成分；または
- d) ヒト糖質コルチコイド受容体またはその成分。

【請求項27】 レトロウイルス前融合複合体のインビトロでの集合のための、請求項7記載のsVprタンパク質の適用。

【請求項28】 遺伝子導入法のインビトロまたはインビボでの適用における、請求項7、請求項8および請求項27のいずれか一項記載のsVprタンパク質の適用。

【請求項29】 真核細胞における、トランスフェクション、染色体性またはエピソーム性の宿主DNAへの組込み、もしくは任意の他の遺伝子導入法のための、請求項7、請求項8および請求項27のいずれか一項記載のsVprタンパク質の適用。

【請求項30】 細胞、組織、および生物への導入のためにインビトロ合成および/または操作された遺伝子ならびにその断片を用いた、遺伝子導入のための、また遺伝子治療を目的とした任意の適用のための、請求項7、請求項8および請求項28記載のsVprタンパク質の適用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

要約

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)のウイルス調節タンパク質R(Vpr)に由来する合成ペプチド(複数)、特に96アミノ酸完全長Vprタンパク質であるsVpr¹⁻⁹⁶と、更にそれらのいくつかの断片の化学合成に関する。これらの合成HIV-1 Vprペプチドの、分子および構造の特徴決定に関する生物学的アッセイにおける適用に加え、抗Vpr抗体および血清診断試験システムの開発における適用が明らかにされている。

【0002】

今日までに唯一インビトロで特徴付けられたHV-1 Vprの生化学活性は、カチオン-選択性イオンチャネルの活性である(Pillerら、1996、実施例の最後の参考文献一覧)。これらの研究は、C末端ヘリックス(Vprにおけるアミノ酸46~71位)が、ミツバチ(honey bee)毒メリチンとある種の類似性を有し、これは膜細孔形成を膜貫通アンカーとして起動する能力を有するという仮説を基にしている。実際に、Escherichia(E.) coliにおいて発現された組換えVprは、人工の平面脂質二重層において再構成された。膜電位によりゲート開閉されるこのシステムを用いて、イオンチャネル活性が確定された。このチャネルのゲートの開閉は、細胞膜の細胞質部分と相互作用すると考えられる正荷電したVprのC末端ドメインによって左右される。

【0003】

Vprはホモオリゴマーを形成する証拠がある：組換えVpr-融合タンパク質は、分子量>100kDaのオリゴマー構造において見つかった(Zhaoら、1994b)。今までには、この知見は、ウイルス性Vprに関する研究により確認はされていない。Vprの分子構造は、ふたつの研究所において、短いVpnペプチドの二次構造解析を用いて研究されている：Vprの50-82位の α -ヘリックス領域は、水性トリフルオロエタノール(TFE)中と、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ミセル中での重複ペプチドのNMR-試験により確定された(Yaoら、1998)。数名の執筆者が、VprのC末端に加えN末端内の領域について、ヘリックス形成の傾向を推定している(Mahalingam

ら、1995a-d ; Yaoら、1995 ; Wangら、1996b)。TFE水溶液中でCDスペクトルを用いる25アミノ酸長のペプチドに関する最近の研究(Luoら、1998)は、VprにおけるN-およびC末端ヘリックスの存在に関する最初の実験的証拠を提供した。突然変異分析を基に、Vprについて報告された様々な生体活性をVprの特定の一次および二次構造と関連づけようとした多くのおよび少なくとも部分的に矛盾する情報が報告されている(Mahalingamら、1995a-d、1997 ; Wangら、1996a,b ; Nieら、1998 ; Di Marzioら、1995)。

【0004】

Vprペプチドの全体の化学合成は、Rocquignyとその同僚により1997年に初めて説明された。これらの執筆者は、ウイルス単離体HIV-1_{89..6}由来の96アミノ酸長のペプチドの合成について報告した(Coillmanら、1992)。これらの執筆者が自身の論文において報告したようにこの合成には欠点があるにも拘らず(更に本文参照)、このタンパク質は、ウイルス単離体HIV-1_{NL4-3}由来のVprタンパク質と比べて、9アミノ酸位置が異なり、その合成は、本明細書に初めて記されている。このように、既報のもの(Rocquignyら、1997)と、本方法において詳細に説明されたウイルス単離体HIV-1_{NL4-3}(Adachiら、1986)由来のVprタンパク質の全体または一部配列を対象とする合成生成物の間には、アミノ酸配列に10%-ige多様性がある。

【0005】

Rocquignyとその同僚は(1997)、これらの合成Vprペプチドの純度および分子特徴についてはいかなる情報も明らかにしなかった。これらの執筆者は、SDS変性したVprペプチドの同じHIV-1-単離体に由来したウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質p7^{NC}との結合を明らかにするfar-Westernプロット技法についてのみ説明した。今までのところ、このp7^{NC}-Vpr-相互作用に関する知見は、その他の膨大なVpr研究に携わる世界中の研究室の作業では再現されていない。Rocquignyとその同僚が説明したVpr合成(1997)の重大な欠点は、HIV-1 Vprの生物学的機能で今までに十分特徴付けられたものが、これらの合成ペプチドに関して執筆者により明らかにされていないという事実である。特に、これらの執筆者は、この特定のVprペプチドが、良く認識された特徴的天然ウイルス性Vpr(Paxtonら、1993

; Lavalleeら、1994 ; Kondoら、1995 ; Luら、1995 ; KondoおよびGottlinger、1996) であるp6^{Gag}に結合しないことを示している。加えてこれらの執筆者は、このVpr プチドは、オリゴマー構造を形成せず、かつこの合成生成物が水溶液に不溶性であることの何らかの指標があることを、報告している。同じ研究室で、Vpr-p7^{NC}-相互作用モデルが、Vpr ペプチドの部分配列について行われた構造解析を基にした追加試験において導入されたが、しかし、構造および実験データに関する詳細な情報は、この中またはこれらの執筆者により公表された他の報告書において示されていない(Roquesら、1997)。

【0006】

合成Vprペプチドの部分配列(アミノ酸50~75位、50~82位、および59~86位)を、NMR試験に用いた(Yaoら、1998)。別のグループは、円偏光2色性スペクトルを用い、Vprの推定されたヘリックスドメイン由来の25アミノ酸長のペプチドを2種類調べた(Luoら、1998)。更に「HF/SRIG」モチーフを濃度範囲0.7~3μMを含むVprのC末端領域由来の短い約20アミノ酸長のペプチドは、様々な酵母種、例えば*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*および*Schizosaccharomyces pombe*などに対して細胞傷害性活性を有した(Macreadieら、1996、1997)。高濃度の二価カチオン、特にマグネシウムおよびカルシウムは、取りこみを阻害し、その結果Vpr-ペプチドの毒性作用を阻害する。これに続く研究は、C末端Vprペプチド(アミノ酸71-82位)が、膜透過性、膜電位の低下、およびCD4⁺ T細胞における実際の細胞死を誘導し得ることを証拠を提供した(Macreadieら、1997)。完全長についても、毒性作用は同様である(Arunagiriら、1997)。これらの研究について、先にVprのイオンチャネル研究(Pillerら、1996)においても使用された、同じ組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)-Vpr-融合タンパク質が使用された。それにもかかわらず、先行する研究同様、この執筆者達は、水性システム中の組換え産物の溶解度に関する問題点を報告している。

【0007】

前述のウイルス単離体HIV-1_{NL4-3}に由来した組換えVprは、組換えバキュロウイルスに感染した昆虫細胞において発現された(Levyら、1995)。これらの産物の精製は、VprのN末端ドメインに対するポリクローナル抗体で固定したものに対する

るイムノアフィニティクロマトグラフィーによってのみ行った。この方法については、組換えVprが培養培地に分泌されるので、細胞培養物上清が適用された。

【0008】

組換えVprの大規模生成のストラテジーは、今のところ説明されていない。ほとんどの場合において、組換えVprを含有する細胞培養物上清を、生物学的アッセイのために使用した。このようなアッセイにおいて、組換えVprは、PBMC(末梢血単核細胞)に加え、HIV-1に潜伏感染したいくつかの単球およびT細胞株において、ウイルス複製を活性化することが示された。これらの既報の方法の重大な欠点は以下のものである：

高度に精製されたVpr産物のmg量の生成を可能としないような低い収量；

その後の透析および復元に必要なアフィニティ精製の過程において組換えVprに界面活性剤が添加されること；

昆虫細胞におけるVprの翻訳後修飾の可能性に関する研究が報告されていないこと。

【0009】

組換えVprの発現、精製および生化学的特徴決定は、最初に1994年にZhaoとその同僚により報告された。この方法に関して、ウイルス単離体HIV-1_{89.6}に由来したVprタンパク質のコード配列は、E. coliにおいて融合タンパク質として発現された。この組換え産物の精製を目的として、25アミノ酸FLAG-エピトープの25番目のアミノ基がC末端に融合された。この組換え産物に関して、オリゴマー化の他には、生体活性は報告されていない。この方法の重大な欠点は、Vprは、その標準(authentic)配列においては発現されないが、融合タンパク質において発現されるという事実である。

【0010】

別の方法において、ウイルス単離体HIV-1_{HXB₂}由来のVprタンパク質は、E. coliにおいて、GST-融合タンパク質として発現された(Pillerら、1996)。グルタチオン-アガロース上でのアフィニティクロマトグラフィー後に、Vprがトロンビンによるタンパク質分解的切断により融合タンパク質から放出された。この方法の重大な欠点は、トロンビン切断後のVprは、凝集する傾向があり、かつ水溶液中

に維持されないという事実である。Arunagiriとその同僚(1997)は、この方法で生成されたVprは、GST融合部分の切断後のタンパク質沈殿および凝集を伴わずに、水溶液中に維持されることはない一方で、GST-Vpr融合タンパク質のみが水溶液中の試験システムについて利用可能性があることを報告した。

【0011】

国際公開公報第95/26361号(Azad, A.A., Macreadie, I.G., Arunagiri, C., 1995)は、HIV Vprタンパク質の生体活性ペプチド断片；これらのペプチドまたはそれらの生体活性アナログを含有する薬学的化合物；Vpr-ペプチドのアンタゴニストに加え、このようなVpr-アンタゴニストを含有する薬学的化合物を開示している。完全長Vprの化学合成は、この方法では説明されていない。

【0012】

国際公開公報第96/07741号(Cohen, E. ; Bergeron, D. ; Checroune, F. ; Yao, X.-J. ; Pignac-Kobinger, G., 1996)は、HIV-1/HIV-2ウイルス粒子に特異的に組入れられかつ出芽ビリオンの構造および機能を妨害するような、HIV-1由来のVprおよびHIV-2由来のVpx からなるキメラ分子を保護している。これらのキメラ分子は、HIV-1/HIV-2感染の遺伝子治療における適用のために保護されている。

【0013】

国際公開公報第96/08970号(Weiner, D.B. ; Levy, D N. ; Refaeli, Y., 1996)は、Vprタンパク質、Vpr断片またはVpr遺伝子配列を使用し、リンパ球活性化の細胞分裂を阻害する方法を説明している。Vprタンパク質の化学合成は、この方法においては記述されていない。

【0014】

抗HIV医薬品のスクリーニングアッセイにおけるVpr遺伝子の適用は、米国特許第5,721,104号および第5,639,619号に開示されており、HIV-2感染の確定は、米国特許第5,580,739号に、Vpr受容体 -タンパク質は、米国特許第5,780,238号に開示されている。

【0015】

本発明は、mg量のVprタンパク質を高収量で合成し、これらのVprタンパク質を精製するための、および最終産物である高度に精製されたVprタンパク質が一般

的適用に利用できるためのプロトコールを開発する際の問題点を基にしている。

【0016】

本発明に従い、この問題点は、タンパク質 sVpr¹⁻⁹⁶に加え以下のペプチドの提供により解決された：

47アミノ酸長のN末端ペプチド(sVpr¹⁻⁴⁷)；

49アミノ酸長のC末端ペプチド(sVpr⁴⁸⁻⁹⁶)およびそれらのペプチドの断片、例えば

エピトープマッピングおよび等電点電気泳動に関する、重複した約15アミノ酸長のペプチド；

Vprの個々のドメインの構造的および機能的特徴付けのための、約20アミノ酸長ペプチド、特にペプチドsVpr¹⁻²⁰およびペプチドsVpr²¹⁻⁴⁰：

sVpr1-96

H - Met - Glu - Gln - Ala - Pro - Glu - Asp - Gln - Gly - Pro - Gln - Arg - Glu - Pro - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe - Pro - Arg - Ile - Trp - Leu - His - Asn - Leu - Gly - Gln - His - Ile - Tyr - Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala - Gly - Val - Glu - Ala - Ile - Ile - Arg - Ile - Leu - Gln - Gln - Leu - Leu - Phe - Ile - His - Phe - Arg - Ile - Gly - Cys - Arg - His - Ser - Arg - Ile - Gly - Val - Thr - Arg - Gln - Arg - Arg - Ala - Arg - Asn - Gly - Ala - Ser - Arg - Ser-OH

；

sVpr1-47

H-Met - Glu - Gln - Ala - Pro - Glu - Asp - Gln - Gly - Pro - Gln - Arg - Glu - Pro - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe - Pro - Arg - Ile - Trp - Leu - His - Asn - Leu - Gly - Gln - His - Ile - Tyr-NH₂

sVpr48-96

Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala - Gly - Val - Glu - Ala - Ile - Ile - Arg -
Ile - Leu - Gln - Gln - Leu - Leu - Phe - Ile - His - Phe - Arg - Ile - Gly - Cys - Arg -
His - Ser - Arg - Ile - Gly - Val - Thr - Arg - Gln - Arg - Arg - Ala - Arg - Asn - Gly -
Ala - Ser - Arg - Ser-OH

;

sVpr1-20 (Asn5,10,14) 変異体としてのsVpr1-20

H-Met - Glu - Gln - Ala - Asn - Glu - Asp - Gln - Gly - Asn - Gln - Arg - Glu - Asn -
Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu-NH₂,

;

sVpr21-40 (Asn35) 変異体としてのsVpr21-40

H-Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe -
Asn - Arg - Ile - Trp - Leu - His-NH₂,

;

約15アミノ酸長のペプチドを含む、これらのペプチドの断片：

sVpr11-25

H-Gln - Arg - Glu - Pro - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - Glu - Leu - Leu - Glu -
Glu-NH₂,

;

sVpr41-55

H-Asn - Leu - Gly - Gln - His - Ile - Tyr - Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp -
Ala-NH₂,

;

sVpr46-60

H-Ile - Tyr - Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala - Gly - Val - Glu - Ala - Ile-NH₂,

;

sVpr56-70

H-Gly - Val - Glu - Ala - Ile - Ile - Arg - Ile - Leu - Gln - Gln - Leu - Leu - Phe - Ile-NH₂,

;

sVpr66-80

H-Gln - Leu - Leu - Phe - Ile - His - Phe - Arg - Ile - Gly - Cys - Arg - His - Ser - Arg-NH₂,

;

sVpr76-96

H-Cys - Arg - His - Ser - Arg - Ile - Gly - Val - Thr - Arg - Gln - Arg - Arg - Ala - Arg - Asn - Gly - Ala - Ser - Arg - Ser-OH,

【0017】

C末端Vpr-ペプチドは、パーキンエルマーペプチド合成装置を用いて、セリン樹脂上で合成された。N末端ペプチドは全て、ポリスチレンポリオキシエチレン樹脂上で合成された。この鎖伸張は、特定の保護基を使用するFMOC(フルオロメチルオキシカルボニル)-ストラテジーを用いて行った。この合成の最後に、保護基の切断が、95%トリフルオロ酢酸(TFA)、3%トリイソプロピルシラン、および合成されたペプチド長さに応じて2~5%のエタンジチオールを含有する切断溶液を用いて行われた。樹脂を除去し、反応混合液を濃縮し、かつヘプタンを添加した。濃縮後、残余の油分をジエチルエーテルで消化(digest)した。この粗ペプチドを除去し、かつ酢酸中で凍結乾燥した。粗ペプチドの精製のために、分取HPLC-システム(高速液体クロマトグラフィー)を行った。全てのペプチドを、アセトニトリルを溶媒とするTFAおよび水の直線勾配を用いて、シリカゲルカラム上で

精製した。溶離したペプチドを濃縮して凍結乾燥した。

【0018】

驚くべきことに、先に説明された組換えおよび合成Vpr産物とは対照的に、本発明に従い作製された説明された精製プロトコールに従ったsVpr-ペプチドは、mM濃度であってさえも、非常に良好に水中に溶解し、かつ何らタンパク質凝集およびタンパク質沈殿の徴候を示すことなく安定しつづけた。

【0019】

ペプチドsVpr¹⁻⁹⁶は、折りたたみ構造をとり、免疫学的に反応性でありまた天然のウイルス性Vprと同等の生体活性を有することが示された。

【0020】

最初に、ウイルス単離体 HIV-1_{NL4-3}のアミノ酸配列を有する、Vpr-タンパク質およびその断片の化学合成が説明される。本明細書の範囲内の用語「合成(複数)Vpr-ペプチド」は、分子ウイルス単離体HIV-1_{NL4-3}に由来したVpr遺伝子によりコードされた天然のVpr-タンパク質の標準アミノ酸配列を含む固相ペプチド合成により合成されたペプチドを意味している。

【0021】

本発明の本質は、既に公知の特徴(出発材料、合成樹脂、ペプチド合成装置)と、新規の解決法、これらの化合物の最初の化学合成、合成ストラテジー、特定の保護基、本発明のトリフルオロ酢酸-トリイソプロピルシラン-エタンジチオール樹脂切断、ペプチド精製目的の溶媒の特定の勾配(TFA-水- : TFA-アセトニトリル)の適用との組合せの範疇中にあり、これらは相互に影響し、かつ使用および望ましい成功において有利にそれら全体の作用を生じ、このことが合成sVpr-ペプチドが現在利用できることをもたらしている。

【0022】

本発明に従い合成されたペプチドは、以下の独自性により特徴付けられる。

【0023】

これらは、mM濃度範囲程高い初回ペプチド濃縮を可能にする水性システム中に極めて易溶性である。これは次に、NMR(核磁気共鳴)スペクトルおよびX線結晶回析を用いるその後の構造解析のために必ず前もって必要なものである。

【0024】

本ペプチドは、経済的に妥当な条件下で、mg量で生成することができ、かつ最高水準で精製することができる。該ペプチドの生物学的特徴および免疫学的反応性は、天然のウイルス性Vprタンパク質のものと同じである。このペプチドは、基本的研究の様々な適用に加え、HIVウイルス学分野の応用研究に使用することができる。

【0025】

本発明のペプチドは、生物学的アッセイにおいて、Vprおよびそのドメインの構造解析において、HIVペプチド配列に対する抗体産生のため、抗ウイルス試薬において、可能性のあるVpr阻害剤のスクリーニングの試験システムの形成のため、細胞培養物および動物モデルの確立のため、HIV病理学におけるVprの機序の研究のため、HIVのインビトロ集合のため、遺伝子治療における新規ベクターの作出のため、および血清学的アッセイの開発のため、特にVpr捕獲ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)において使用される。

【0026】

本発明に従い生成された産物は、NMRスペクトルおよびCDスペクトルに加え、X線結晶回析を用いる、Vprの分子構造の決定に使用することができる。これらの構造情報は次に、HIV複製サイクルにおけるVprタンパク質の分子機序およびAIDS関連疾患の病理学的機序におけるそれらの役割を理解する上で不可欠である。更に、これらの生成物は、可能性のあるVpr阻害剤に加え、Vpr特異抗体の生成および特徴決定を研究するための高処理の量インビトロ試験システム、ならびに血清学的試験システムの開発および設計に使用することができる。

【0027】

本発明は、ペプチド化学、ウイルス学の基本的研究、構造解析、および医学的診断の領域において使用されるであろう。本発明は、Vprに特異的なポリおよびモノクローナル抗体の作製、特にエピトープの異なるVpr特異抗体の作製に使用することができる。適用の別の領域は以下のものである：血清学的試験システム、特にVpr-Ag ELISA -技法の検量のための標準抗原としてのVpr抗原(Ag)ELISA、HIV感染した個体の血液検体中のウイルス性Vprの検出および定量のため、Vpr阻害

剤を特徴づける試験システムのため、Vpr-欠損HIV変異体により感染した培養細胞中の内因性ウイルス性Vprの機能の補完のため、ヒトリンパ球培養物中のウイルス性Vprの機能の補完のため、およびVpr-欠損HIV変異体により感染した分化されたヒト単球/マクロファージ培養物中のウイルス性Vprの機能の補完のため。

【0028】

本発明は、以下の試薬を特徴付けるために使用することができる：

- a) Vprと、細胞因子、例えば糖質コルチコイド受容体、転写因子並びに他のDNAと相互作用する酵素および因子との相互作用を阻害する試薬；
- b) Vprの転写活性化機能、およびステロイドホルモンに対するVprの活性を調節または阻害する試薬；
- c) 単独で、またはHIV前融合複合体の成分と一緒にVprの輸送、およびHIV集合時のピリオンの出芽へのVpr組込みを調節または阻害する試薬；
- d) Vprが誘導した細胞周期停止、ならびに細胞分化および細胞増殖に対するVprの作用を調節または阻害する試薬；
- e) Vprの細胞傷害性作用を調節または阻害する試薬
- f) Vprイオンチャネル活性を調節または阻害する試薬。

更に、本発明は、Vpr阻害剤の特徴付けのためのインビボ試験システムおよび動物試験の開発および設計に適用することができる。別の利点は、最初に本発明によりVpr濃縮液を、Vpr特異的阻害剤の設計において必要な分子、構造および機能の分析のために作製する。別の本発明の適用は、Vprに結合するDNA修復酵素HHR23AのUBA2ドメイン、Vpr特異的免疫グロブリンのFab断片、ウイルス因子、特にウイルス集合時にVprと相互作用するHIV-1 Gag ポリタンパク質前駆体Pr55^{Gag}の成分、またはヒト糖質コルチコイド受容体またはその成分のような構造安定化因子を用いる、VprのN末端の柔軟性の低下である。本発明は、レトロウイルス前融合複合体のインビトロ集合、遺伝子導入のインビトロおよび/またはインビボ適用法の開発、DNAトランスフェクション、染色体性またはエピソーム性宿主DNAへの組込み、または遺伝子治療での適用を目的とした細胞、組織または完全な生物への遺伝子導入の他の方法に関する研究を支えている。

【0029】

以下実施例は、本発明の説明のために利用し、これを限定するものではない。

【0030】

実施例

実施例1

Vpr-ペプチドの合成-一般的プロトコール

C末端Vpr-ペプチドの合成を、ABI 433A合成装置(Perkin Elmer社)において、Fa. Rapp Polymere社(チュービンゲン、独国)から提供されたセリン-樹脂を用いて行った。全てのN末端Vprペプチドは、Fa. Rapp Polymere社(チュービンゲン、独国)から提供された「TentaGel R-RAM-樹脂」である、ポリスチレン-ポリオキシエチレン-樹脂上で合成した。ペプチド合成は、以下の保護基を用い、FMOC(フルオロメチルオキシカルボニル)法を用いて行った；グルタミン酸およびアスパラギン酸についてO-tブチルエステル、セリン、チロシンおよびトレオニンについてOtBu-エーテル、リシンおよびトリプトファンについてBoc (tert-ブトキシカルボニル-)、ヒスチジン、グルタミンおよびアスパラギンについてTrt(トリチル-トリフェニルメチル-)、ならびにアルギニンについてPbf (2,2,4,6,7-ペンタメチル-ジヒドロベンゾフラン-S-スルホニル-)。合成終了後、保護基の切断を、95%トリフルオロ酢酸、3%トリイソプロピルシラン、および具体的なペプチド配列に依存する2%~5%のエタンジチオールからなる混合物を用いて行った。この樹脂を取り除き、反応混合物を濃縮し、かつヘプタンを添加した。濃縮後、残りの油分を、ジエチルエーテルで消化した。この粗ペプチドを回収し、10%酢酸中で凍結乾燥した。

【0031】

実施例2

ペプチド精製-一般的プロトコール

粗ペプチド100mgを、分取HPLCで、島津社LC-8システムを用いて行った。全てのペプチドを、シリカゲルのカラムを含むカラム(300×400 mm Vydac-RP18 Saul e、粒度15 μM~20 μM)上で精製した。水中の1%TFA(トリフルオロ酢酸)、80%アセトニトリル中の0.1%TFA中の直線勾配を、流量100 ml/分で流した。溶離したペプチドを濃縮し、かつ凍結乾燥した。

【0032】

実施例3sVpr¹⁻⁹⁶

本ペプチドは、TentaGel S-AC-樹脂(0.20 mmol/g)において、ABI 433合成装置を用いて合成した。合成過程終了後、Fmoc-保護基を切断し、樹脂を最初にジメチルホルムアミドおよび塩化メチレンで洗浄し、その後乾燥した。このペプチドを樹脂から取り除き、前述のように精製した。

分子量： 計算値： 11378 実測値： 11381

H - Met - Glu - Gln - Ala - Pro - Glu - Asp - Gln - Gly - Pro - Gln - Arg - Glu - Pro - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe - Pro - Arg - Ile - Trp - Leu - His - Asn - Leu - Gly - Gln - His - Ile - Tyr - Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala - Gly - Val - Glu - Ala - Ile - Ile - Arg - Ile - Leu - Gln - Gln - Leu - Leu - Phe - Ile - His - Phe - Arg - Ile - Gly - Cys - Arg - His - Ser - Arg - Ile - Gly - Val - Thr - Arg - Gln - Arg - Arg - Ala - Arg - Asn - Gly - Ala - Ser - Arg - Ser - OH

- 図 1: sVpr¹⁻⁹⁶ - SDS-PAGEにおいて直接分離 (A)
 SDS-PAGEの前に免疫沈降 (B)
 図 2: sVpr¹⁻⁹⁶ - 粗HPLCクロマトグラムの調整用の精製
 図 3: sVpr¹⁻⁹⁶ - 質量分析 (% int. 及び分子量)

【0033】

実施例4:sVpr¹⁻⁴⁷

実施例1～実施例3に類似。

分子量： 計算値： 5728 実測値： 5728.8

H - Met - Glu - Gln - Ala - Pro - Glu - Asp - Gln - Gly - Pro - Gln - Arg - Glu - Pro - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe - Pro - Arg - Ile - Trp - Leu - His - Asn - Leu - Gly - Gln - His - Ile - Tyr - NH₂

- 図 4: sVpr¹⁻⁴⁷ - 質量分析 (% int. 及び分子量)

【0034】

実施例5:sVpr⁴⁸⁻⁹⁶

実施例1～実施例3に類似。

Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala - Gly - Val - Glu - Ala - Ile - Ile - Arg -
 Ile - Leu - Gln - Gln - Leu - Leu - Phe - Ile - His - Phe - Arg - Ile - Gly - Cys - Arg -
 His - Ser - Arg - Ile - Gly - Val - Thr - Arg - Gln - Arg - Arg - Ala - Arg - Asn - Gly -
 Ala - Ser - Arg - Ser - OH

【0035】

実施例6：

sVpr¹⁻²⁰

実施例1～実施例3に類似。

H - Met - Glu - Gln - Ala - Pro - Glu - Asp - Gln - Gly - Pro - Gln - Arg - Glu - Pro -
 Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - NH₂

図5: sVpr¹⁻²⁰ - 質量分析 (% int. 及び分子量) (%Int. 10%
 =111 mV[和 = 9505 mV].

【0036】

実施例7：

sVpr¹⁻²⁰ (Asn^{5,10,14})

実施例1～実施例3に類似。

in analogy to examples 1 to 3.

H - Met - Glu - Gln - Ala - Pro - Glu - Asp - Gln - Gly - Pro - Gln - Arg - Glu - Pro -
 Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - NH₂

【0037】

実施例8：

sVpr²¹⁻⁴⁰

実施例1～実施例3に類似。

野生型配列：

H - Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe -
 Asn - Arg - Ile - Trp - Leu - His - NH₂

図6: sVpr²¹⁻⁴⁰ - 質量分析 (%Int. 10% =335 mV[和 = 28541 mV])

【0038】

実施例9：

sVpr²¹⁻⁴⁰ (Asn³⁵)

実施例1～実施例3に類似。

H - Glu - Leu - Leu - Glu - Glu - Leu - Lys - Ser - Glu - Ala - Val - Arg - His - Phe -
Asn - Arg - Ile - Trp - Leu - His - NH₂

【0039】

実施例10：

sVpr¹¹⁻²⁵

実施例1～実施例3に類似。

H - Gln - Arg - Glu - Pro - Tyr - Asn - Glu - Trp - Thr - Leu - Glu - Leu - Leu - Glu -
Glu - NH₂

【0040】

実施例11：

sVpr⁴¹⁻⁵⁵

実施例1～実施例3に類似。

H - Asn - Leu - Gly - Gln - His - Ile - Tyr - Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp -
Ala - NH₂

【0041】

実施例12：

sVpr⁴⁶⁻⁶⁰

実施例1～実施例3に類似。

H - Ile - Tyr - Glu - Thr - Tyr - Gly - Asp - Thr - Trp - Ala - Gly - Val - Glu - Ala - Ile
- NH₂

【0042】

実施例13：

sVpr⁵⁶⁻⁷⁰

実施例1～実施例3に類似。

H - Gly - Val - Glu - Ala - Ile - Ile - Arg - Ile - Leu - Gln - Gln - Leu - Leu - Phe - Ile - NH₂

【 0 0 4 3 】

実施例14 :

sVpr⁶⁶⁻⁸⁰

実施例1 ~ 実施例3に類似。

H - Gln - Leu - Leu - Phe - Ile - His - Phe - Arg - Ile - Gly - Cys - Arg - His - Ser - Arg - NH₂

【 0 0 4 4 】

実施例15 :

sVpr⁷⁶⁻⁹⁶

実施例1 ~ 実施例3に類似。

H-Cys - Arg - His - Ser - Arg - Ile - Gly - Val - Thr - Arg - Gln - Arg - Arg - Ala - Arg - Asn - Gly - Ala - Ser - Arg - Ser - OH

【 0 0 4 5 】

文献 :

- Adachi, A.; Gendelman, H. E.; König, S.; Folks, T.; Willey, R. L.; Rabson, A.; Martin, M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and non-human cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59:284-291.
- Arunagiri, C.; Macreadie, I.; Hewish, D.; Azad, A. (1997) A C-terminal domain of HIV-1 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of human CD4⁺ lymphocytes. *Apoptosis* 2:69-76.
- Collman, J.W.; Balliet, J.W.; Greory, S.A.; Friedman, H.; Kolson, D.L.; Nathanson, N.; Srinivasan, A. (1992) An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 66:5717-5721.
- Di Marzio, P.; Choe, S.; Ebright, M.; Knoblauch, R.; Landau, N.R. (1995) Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 69:7909-7916.
- Kondo, E.; Göttinger, H.G. (1996) A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6^{gag} required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 70:159-164.

- Kondo, E.; Mammano, F.; Cohen, E.A.; Göttinger, H.G. (1995) The p6^{gag} domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J. Virol.* 69:2759-2764.
- Lavallée, C.; Yao, X.J.; Ladha, A.; Göttinger, H.G.; Haseltine, W.A.; Cohen, E.A. (1994) Requirement of the Pr55^{gag} precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J. Virol.* 68:1926-1934.
- Levy, D.N.; Refaeli, Y.; Weiner, D.B. (1995) Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10873-10877.
- Lu, Y.-L.; Bennett, R.P.; Wills, J.W.; Gorelick, R.; Ratner, L. (1995) A leucine triplet repeat sequence (LXX)₄ in p6^{gag} is important for Vpr incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 69:6873-6879.
- Luo, Z.; Butcher, D.J.; Murali, R.; Srinivasan, A.; Huang, Z. (1998) Structural studies of synthetic peptide fragments derived from the HIV-1 Vpr protein. *Biochem. Biophys. Research Communications* 244:732-736.
- Macreadie, I.G.; Arunagiri, C.K.; Hewish, D.R.; White, J.F.; Azad, A.A. (1996) Extracellular addition of a domain of HIV-1 Vpr containing the amino acid sequence motif H(S/F)RIG causes cell membrane permeabilization and death. *Mol. Microbiol.* 19:1185-1192.
- Macreadie, I.G.; Kirkpatrick, A.; Strike, P.M.; Azad, A.A. (1997) Cytocidal activities of HIV-1 Vpr and SAC1P peptides bioassayed in yeast. *Protein and Peptide Letters* 4:181-186.
- Mahalingam, S.; Ayyavoo, V.; Patel, M.; Kieber-Emmons, T.; Weiner, D.B. (1997) Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 71:6339-6347.
- Mahalingam, S.; Collman, R.G.; Patel, M.; Monken, C.E.; Srinivasan, A. (1995a) Functional analysis of HIV-1 Vpr: Identification of determinants essential for subcellular localization. *J. Virol.* 69:331-339.
- Mahalingam, S.; Khan, S.H.; Jabbar, M.A.; Monken, C.E.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995b) Identification of residues in the N-terminal acidic domain of HIV-1 Vpr essential for virion incorporation. *J. Virol.* 69:297-302.
- Mahalingam, S.; Khan, S.H.; Murali, R.; Jabbar, M.A.; Monken, C.E.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995c) Mutagenesis of the putative alpha-helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3794-3798.
- Mahalingam, S.; Patel, M.; Collman, R.G.; Srinivasan, A. (1995d) The carboxy-terminal domain

- is essential for stability and not for virion incorporation of HIV-1 Vpr into virus particles. *Virology* 214:647-652.
- Nie, Z.; Bergeron, D.; Subbramanian, R.A.; Yao, X.-J.; Checroune, F.; Rougeau, N.; Cohen, E.A. (1998) The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J. Virol.* 73:4104-4115.
- Paxton, W.; Connor, R.I.; Landau, N.R. (1993) Incorporation of vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J. Virol.* 67:7229-7237.
- Piller, S.C.; Ewart, G.D.; Premkumar, A.; Cox, G.B.; Gage, P.W. (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:111-115.
- Roques, B.P.; Morellet, N.; de Rocquigny, H.; Déméné, H.; Schueler, W.; Jullian, N. (1997) Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7. *Biochimie* 79:673-680.
- de Rocquigny, H.; Petitjean, P.; Tanchou, V.; Decimo, D.; Drouot, L.; Delaunay, T.; Darlix, J.-L.; Roques, B.P. (1997) The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr. *J. Biol. Chem.* 272(49): 30753-30759.
- Wang, B.; Ge, Y.C.; Palasanthiran, P.; Xiang, S.-H.; Ziegler, J.; Dwyer, D.E.; Randle, C.; Downton, D.; Cunningham, A.; Saksena, N.K. (1996) Gene defects clustered at the C-terminus of the *vpr* gene of HIV-1 in long-term nonprogressing mother and child pair: *in vivo* evolution of *vpr* quasispecies in blood and plasma. *Virology* 223:224-232.
- Wang, L.; Mukherjee, S.; Narayan, O.; Zhao, L.-J. (1996) Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 178:7-13.
- Yao, S.; Azad, A.A.; Macreadie, I.G.; Norton, R.S. (1998) Helical structure of polypeptides from the C-terminal half of HIV-1 Vpr. *Protein and Peptide Letters* 5:127-134.
- Yao, X.-J.; Subbramanian, R.A.; Rougeau, N.; Boisvert, F.; Bergeron, D.; Cohen, E.A. (1995) Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol.* 69:7032-7044.
- Zhao, L.J.; Mukherjee, S.; Narayan, O. (1994a) Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: specific interaction with a cellular protein. *J. Biol. Chem.* 269:15577-15582.
- Zhao, L.J.; Wang, L.; Mukherjee, S.; Narayan, O. (1994b) Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: oligomerization by the N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 269:32131-32137.

Zhao, Y.; Cao, J.; O'Gorman, M.R.; Yu, M.; Yagev, R. (1996) Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (vpr) gene expression on basic cellular function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Virol. 70:5821-5826.

【図面の簡単な説明】

【図1】 Vprの構造とドメイン

以下の一次構造と二次構造のモチーフを、単離株HIV-1_{NL4-3}から得られたVprタンパク質のアミノ酸配列に対応するよう並べた。負電荷を帯びたN末（標識(1)、1~17番目）；ヘリックス -1（標識(2)、8~37番目）；未定領域（標識(3)、38~51番目）；ヘリックス -2（標識(4)、51~76番目）；正電荷を帯びたC末（標識(8)、77~96番目）。標識(1)~標識(5)および標識(8)と重複するが、以下のドメインを表示した：ロイシンおよびイソロイシンに富む領域で「ロイシンジッパー様」または「LRドメイン」と呼ばれる領域（標識(5)、60~80番目）；繰り返しモチーフ「HF/SRIG」を含む領域（標識(6)、71~82番目）；Vprのイオンチャンネル活性に必要とされるVpr膜貫通アンカーと推定される領域（標識(7)、52~79番目）。

【図2】 ウエスタンブロットおよび免疫沈降による、sVpr¹⁻⁹⁶に特異的なポリクローナル抗体の免疫学的特徴づけ

ウサギをsVpr¹⁻⁹⁶で免疫化し、その結果得られた血清R-96をウエスタンブロット（A）および免疫沈降（B）で調べた。sVpr¹⁻⁹⁶を0.01 ngから10 ngまで連続希釈して、別々にSDS-PAGE（12.5%アクリルアミドゲル）を行なった（A）。sVpr¹⁻⁹⁶を同じように連続希釈したものをヒト血清に加え、血清R-96を用いて、この混合物からsVpr¹⁻⁹⁶を免疫沈降によって回収し、その後、この免疫沈降物をSDS-PAGEで分離した（B）。sVpr¹⁻⁹⁶をPVDF膜に電気的に移行させてから、R-96を用い、その後¹²⁵I標識プロテインGを用いてペプチドを検出した。2日間感光させたオートラジオグラムを（A）および（B）に示す。分子量標準タンパク質の位置を左側に示し、免疫沈降に使用した免疫グロブリンの軽鎖（lc）および重鎖（hc）の位置を右側に示す。

【図3】 ヒトPBMC培養では、sVpr¹⁻⁹⁶はウイルス複製を活発にして、生細

胞の数を低下させる。PHAおよびIL-2で活性化させたPBMCに、以下のウイルス貯蔵液を感染量が等しくなるように感染させた。HIV-1_{NL4-3} (A、B、C)、NL4-3(A D8) (D)、およびvpr欠損変異株NL(AD8)-U_{DEL1} (E)、およびvpr-欠損変異株NL(AD8)-deltaR (E)。実験を行なっている間、培養は、10 nMのsVpr¹⁻⁹⁶または10 nMの対照用ペプチドVpr³²⁻⁸¹とともにインキュベートした。ウイルス放出は、細胞培養上清中に遊離されたウイルスに付随するRT活性のプロフィールとして示されている (A、C、D、E、F)。(B)は、実験(A)の培養液中で検出された生細胞数を示している。

【図4】 sVpr¹⁻⁹⁶は、異なったドナーから単離されたヒト単球/マクロファージの初代培養において、vpr欠損HIV-1変異株ウイルスの複製を活性化させる。3人のドナーから単離した分化MDMを平行培養したものに、マクロファージ指向性ウイルスNL4-3(AD8)およびvpr欠損変異株NL(AD8)-デルタRの精製ウイルス保存液を等感染量感染させた。ウイルス産生量を、2ヶ月間という時間枠で追跡し、ウイルスに付随するRT活性の放出を経過時間に対してプロットした。

【図5】 2D¹H TOCSYスペクトル

混合時間110分間で、300 ° Kで1:1 (v/v) TFE-d₂/H₂におけるsVpr¹⁻⁹⁶の2 mM溶液のスペクトルを記録した。x軸およびy軸は、それぞれの1D¹Hスペクトルを示している。図6に、領域A、BおよびCを拡大した図を示す。

【図6】 図5に示した2D TOCSYスペクトルの領域の拡大図であり、プロリンH-7とトリプトファン残基のH-2との間のプロトン相互作用 (A) ; ヒスチジン残基のH-2とH-4の間のプロトン相互作用 (B) ; およびアルギニン残基のイプシロン-Hとアルファ-Hの間のプロトン相互作用 (C) に対応する。

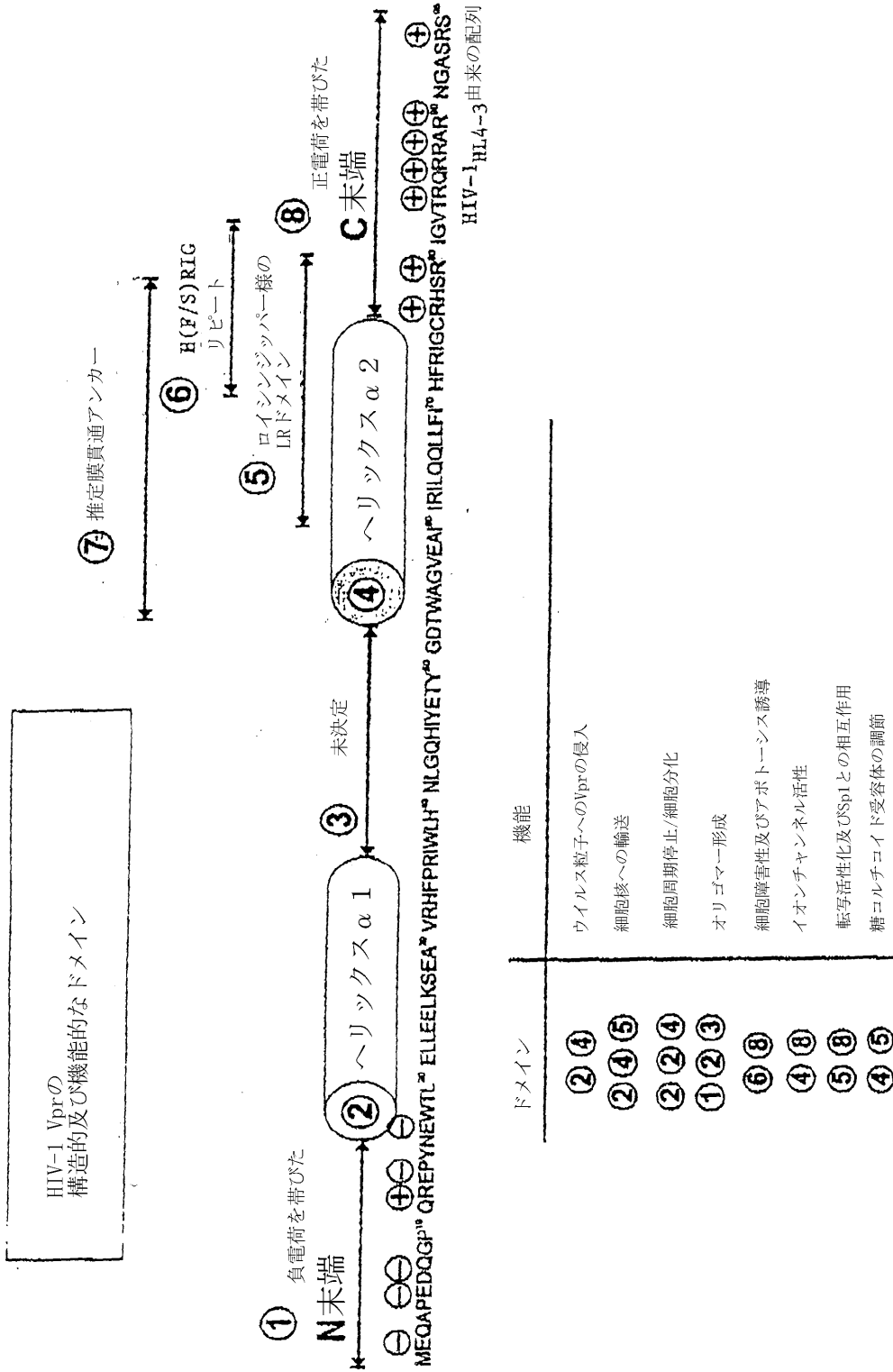
【図7】 sVpr¹⁻⁹⁶-HPLCクロマトグラムおよび質量スペクトル

【図8】 sVpr¹⁻⁴⁷-質量スペクトル

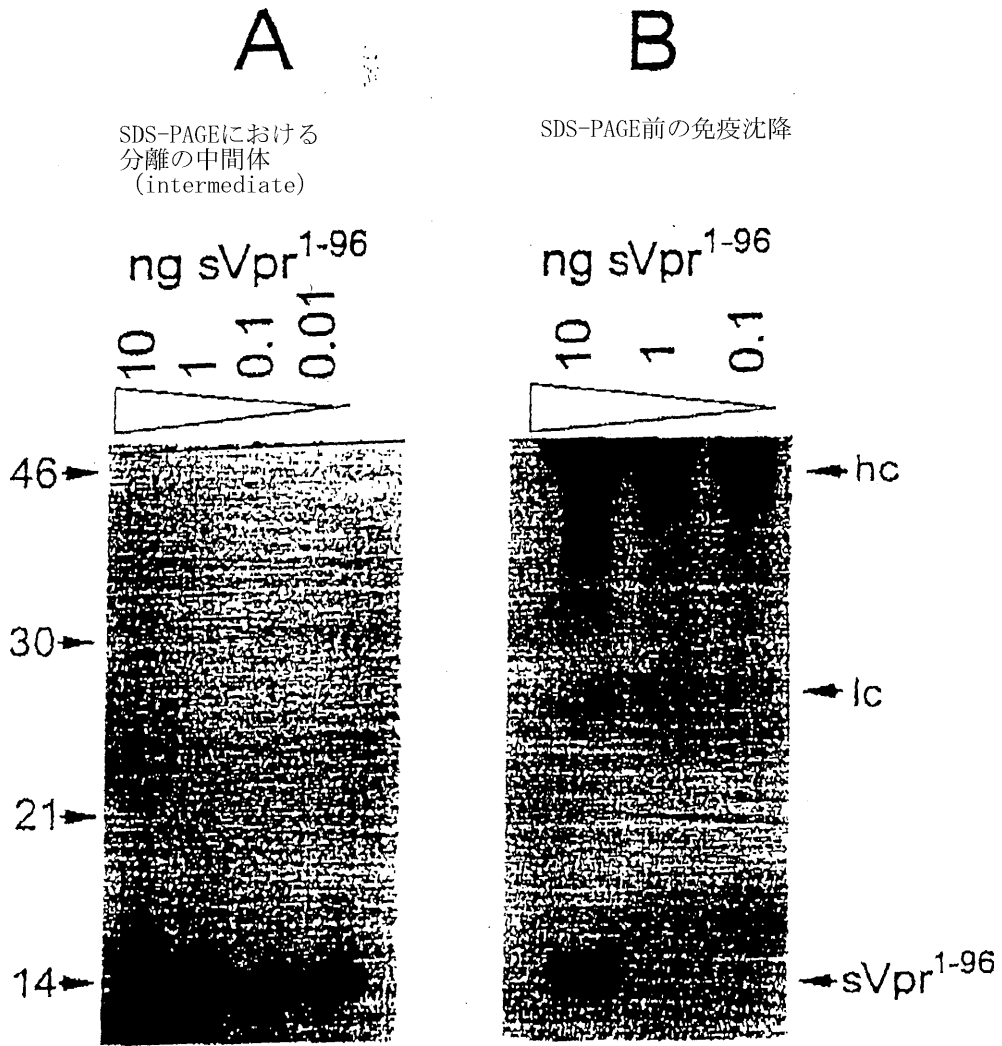
【図9】 sVpr¹⁻²⁰-質量スペクトル

【図10】 sVpr²⁰⁻⁴⁰-質量スペクトル

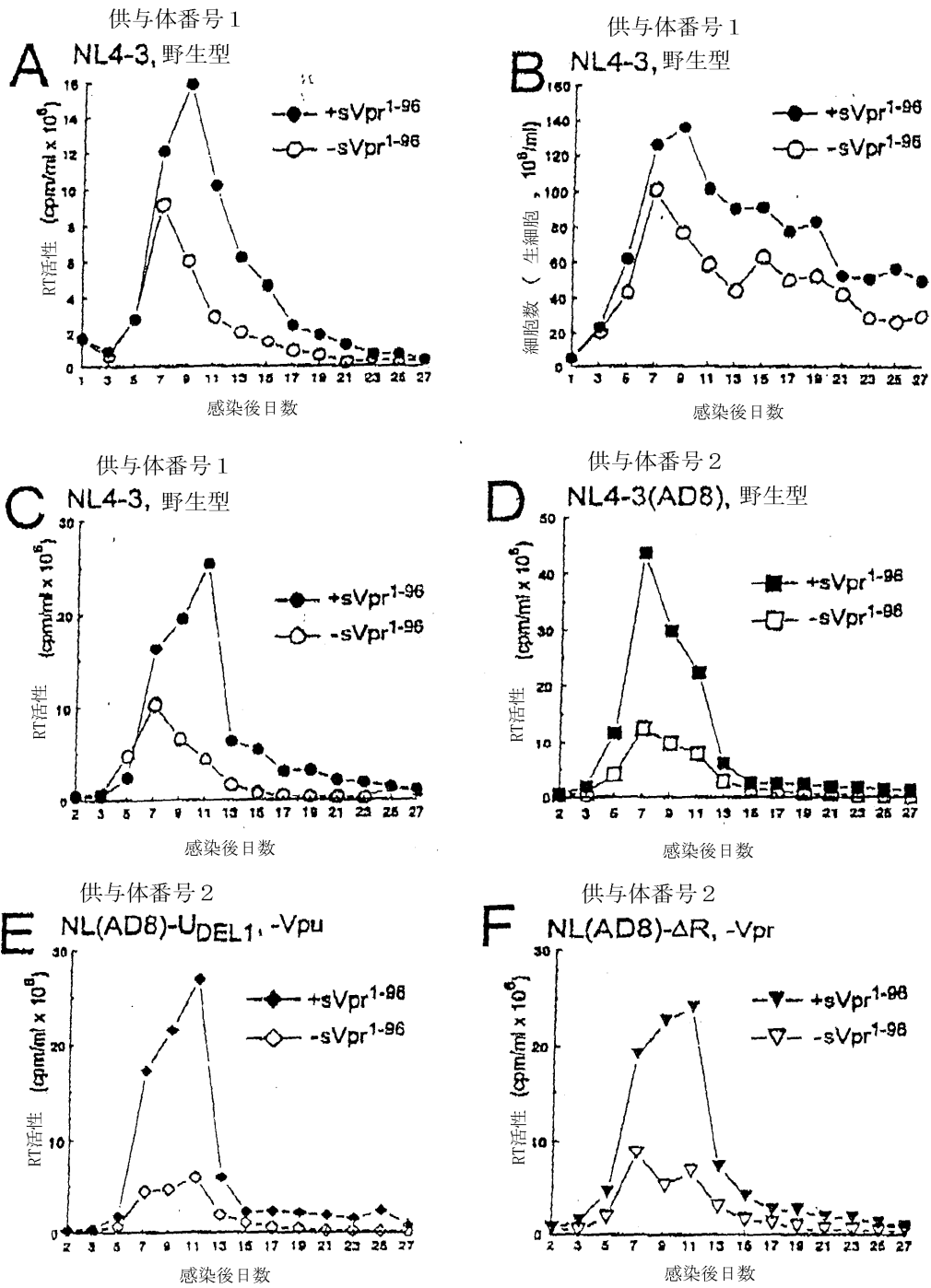
【図1】



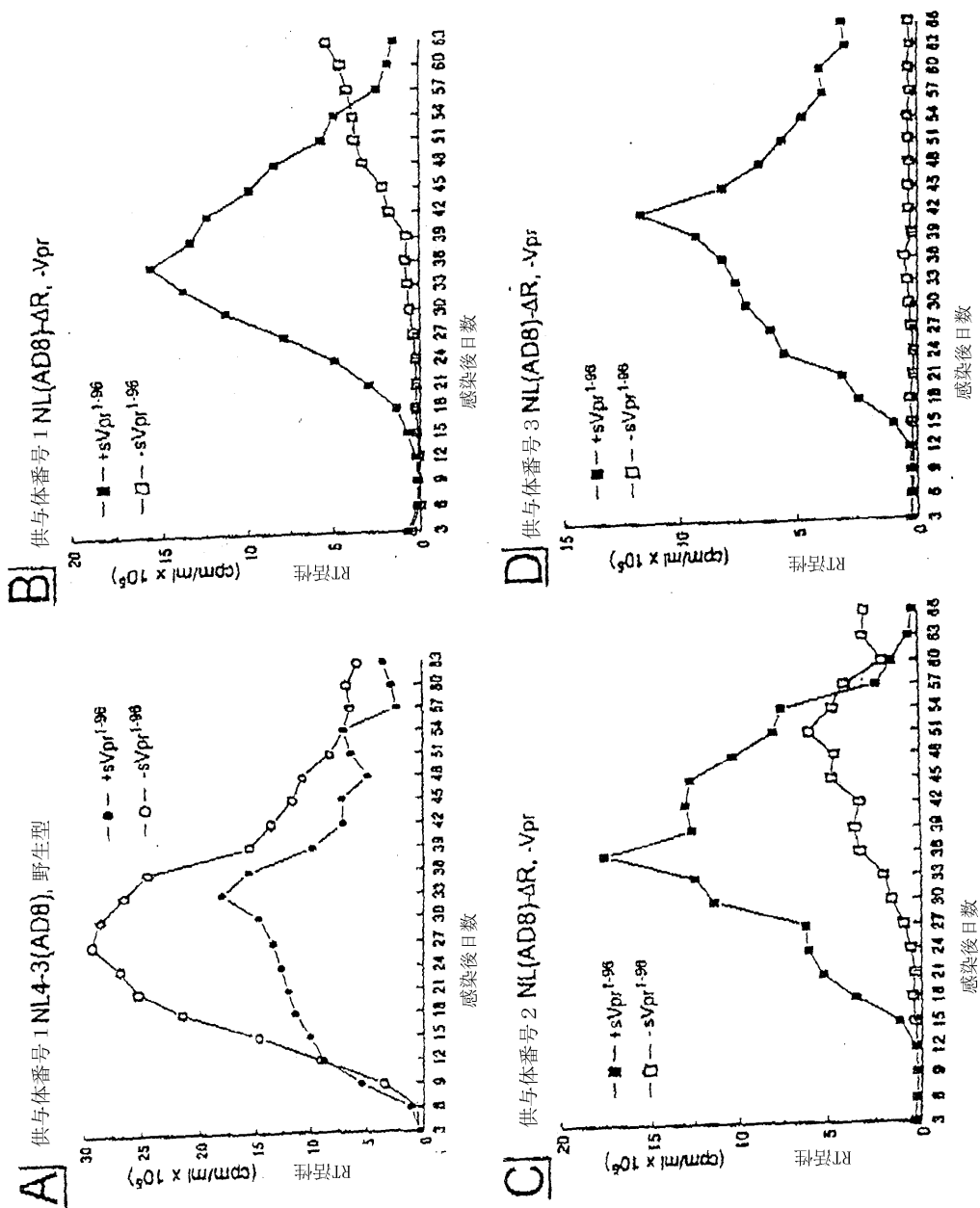
【図2】



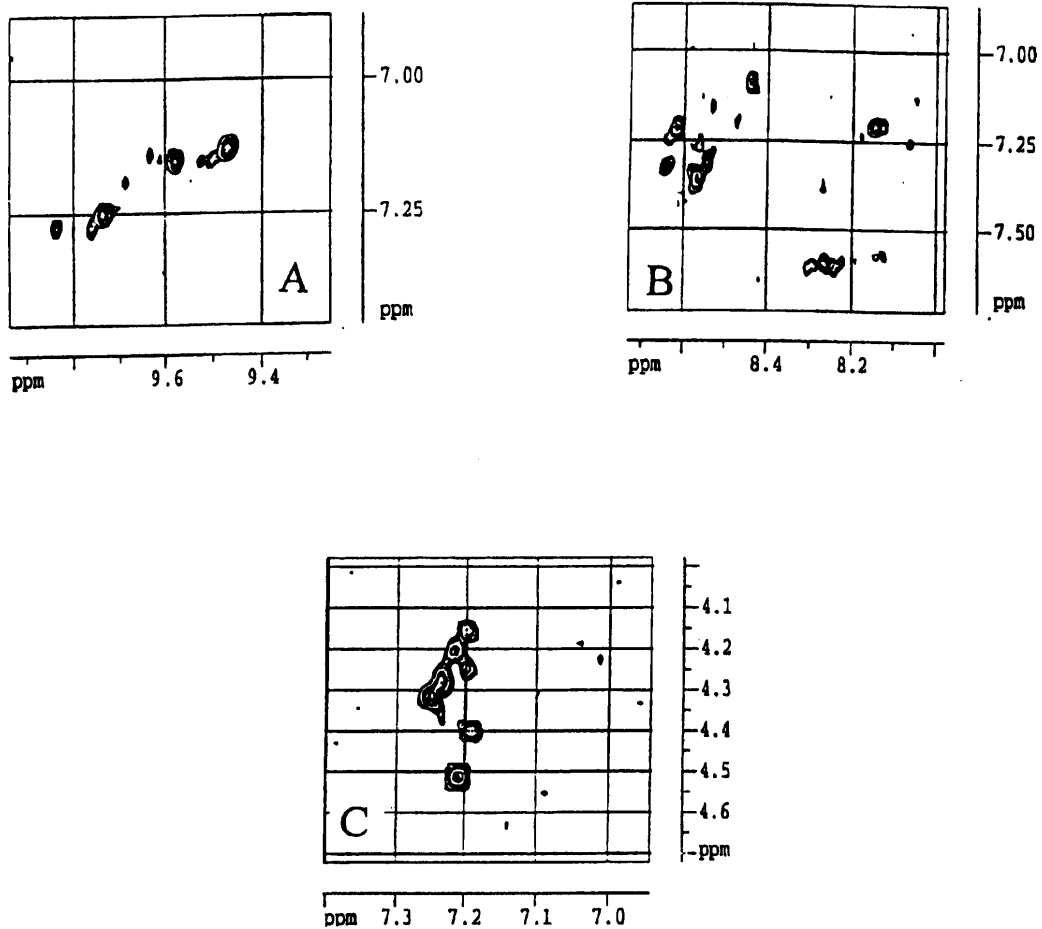
【図3】



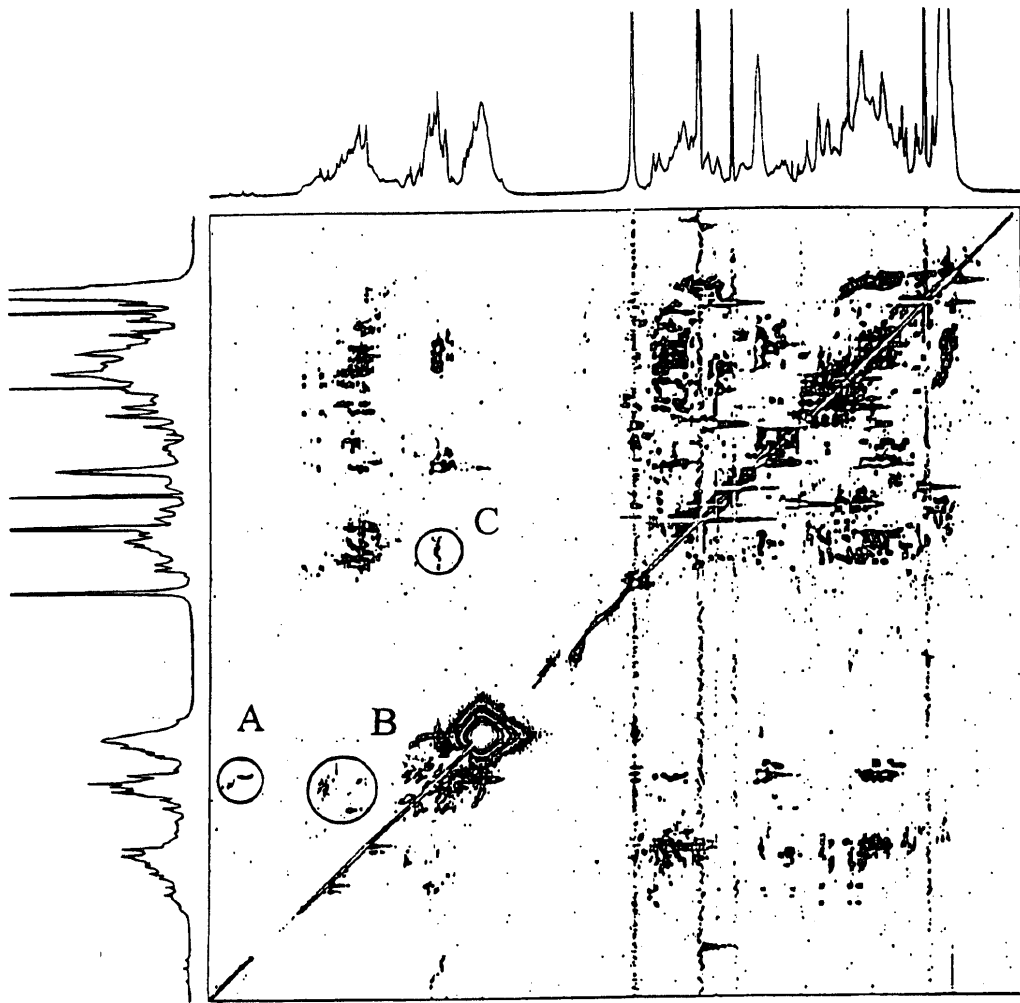
【図4】



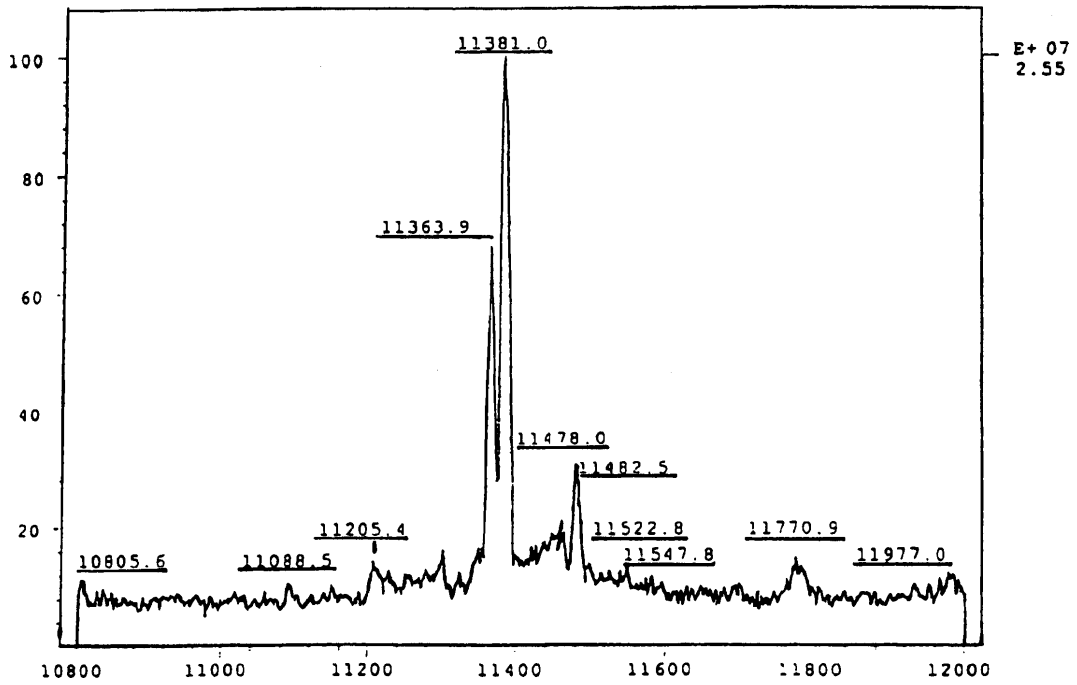
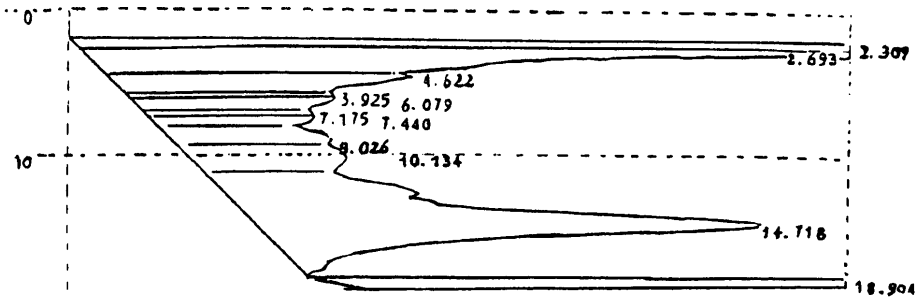
【図5】




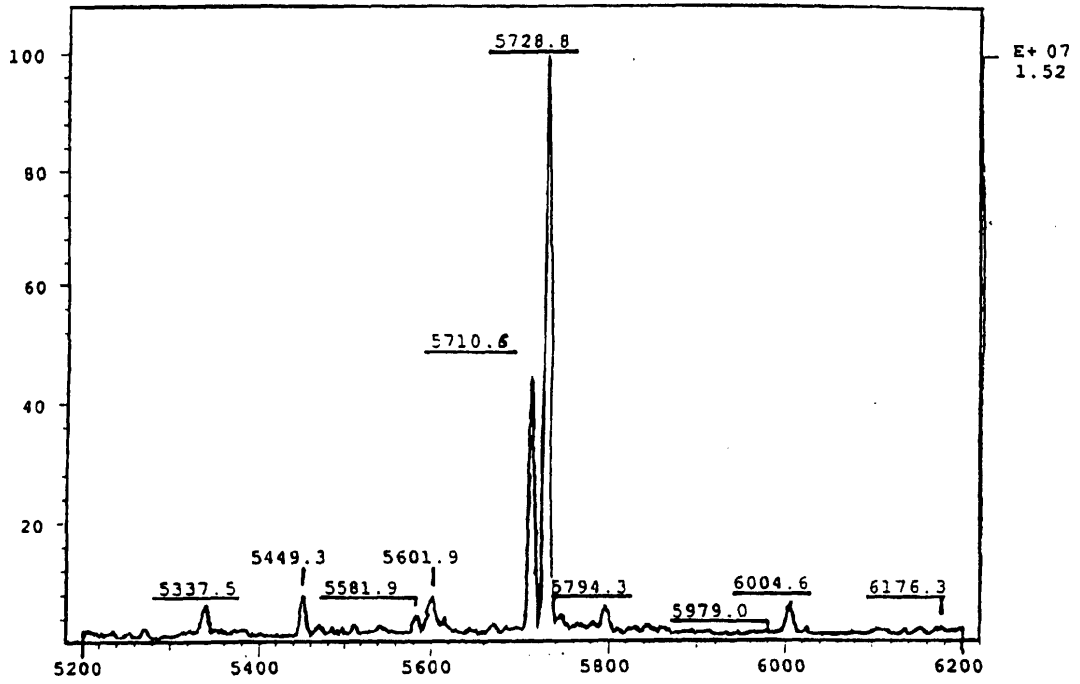
【図6】



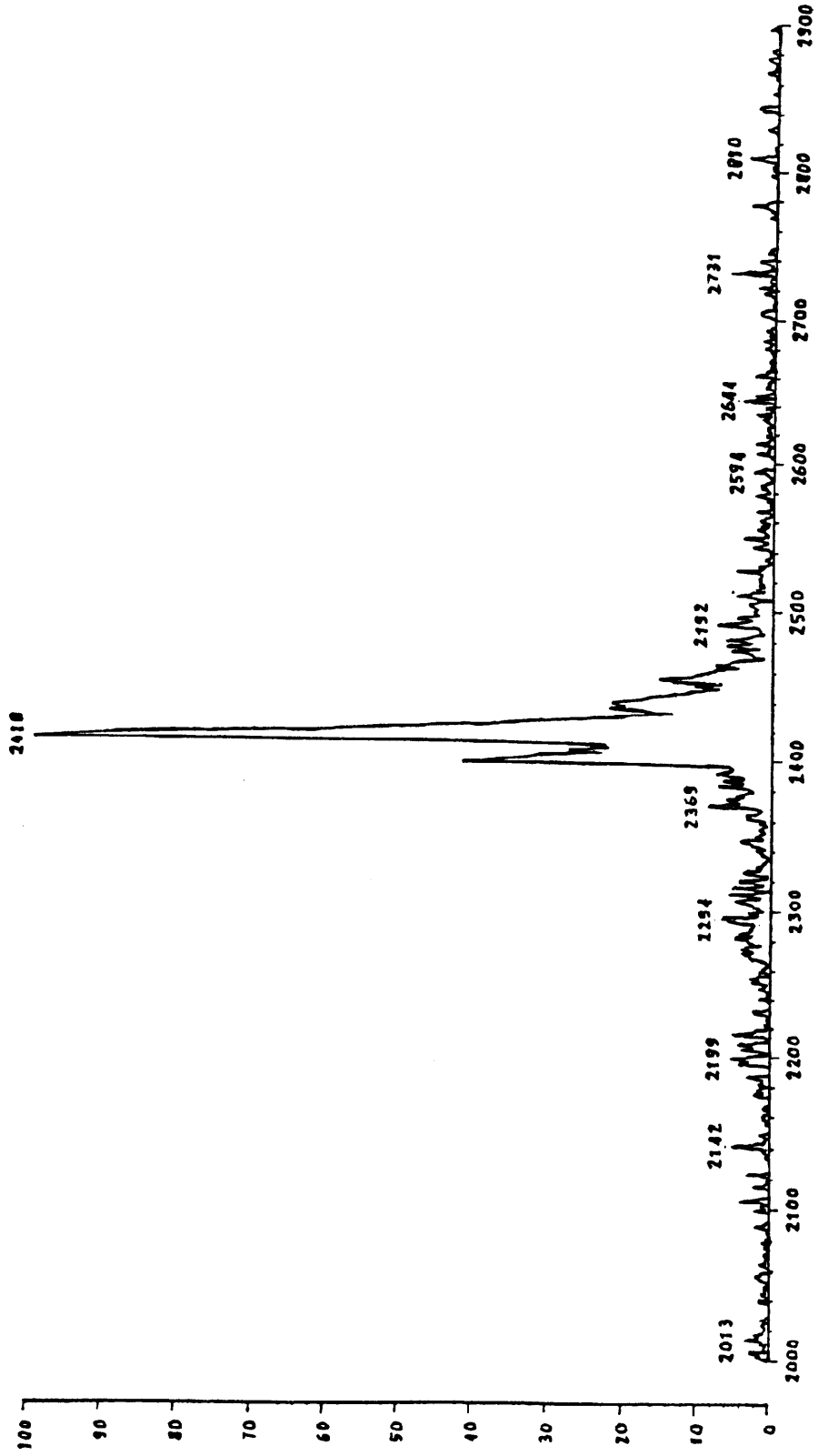
【図7】



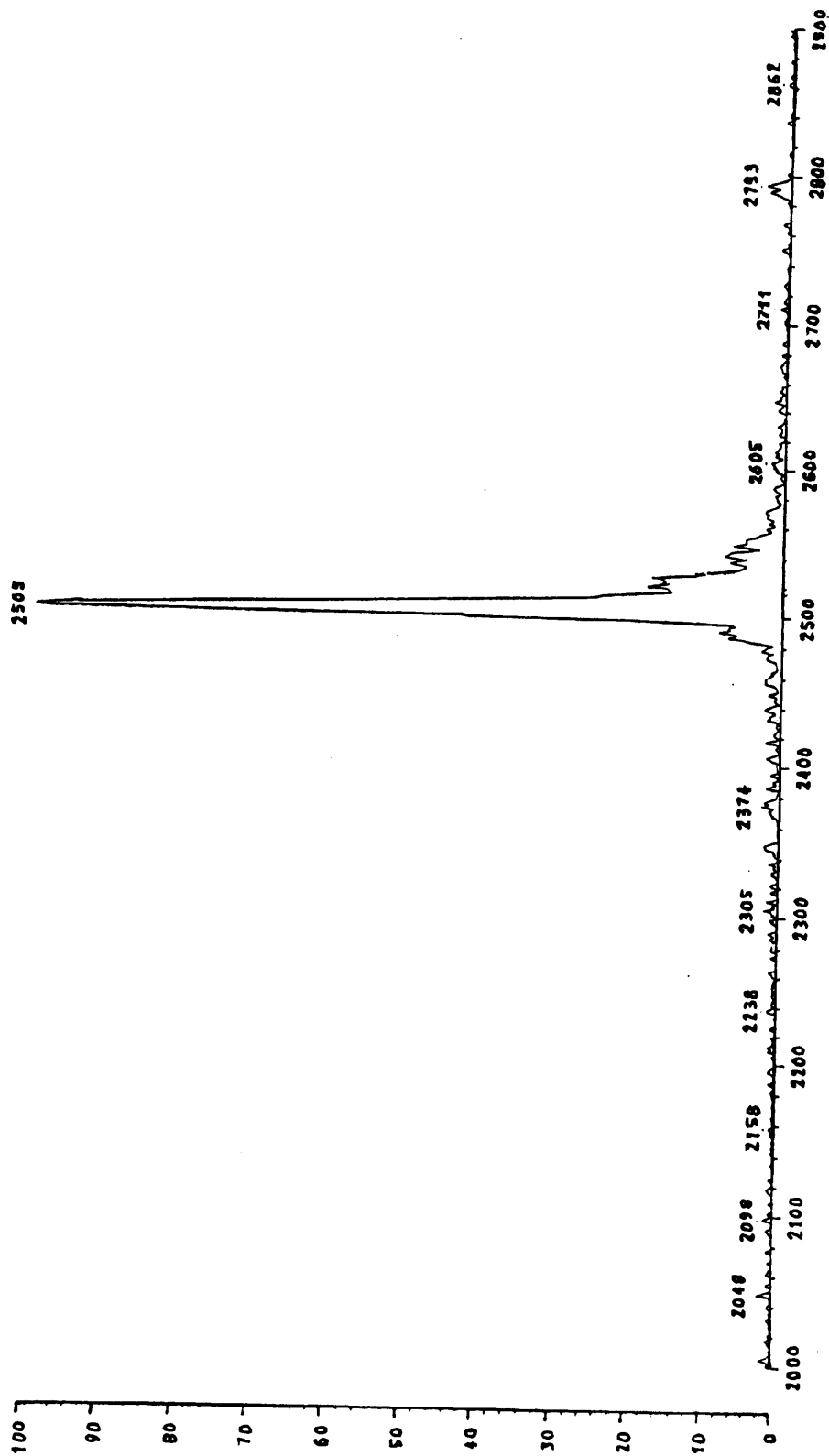
【 8】



【図9】



【図10】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int. Application No PCT/DE 00/00525
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/16 G01N33/68 C07K16/10 A61P31/18		
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) IPC 7 C07K G01N		
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 practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 44945 A (IMMUNE RESPONSE CORP INC) 15 October 1998 (1998-10-15) page 9, line 1 - line 4; claims 24-27 page 15, line 29 -page 16, line 9 ---	1,2,7,8, 10-12, 25,26
X	WO 95 26361 A (BIOMOLECULAR RES INST LTD ;AZAD AHMED A (AU); MACREADIE IAN G (AU)) 5 October 1995 (1995-10-05) page 3, line 1 - line 26 page 4, line 6 -page 5, line 10 page 6, line 16 - line 20; claims; example 6 ----- -/--	1,2,4,7, 8,12,16, 19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 another 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. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 August 2000		Date of mailing of the international search report 15/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fuhr, C

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 00/00525

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 5 February 1999 (1999-02-05) SCHULER W ET AL: "NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: Molecular insights into its biological functions." Database accession no. PREV199900140755 XP002145860 abstract & JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 285, no. 5, 5 February 1999 (1999-02-05), pages 2105-2117, ISSN: 0022-2836</p>	1,2
P,X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 1999 (1999-11) CORNILLE F ET AL: "Efficient solid-phase synthesis of Vpr from HIV-1 using low quantities of uniformly ¹³C-, ¹⁵N-labeled amino acids for NMR structural studies." Database accession no. PREV200000001193 XP002145861 abstract & JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH, vol. 54, no. 5, November 1999 (1999-11), pages 427-435, ISSN: 1397-002X</p>	1,2
P,X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; December 1999 (1999-12) WECKER K ET AL: "NMR structure of the (1-51) N-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr." Database accession no. PREV200000048307 XP002145862 abstract & EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 266, no. 2, December 1999 (1999-12), pages 359-369, ISSN: 0014-2956</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/00525

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Z. LUO ET AL.: "Structural Studies of Synthetic Peptide Fragments Derived from the HIV-1 Vpr Protein" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 244, no. 3, 27 March 1998 (1998-03-27), pages 732-736, XP002145859 ORLANDO, FL US page 734, right-hand column, paragraph 1; figure 1 -----	1,2,7,8

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members			International Application No PCT/DE 00/00525		
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9844945 A	15-10-1998	AU 7101798 A	30-10-1998		
WO 9526361 A	05-10-1995	AU 697620 B	15-10-1998		
		AU 2063495 A	17-10-1995		
		CA 2186398 A	05-10-1995		
		EP 0753006 A	15-01-1997		
		JP 9511395 T	18-11-1997		

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)	
A 6 1 K	39/395	A 6 1 P	31/18	4 C 0 8 7
	48/00	C 0 7 K	1/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P	31/18		1/06	
C 0 7 K	1/04		14/16	
	1/06		16/08	
	14/16	G 0 1 N	30/34	E
	16/08		30/88	J
G 0 1 N	30/34		33/15	Z
	30/88		33/50	Z
	33/15		33/53	D
	33/50		33/569	H
	33/53	C 1 2 P	21/08	
	33/569	C 1 2 N	15/00	Z N A A
// C 1 2 P	21/08	A 6 1 K	37/02	
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y ,			
	D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I			
	T , L U , M C , N L , P T , S E) , J P , U S			
(72)発明者	ヘンクライン ペーター			
	ドイツ国 ベルリン シュルゼ - ボイセン			
	- ストラッセ 25			
(72)発明者	レイ ビクトル			
	ドイツ国 ウォルフエンビュッテル エル			
	ピンガー ストラッセ 6			
F タ-ム(参考)	2G045 AA25 AA40 CA25 CA26 DA36			
	FB03 FB05			
	4B024 AA01 AA14 BA32 BA51 CA04			
	DA02 GA11 HA01 HA17			
	4B064 AG27 AG31 DA01 DA15			
	4C084 AA02 AA07 AA13 DC50 NA14			
	ZB332 ZC552			
	4C085 AA12 AA13 AA14 BA69 DD62			
	4C087 BC83 CA12 NA14 ZB33 ZC55			
	4H045 AA10 AA11 AA30 BA17 BA19			
	BA21 CA05 DA76 DA86 EA53			
	FA33 FA58 FA60 FA61 GA21			

专利名称(译)	人免疫缺陷病毒1型 (HIV-1) 病毒调节蛋白R (Vpr) 的合成肽及其应用		
公开(公告)号	JP2002540768A	公开(公告)日	2002-12-03
申请号	JP2000599775	申请日	2000-02-19
[标]申请(专利权)人(译)	舒伯特利希 恒彼得可人 雷维克多		
申请(专利权)人(译)	舒伯特利希 Henkeren彼得 雷维克多		
[标]发明人	シューベルトユーリッヒ ヘンクラインペーター レイビクトル		
发明人	シューベルト ユーリッヒ ヘンクライン ペーター レイ ビクトル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/12 A61K39/395 A61K47/48 A61K48/00 A61P31/18 C07K1/04 C07K1/06 C07K14/16 C07K16/08 C12N15/09 C12P21/08 G01N30/34 G01N30/88 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/005 A61K38/00 A61K47/6901 C12N2740/16322		
FI分类号	A61K35/76 A61K39/12 A61K39/395.D A61K39/395.S A61K48/00 A61P31/18 C07K1/04 C07K1/06 C07K14/16 C07K16/08 G01N30/34.E G01N30/88.J G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/569.H C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/DA01 4B064/DA15 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB332 4C084/ZC552 4C085/AA12 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA69 4C085/DD62 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB33 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA19 4H045/BA21 4H045/CA05 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA53 4H045/FA33 4H045/FA58 4H045/FA60 4H045/FA61 4H045/GA21		
优先权	19908752 1999-02-19 DE 19908766 1999-02-19 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种衍生自人免疫缺陷病毒1型 (HIV-1) 病毒调节蛋白R (Vpr) 的合成肽，特别是96个氨基酸的全长Vpr蛋白 (sVpr1-96) 47。氨基酸长度的N端 (sVpr1-47)，49个氨基酸长度的C端片段 (sVpr48-96)，这些片段 (sVpr1-20和sVpr21-40) 以及sVpr1-96 长约15个氨基酸。在针对Vpr及其结构域 (作为HIV-1调节蛋白的片段或全长产物) 的分子和结构特征以及用于开发针对Vpr肽序列的抗Vpr抗体的生物学分析中，可以使用这些产品。

