(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2005-503147
(P2005-503147A)
(43)公表日　平成17年2月3日(2005.2.3)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A61K 31/7088	A61K 31/7088		4B024
A61K 38/00	A61K 39/00	H	4B063
A61K 39/00	A61K 39/395	N	4B065
A61K 39/395	A61K 48/00		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 188 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-521255(P2003-521255)
(86)(22)出願日　平成14年8月21日(2002.8.21)
(85)翻訳文提出日　平成16年2月20日(2004.2.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/026543
(87)国際公開番号　WO2003/016333
(87)国際公開日　平成15年2月27日(2003.2.27)
(31)優先権主張番号　09/934,060
(32)優先日　平成13年8月21日(2001.8.21)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504067859
ユニバーシティー　オブ　メリーランド　バイオテクノロジー　インスティテュート
アメリカ合衆国，メリーランド州　２１２０２，バルチモア，７０１　イー．　プラット　ストリート，スイート　２００，オフィス　オブ　リサーチ　アドミニストレーション／テクノロジー　ディベロップメント
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸
(74)代理人　100080953
弁理士　田中　克郎
(74)代理人　100093861
弁理士　大賀　眞司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ウイルスコートタンパク質／受容体キメラおよび使用方法

(57)【要約】
本発明は、互いに相互作用し、コレセプターを結合する能力がある複合体を形成することができるウイルスコート配列および受容体配列を含むキメラ分子に関する。したがって、かかるキメラ分子は、受容体コートタンパク質複合体に特有の機能的特性を示し、細胞上に存在するコレセプターの占有による細胞のウイルス感染を抑制する物質として有用である。特定の態様において、キメラポリペプチドとしては、ＨＮ、ＳＮ、ＦＩＶ、ＦｅＬＶ、ＦＰＶ、およびヘルペスウイルスのウイルスなど、免疫不全ウイルスエンベロープポリペプチドが挙げられる。キメラポリペプチドにおける使用に適した受容体配列としては、例えば、ＣＤ４　ＤＩＤ２配列およびＣＤ４Ｍ９配列が挙げられる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ウイルスコートポリペプチド配列およびウイルス受容体ポリペプチド配列を含むキメラポリペプチドであって、前記コートポリペプチド配列および前記受容体ポリペプチド配列が、該コートポリペプチド配列と該ウイルス受容体ポリペプチド配列とを互いに結合させるのに十分な長さのアミノ酸スペーサーによって連結されている、キメラポリペプチド。
【請求項２】
前記キメラポリペプチドが、配列番号：１３、配列番号：２、配列番号：４、および配列番号：６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項１に記載のキメラポリペプチド。
【請求項３】
前記ウイルスコートポリペプチド配列が、配列番号：２４、配列番号：３０、および配列番号：２８からなる群から選択される、請求項１に記載のキメラポリペプチド。
【請求項４】
前記受容体ポリペプチド配列が、配列番号：２６および配列番号：２０からなる群から選択される、請求項３に記載のキメラポリペプチド。
【請求項５】
前記ウイルスが、ＨＩＶ、ＳＩＶ、ＦＩＶ、ＦｅＬＶ、ＦＰＶ、およびヘルペスウイルスからなる群から選択される免疫不全ウイルスである、請求項１に記載のキメラポリペプチド。
【請求項６】
前記ウイルスコートポリペプチドが、ｇｐ１２０ポリペプチド配列を含む、請求項１に記載のキメラポリペプチド。
【請求項７】
前記ｇｐ１２０ポリペプチド配列が、アミノ末端から６０個のアミノ酸と、カルボキシル末端から２０個のアミノ酸とを欠損している、請求項６に記載のキメラポリペプチド。
【請求項８】
前記受容体ポリペプチド配列が、ＣＤ４ポリペプチド配列である、請求項１に記載のキメラポリペプチド。
【請求項９】
ＣＤ４ポリペプチド配列が、Ｄ１ドメインおよびｄ２ドメインを含む、請求項１８に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１０】
前記スペーサーが、約５～約２００個のアミノ酸を有する、請求項１に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１１】
前記スペーサーがペプチド擬態配列（ｐｅｐｔｉｄｏｍｉｍｅｔｉｃ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）を含む、請求項１に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１２】
異種ドメインをさらに含む、請求項１に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１３】
前記異種ドメインが、標識、付着因子、および免疫増強剤からなる群から選択される、請求項１２に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１４】
前記異種ドメインが、配列番号：１１および配列番号：３２からなる群から選択される、請求項１２に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１５】
薬学的に許容可能な担体をさらに含む、請求項２に記載のキメラポリペプチド。
【請求項１６】
薬学的に許容可能な担体をさらに含む、請求項４に記載のキメラポリペプチド。

【請求項１７】
請求項１に記載のキメラポリペプチドをコードする核酸配列を含む、ポリヌクレオチド配列。
【請求項１８】
前記核酸配列が、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：５、および配列番号：１２からなる群から選択される、請求項１７に記載のポリヌクレオチド配列。
【請求項１９】
ウイルスコートポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号：２３、配列番号：２９、および配列番号：２７からなる群から選択される、請求項１７に記載のポリヌクレオチド配列。
【請求項２０】
前記受容体ポリペプチドをコードする核酸配列が、配列番号：２５および配列番号：１９からなる群から選択される、請求項１９に記載のポリヌクレオチド配列。
【請求項２１】
請求項１８に記載の発現ベクターを含有する宿主細胞。
【請求項２２】
請求項２０に記載の発現ベクターを含有する宿主細胞。
【請求項２３】
請求項１に記載のキメラポリペプチドに結合する抗体またはその機能的フラグメント。
【請求項２４】
請求項２に記載のキメラポリペプチドに結合する抗体またはその機能的フラグメント。
【請求項２５】
請求項４に記載のキメラポリペプチドに結合する抗体またはその機能フラグメント。
【請求項２６】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏでウイルスを中和する、請求項２３に記載の抗体。
【請求項２７】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏでウイルスを中和する、請求項２４に記載の抗体。
【請求項２８】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏでウイルスを中和する、請求項２５に記載の抗体。
【請求項２９】
ウイルス感染を阻害する、請求項２４に記載の抗体。
【請求項３０】
ウイルス感染を阻害する、請求項２５に記載の抗体。
【請求項３１】
ウイルスコートポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列との結合によって作られるエピトープに結合する、請求項２４に記載の抗体。
【請求項３２】
ウイルスコートポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列との結合によって作られるエピトープに結合する、請求項２５に記載の抗体。
【請求項３３】
前記エピトープが、エンベロープポリペプチド配列上に存在する、請求項３１に記載の抗体。
【請求項３４】
請求項１に記載のキメラポリペプチドに結合する抗体の製造方法であって、
請求項１に記載のキメラポリペプチドを、または請求項１に記載のキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、対象が請求項１に記載のキメラポリペプチドに対する抗体を産生するのに十分な量、対象に投与する工程を含む、方法。
【請求項３５】
請求項２に記載のキメラポリペプチドに結合する抗体の製造方法であって、
請求項２に記載のキメラポリペプチドを、または請求項２に記載のキメラポリペプチドを

コードするポリヌクレオチドを、対象が請求項２に記載のキメラポリペプチドに対する抗体を産生するのに十分な量、対象に投与する工程を含む、方法。
【請求項３６】
対象におけるウイルス感染の阻害方法であって、請求項４に記載のキメラポリペプチドの有効量を、または請求項４に記載のキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、対象に投与し、ウイルス・コレセプターポリペプチドを発現する細胞のウイルス感染を阻害し、それによってウイルス感染を阻害する工程を含む、方法。
【請求項３７】
前記ウイルスが免疫不全ウイルスである、請求項３５に記載の方法。
【請求項３８】
前記対象がヒトである、請求項３５に記載の方法。
【請求項３９】
対象における、ウイルスに対する免疫応答を生じさせるための方法であって、
請求項２に記載のキメラポリペプチドの有効量を、または請求項２に記載のキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを対象に投与し、ウイルスに対する免疫応答を産生する工程を含む、方法。
【請求項４０】
前記ウイルスが免疫不全ウイルスである、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記対象がヒトである、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
前記免疫応答が抗体を含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４３】
前記抗体がウイルスポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列との結合によって産生されるエピトープに結合する、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記抗体が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでウイルスを中和する、請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
ウイルスとウイルス・コレセプターとの間の相互作用を阻害する物質を同定するための方法であって、（ａ）被検物質の存在下および非存在下で、請求項２に記載のキメラポリペプチドとウイルス・コレセプターとを、該キメラポリペプチドと該コレセプターとが結合可能な条件で接触させる工程と、（ｂ）被検物質の存在下および非存在下での結合を検出する工程であって、被検物質の存在下での結合の低下を検出して、前記ウイルスと前記ウイルス・コレセプターとの間の結合を阻害する物質を同定する工程と、を含む方法。
【請求項４６】
前記ウイルスが免疫不全ウイルスである、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記免疫不全ウイルス・コレセプターがＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４ポリペプチド配列である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
前記ウイルス・コレセプターが無傷細胞の表面上に存在する、請求項４５に記載の方法。
【請求項４９】
ウイルスとウイルス・レセプターとの間の相互作用を阻害する物質を同定するための方法であって、（ａ）請求項２に記載のキメラポリペプチドを被検物質と接触させる工程と、（ｂ）前記ウイルスコートポリペプチド配列と前記ウイルス受容体ポリペプチド配列との間の結合を検出する工程であって、被検物質の存在下での結合の低下量を検出して、前記ウイルスと前記ウイルス受容体との間の結合を阻害する物質を同定する工程と、を含む方法。
【請求項５０】
前記被検物質が、ペプチド、有機分子、抗体、抗ウイルス剤、免疫不全ウイルス受容体お

よびそれらの機能的フラグメントからなる群から選択される、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記免疫不全ウイルス受容体ポリペプチドがＣＤ４ポリペプチド配列である、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
細胞のウイルス感染を阻害するキメラポリペプチド配列を同定するための方法であって、
（ａ）請求項２に記載のキメラポリペプチド配列の存在下および非存在下で、ウイルス感染を受けやすい細胞を感染性ウイルス粒子と接触させる工程と、
（ｂ）キメラポリペプチドが細胞のウイルス感染を阻害するかどうかを測定し、それによってウイルス感染を阻害するキメラポリペプチド配列を同定する工程と、を含む方法。
【請求項５３】
前記ウイルスが免疫不全ウイルスである、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記免疫不全ウイルスがＨＩＶである、請求項５３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は広く受容体－リガンドの相互作用に関し、より具体的には、互いに結合し、ウイルスのタンパク質と受容体とがｉｎ　ｖｉｖｏで相互作用する場合に自然に生じる構造的特性、機能的特性、および免疫原性特性を再現する、ウイルスコートポリペプチドおよび細胞受容体ポリペプチド配列を有するキメラポリペプチドに関する。
【背景技術】
【０００２】
関連技術の説明
ＨＩＶ－１の一次感染後に生じる体液性免疫は、ＡＩＤＳへの進展を予防しえない（Ｒ．Ａ．Ｋｏｕｐら、Ｎａｔｕｒｅ、３７０：４１６（１９９４）、Ｒ．Ａ．Ｋｏｕｐら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６８：４６５０－５（１９９４））。しかし、体液性免疫は、個人がウイルスへの曝露前に力価の高い中和抗体を有する場合には感染を予防しうる。この考えは、チンパンジーに、無細胞系のウイルスを用いた免疫性テスト前後に、中和抗Ｖ３モノクローナル抗体、またはプールされた高力価中和血清を輸注した受動免疫試験によって広く裏づけられている（Ｅ．Ａ．Ｅｍｉｎｉら、Ｎａｔｕｒｅ、３５５：７２８－３０（１９９２）、Ｒ．Ｓｈｉｂａｔａら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．、５：２０４－１０（１９９９））。両者の一連の試験において防御が得られ、体液性免疫が、適切な抗体が免疫性テスト時点またはその直後に十分な力価で存在する場合は防御となりうることを示した。
【０００３】
その他の研究も、体液性免疫がＨＩＶ－１に対して防御的でありうることを示している。例えば、ＳＣＩＤ－ｈｕマウス系を用いた受動免疫は、ｇｐ１２０のＣＤ４結合ドメインに対して特異的なヒトモノクローナル抗体が感染を防ぎうることを示した（Ｍ．Ｃ．Ｇａｕｄｕｉｎら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．、３：１３８９－９３（１９９７））、Ｐ．Ｗ．Ｐａｒｒｅｎら、ＡＩＤＳ、９：Ｆ１－６（１９９５））。さらに、二価のＣＤ４－Ｉｇである免疫付着因子（ｉｍｍｕｎｏａｄｈｅｓｉｎ）、即ちＣＤ４とヒトＩｇＧ２のＨ鎖との間で作られるキメラの受動的移行が、ＨＩＶ－１チンパンジーの免疫性テスト系において防御可能であることが示されている（Ｊ．Ｗ．Ｅｉｃｈｂｅｒｇら、ＡＩＤＳ　Ｒｅｓ．Ｈｕｍ．Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ、８：１５１５－９（１９９２））、Ｒ．Ｈ．Ｗａｒｄら、Ｎａｔｕｒｅ、３５２：４３４－６（１９９１））。また、中和抗体は、ＳＩＶに対する防御免疫と強く相関する（Ｊ．Ｌ．Ｈｅｅｎｅｙら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．、９５：１０８０３－８（１９９８））。さらに、アカゲザルにおける受動的移行試験は、ＨＩＶ－1_{DH12}単離株に対して特異的な高力価チンパンジー抗体が、十分な濃度の抗体を使用した場合には、ＳＨＩＶ$_{DH12}$に対するアカゲザルの

殺菌免疫を提供することを示した（Ｒ．Ｓｈｉｂａｔａら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．、５：２０４－１０（１９９９））。また、ＨＩＶＩｇ、２Ｇ１２、および２Ｆ５を用いたアカゲザルにおける受動的移行実験は、ＳＨＩＶ－８９．６Ｐによる免疫性テストに対し、レシピエント群が、非レシピエントのコントロールに比較して５０％優れた防御を有することを示した（Ｍａｓｃｏｌａら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７３：２００９－１８（１９９９））。したがって、これらの試験により、様々な特異性を持った、持続的かつ高力価（または高効率的）中和抗体反応を導く免疫法が、防御的でありうるという考えが裏づけられる。この目的に達するための有効な方法を見出すのは困難であった。試験に用いられた組換えモノマーまたはオリゴマーＨＩＶエンベロープのサブユニット調製物は、狭い範囲の分離株に対する中和反応を導く（Ｊ．Ｐ．Ｍｏｏｒｅら、ＡＩＤＳ、９：Ｓ１１７－１３６（１９９５））、Ｑ．Ｊ．Ｓａｔｔｅｎｔａｕ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、８：５４０－５（１９９６）、Ｒ．Ｗｙａｔｔら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２８０：１８８４－８（１９９８））。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

発明の概要

本発明は、コートポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列がスペーサーによって連結されている、ウイルスコートポリペプチド配列およびウイルス受容体ポリペプチド配列を含むキメラポリペプチドに関する。キメラポリペプチドのコートポリペプチド配列およびウイルス受容体ポリペプチド配列は、互いに結合しうる。本発明のキメラポリペプチドは、免疫反応を誘発し、抗体を産生するために有用である。さらに、キメラポリペプチドは、対象に投与すれば、ウイルス感染に対する受動的防御、または免疫応答（すなわち、抗体若しくはＣＴＬ反応）の生起によって、ウイルス感染を予防し、阻害し、または改善するために有用である。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

種々の実施形態において、キメラポリペプチドのウイルスコートポリペプチド配列は、エンベロープポリペプチド配列（例えば、完全長ｇｐ１２０、またはフラグメント）、コレセプターポリペプチドを結合するウイルス、ＨＩＶ（例えば、ＨＩＶ－１またはＨＩＶ－２）、ＳＩＶ、ＦＩＶ、ＦｅＬＶ、ＦＰＶを含む免疫不全ウイルス、およびヘルペスウイルスである。種々の追加の実施形態において、ウイルス受容体ポリペプチド配列は、完全長ＣＤ４ポリペプチド配列またはそのフラグメントであり、例えば、Ｄ１、Ｄ２ドメインおよびそれらの変異が挙げられる。別のコレセプターを使用するウイルス由来のエンベロープ遺伝子を導入することにより、異なったコレセプターを発現する様々な細胞型のウイルス感染に対する防御を提供するこれらの一本鎖の分子の潜在能力を、さらに拡大しうる。

【０００６】

異種ドメインを有するキメラポリペプチドも提供される。かかる異種ドメインは明確な機能性を与え、標識、付着因子、および免疫増強剤を含む。例えば、異種ドメインは、ｃ－ｍｙｃポリペプチド配列または免疫グロブリンポリペプチド配列（例えば、重鎖ポリペプチド配列）などのアミノ酸配列を有しうる。

【０００７】

本発明によれば、キメラポリペプチドをコードする核酸配列を有するポリヌクレオチド配列が提供される。ポリヌクレオチドは発現ベクターに含めることができ、キメラポリペプチドの発現に有用である。

【０００８】

本発明によれば、本発明のキメラポリペプチドに結合する抗体、およびそれらの機能的フラグメントが提供される。これらの抗体は治療法および診断法において有用である。かかる抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで免疫不全ウイルスを中和することが

でき、例えば、受動的防御によって、免疫不全ウイルス感染の阻害においても有用でありうる。かかる抗体は、ウイルスコートポリペプチド配列とウイルス受容体ポリペプチド配列の結合によって生成されるエピトープに結合しうる。例えば、かかるエピトープは、エンベロープポリペプチド配列上に存在しうる。

【０００９】

本発明のキメラポリペプチド、ポリヌクレオチド、および抗体は、ウイルス感染の治療、または免疫反応の誘導に有用である。したがって、本発明によれば、薬学的に許容される担体に含有されたキメラポリペプチド、ポリヌクレオチド、および抗体が提供される。

【００１０】

抗体を産生するための方法は、対象がキメラポリペプチドに対する抗体を産生するのに十分な量、本発明のキメラポリペプチドを対象に投与する工程を含む。かかる方法は、例えば、抗体がレシピエント対象に投与される場合、対象におけるウイルス感染を阻害し、または改善するために、または受動的防御のためにも有用でありうる。

【００１１】

対象におけるウイルス感染を抑制するための方法は、本発明のキメラポリペプチド、またはこれをコードするポリヌクレオチドの有効量を投与し、細胞のウイルス感染を阻害する工程を含む。投与されたキメラポリペプチドは、対象の細胞上のウイルス・コレセプターに結合し、防御的免疫反応をもたらすことによってウイルス感染を防ぐことができる。キメラポリペプチドは、対象におけるウイルス感染を改善するのに十分な量で投与することができる。

【００１２】

免疫応答をもたらす方法は、抗体反応またはＣＴＬ反応を生じさせることができる。得られた抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで免疫不全ウイルスを中和しうる。これらの抗体は、キメラポリペプチドの２つのポリペプチド配列の結合によって曝露されるエピトープにも結合しうる。

【００１３】

ウイルスとウイルス・コレセプター、およびウイルスとウイルス受容体との結合または相互作用を調節する物質を同定するための方法も提供される。１つの実施形態における方法は、被検物質の存在下および非存在下で、受容体に結合するウイルスのコートタンパク質を有するキメラポリペプチドとコレセプターポリペプチド（例えば、ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４ポリペプチド配列）とを、キメラポリペプチドとコレセプターポリペプチドとが結合可能な条件で接触させ、被検物質の存在下および非存在下での結合を検出する工程を含む。被検物質の存在下で結合が減少すれば、ウイルスとウイルス・コレセプターポリペプチドとの結合を抑制する物質として同定する。

【００１４】

別の実施形態における方法は、被検物質の存在下および非存在下で、キメラポリペプチド内の分子内結合を可能にする条件でキメラポリペプチドを接触させ、キメラポリペプチド内の分子内結合または相互作用を検出する工程を含む。被検物質の存在下で結合が減少すれば、キメラにおけるウイルスとウイルス受容体のポリペプチドとの分子内の結合または相互作用を阻害する物質として同定する。該物質は、キメラポリペプチドとウイルス・コレセプターのポリペプチドの接触の前後に添加することができる。ウイルス・コレセプターまたは受容体のポリペプチドは、ヒト以外の霊長類などの動物において、無傷細胞（ｉｎｔａｃｔ　ｃｅｌｌ）の表面上に存在しうる。この方法は、ＨＩＶ、ＳＩＶなどの免疫不全ウイルスを用いて行うことができる。被検物質としては、ペプチド、有機分子、抗体およびそれらのフラグメント、抗ウイルス薬、ウイルス・コレセプター、それらの機能的フラグメント、およびそれらのペプチド模倣物などの物質のライブラリーが挙げられる。

【００１５】

細胞のウイルス感染を調節（抑制または刺激）するキメラポリペプチド配列を同定するための方法も提供される。１つの実施形態における方法は、本発明のキメラポリペプチド配列の存在および非存在下に、ウイルス感染しやすい細胞を感染性ウイルスと接触させ、キ

メラポリペプチドが（ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで）細胞のウイルス感染を調節（抑制または刺激）するかどうかを測定する工程を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１６】

発明の詳細な説明

本発明は、ＨＩＶエンベロープポリペプチドおよびＣＤ４受容体を含有するキメラポリペプチドが、コレセプターに結合する能力を有した、相互作用する複合体を形成しうるという知見に基づく。本発明のキメラポリペプチドにおいて、ＣＤ４に結合するＨＩＶ　ｇｐ１２０は、ＨＩＶが細胞上に存在するＣＤ４に結合すると生じる、エンベロープタンパク質－ＣＤ４遷移状態を再現し、ｇｐ１２０は、複合体形成時に曝露され、かつコレセプターであるＣＣＲ５と直接相互作用する保存エピトープを示す。エンベロープ－ＣＤ４遷移状態の形成およびその後の細胞コレセプターへの結合は、細胞のＨＩＶ感染における重要な工程である。したがって、例えば、ｇｐ１２０－ＣＤ４複合体形成時に曝露されたエピトープに結合することによって、コレセプターへのｇｐ１２０－ＣＤ４の結合を妨害または阻害する抗体または他の物質は、コレセプターとのウイルスの相互作用を抑制し、それによってＨＩＶ感染からの保護も仲介しうる。

【００１７】

したがって、本発明のキメラポリペプチドまたはキメラポリペプチドをコードする核酸は治療上、例えば、ウイルスコートタンパク質の受容体ポリペプチドへの結合時に形成される遷移状態の複合体に対する免疫反応を誘発することによって、ウイルス感染を治療、抑制、予防、または改善するために用いることができる。かかるキメラポリペプチドは、本明細書では「一本鎖」分子とも呼ばれ、キメラ配列内のポリペプチド受容体配列へのコートポリペプチド配列の結合、またはコレセプターポリペプチド配列へのキメラの結合を抑制し、阻害し、または妨害する物質の検査に使用し、それによって対応するウイルス性感染を治療するための潜在的な治療薬を同定することができる。例えば、ＣＣＲ５への免疫不全ウイルスのエンベロープポリペプチドＣＤ４複合体を抑制し、阻害し、または防止する物質が、ＨＩＶを有し、またはこれを有する危険な状態にある対象を治療するための治療薬でありうる。

【００１８】

キメラポリペプチドは、相互作用コートタンパク質－受容体複合体に対する特異的な抗体を産生するためにも有用である。かかる特異的抗体は、ウイルス感染または増殖に対する受動的防御、診断目的、および複合体形成時に曝露されるエピトープ（例えば、陰性エピトープ）を同定し特徴づけるために用いることができる。ウイルスコートタンパク質と受容体との分子内結合の非存在下でも、キメラポリペプチドは、ウイルスコートポリペプチド配列のみよりも免疫反応の誘導において有効でありうる。したがって、かかる非相互作用キメラポリペプチドも有用であり、本明細書に含まれる。

【００１９】

受容体およびコレセプターを結合するウイルスコートポリペプチドを含有するキメラポリペプチドは、ｉｎ　ｖｉｖｏで、ウイルスの細胞コレセプターへのアクセスを阻害することによってウイルス感染に対して受動的に防御する追加の利点を有する。さらに、かかるキメラポリペプチドは、該キメラポリペプチドがコレセプターに結合するのを抑制し、阻害し、または妨害する物質を同定することによって、治療薬のスクリーニングに用いることができる。例えば、ＣＣＲ５への免疫不全ウイルスのエンベロープポリペプチドＣＤ４複合体形成を抑制し、阻害し、または妨害する物質が、ＨＩＶを有し、またはこれを有する危険な状態にある対象を治療するための治療薬でありうる。任意の細胞のウイルス感染にはウイルスの細胞受容体への結合を要するため、任意のウイルスコートタンパク質のポリペプチド配列および対応する受容体を含有するキメラポリペプチドが、本発明の組成物および方法に含まれている。

【００２０】

本発明によれば、スペーサーによって結合されたウイルスコートポリペプチド配列とウイ

ルス受容体ポリペプチド配列を含有するキメラポリペプチドが提供される。このキメラポリペプチドのコートポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列は、キメラポリペプチドの２つのポリペプチド配列が好ましくは結合または相互さようするように、十分な長さのアミノ酸を有するスペーサーによって結合される。１つの実施形態におけるコートポリペプチド配列は、免疫不全ウイルスのエンベロープポリペプチド配列である。別の実施形態におけるコートポリペプチド配列は、コレセプターポリペプチドを結合するウイルスからのものである。種々の他の実施形態におけるコートポリペプチド配列および受容体ポリペプチド配列は、対応する完全長ナイーブ配列の活性フラグメントである。

【００２１】

本明細書で用いられる「コート」なる用語は、細胞に結合しうるウイルス起源のポリペプチド配列を意味する。一般に、ウイルスコートタンパク質は、ウイルス粒子の外表面近くに存在し、結合およびその後の細胞膜への侵入を可能にする。しかし、コートポリペプチド配列は、受容体ポリペプチドに結合し、またはこれと相互作用する能力がある任意のウイルスタンパク質を含む。本明細書で定義されるコートポリペプチド配列は、糖質、脂肪酸、脂質など、他の分子構成要素と非共有または共有結合しうる。コートポリペプチド配列は、多数のウイルスポリペプチド配列を含有しうる。例えば、エンベロープポリペプチド配列とともに、ｇａｇポリペプチド配列もキメラポリペプチドに含まれ、受容体ポリペプチド配列に結合する構造のエンベロープポリペプチド配列を維持しうる。

【００２２】

本発明において有用なウイルスコートポリペプチド配列は、対応する細胞受容体が既知であるか、同定可能である限り、例えば、細菌、植物、および動物ウイルスを含む任意の起源とすることができる。特定のウイルスの例として挙げられるのは、レトロウイルス科（例えば、ＨＩＶなどのヒト免疫不全ウイルス）、ピコルナウイルス科（例えば、ポリオウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）、カルシウイルス科（例えば、胃腸炎をひき起こす株）、トガウイルス科（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）、フラビウイルス（例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）、コロナウイルス科（例えば、コロナウイルス）、ラブドウイルス科（例えば、水泡性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）、フィロウイルス科（例えば、エボラウイルス）、パラミクソウイルス科（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）、オルトミクソウイルス科（例えば、インフルエンザウイルス）、ブンヤウイルス科（Ｂｕｎｇａｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、ハンターンウイルス、ブンヤウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス）、アレナウイルス科（出血熱ウイルス）、レオウイルス科（例えば、レオウイルス、オルビウイルス、ロタウイルス）、ビルナウイルス科、ヘパドナウイルス科（Ｂ型肝炎ウイルス）、パルボウイルス科（パルボウイルス）、パポバウイルス科（乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス）、アデノウイルス科（ほとんどのアデノウイルス）、ヘルペスウイルス科（単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）２および２、水疱瘡ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス科（天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）、およびイリドウイルス科（例えば、アフリカブタ熱ウイルス）、および分類区分されていないウイルス（例えば、海綿状脳症の病因、デルタ型肝炎（Ｂ型肝炎の不完全な付随体と考えられる）の病因、非Ａ型、非Ｂ型肝炎（クラス１＝体内感染型、クラス２＝非経口感染型（すなわちＣ型肝炎）、ノーウォークおよび関連ウイルス、およびアストロウイルス）である。（表１も参照）。

【００２３】

本明細書で用いられる「受容体」なる用語は、細胞によって発現される、ウイルスが結合可能な任意のポリペプチドを意味する。一般に、かかる受容体は、細胞の表面上に自然に存在するが、人工的に作り出すことができる。受容体ポリペプチドは、糖質、脂肪酸、脂質等、他の分子構成要素と非共有または共有結合しうる。受容体ポリペプチドは、共有結合または非共有結合で連結された１つまたは複数の隣接ポリペプチドセグメントを含みうる。かかる分子構成要素または他のポリペプチド配列は、受容体構成、例えば、コートポ

リペプチド配列への結合に重要でありうる。したがって、受容体構成に重要な分子を含む追加の要素を、本発明のキメラポリペプチドに含みうる。受容体ポリペプチド配列は、起源が原核生物または真核生物のいずれかでありうる。

【００２４】

真核生物である場合は、植物と動物の両方の受容体が考えられる。好ましい動物の受容体は、例えば、ヒト、およびチンパンジー、類人猿、マカクザル、テナガザル、オランウータン等の霊長類を含む哺乳動物のほか、家畜を含む他の動物種である。ヒト受容体の例は、ＣＤ４である。受容体の他の例としては、グリコサミノグリカンおよびＣＤ２、ＣＲ１が挙げられる。受容体は他にも知られており、本発明の組成物および方法において応用できる（例えば、表１　Ｊ、および「動物ウイルスの細胞受容体（Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ　Ｆｏｒ　Ａｎｉｍａｌ　Ｖｉｒｕｓｅｓ）」、エッカルト・ウィマー（Ｅｃｋａｒｄ　Ｗｉｍｍｅｒ）編、コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ）（１９９４年）も参照）。

【００２５】

【表１】

表 1

受容体 (結合サブユニット)	ウイルス(科)	文献
免疫グロブリン様分子		
VCAM−1	EMC−D(ピコルナウイルス科)	フーバー(Huber)(1994年)
[CAM−1](第1ドメイン)	大群 HRV、CAV 13、18、および 21 (ピコルナウイルス科)	コロノ(Colonno)ら(1986 年) グリーブ(Greve)ら(1989 年) スタウトン(Stauton)ら(1989 年) トマシーニ(Tomassini)ら(1989 年)
PVR(第1ドメイン)	ポリオウイルス (ピコルナウイルス科) (1989 年)	コイケ(Koike)ら(1990 年) メンデルスオトム(Mendelsotm)ら (1989 年)
CD4(第1ドメイン)	HIV−1、2;SIV (レンチウイルス科) ヒトヘルペスウイルス 7	ダイグレイシュ(Daigleish)ら(1984 年); クラッツマイム(Klatzmaim)ら(1984 年) ルッソ(Lusso)ら(1994 年)
CEA、数種の構成メンバー (第1ドメイン)	マウス肝炎ウイルス (コロナウイルス科)	ウイリアムズ(Williams)ら(1978 年)
MHCI	セムリキ森林ウイルス (トガウイルス科) 乳酸脱水素酵素ウイルス マウスサイトメガトウイルス (ヘルペスウイルス科) SV−40	ヘテニウス(Hetenius)ら(1978 年) オトドストーン(Otdstone)(1980 年) イナダ(Inada)とミムス(Mims)(1984 年) ワイクス(Wykes)ら(1993 年) ブリュー(Breau)ら(1992 年)
MHCII	ビスナウイルス (レンチウイルス科)	ダルツィール(Dalziel)ら(1991 年)
インテグリン		
VLA−2(α鎖)	エコー(ECHO)ウイルス 1、8 (ピコルナウイルス科)	ベルゲルソン(Bergelson)ら (1992 年、1993 年)
(RGD結合タンパク質)	FMDV (ピコルナウイルス科)	フォックス(Fox)ら(1989 年) メイスン(Mason)ら(1994 年)
αvβ3(ビブロネクチン)	CAV9、エコーウイルス 1、8 (ピコルナウイルス科)	ロイバイネン(Roivainen)ら(1994 年)
輸送タンパク質		
リン酸輸送 類似体	テナガザル白血病ウイルス (レトロウイルス科) 両種性マウス (レトロウイルス科)	ヨハン(Johann)ら(1992 年) ミラー(Milelr)ら(1994 年)
陽イオン性アミノ酸 輸送体	エコトロピックマウス 白血病ウイルス (レトロウイルス科)	アルブリットン(Albritton)ら(1989 年)

【００２６】
【表２】

シグナル受容体		
LDL受容体タンパク質ファミリー	小群 HRV (ピコルナウイルス科) A 亜群トリ白血病 肉腫ウイルス(科?)	ホーファー(Hofer)ら(1994 年) パテス(Bates)ら(1993 年) コノリー(Connolly)ら(1994 年)
アセチルコリン受容体(α−1) EGF受容体	狂犬病ウイルス (ラブドウイルス科) ワクシニアウイルス (ポックスウイルス科)	レニッツ(Leniz)ら(1990 年) マーシュ(Marsh)とエプスタイン(Eppstein)(1987 年)
白血球分化抗原[CD9]	ネコ免疫不全ウイルス (レンチウイルス科)	ウィレット(Willett)ら(1994 年)
その他		
アミノペプチダーゼN	ヒトコロナウイルス 229E (コロナウイルス科) TGEV(コロナウイルス科)	イェーガー(Yeager)ら(1992 年) デルマス(Delmas)ら(1992 年)
補体受容体CR2	EBV(ヘルペスウイルス科)	マクルーア(McClure)(1992 年)
高アフィニティーラミニン受容体	シンドビスウイルス(トガウイルス科)	ワング(Wang)ら(1992 年)
腐食促進因子[CD55]	エコーウイルス 7 (6、11、12、20、21)	ベルゲルソン(Bergelson)ら(1994 年)
膜補因子タンパク	麻疹ウイルス (麻疹ウイルス科)	ドリッグ(Dorig)ら(1993 年)
モエシン	麻疹ウイルス (麻疹ウイルス科)	ダンスター(Dunster)ら(1994 年)
グリコホリンA	EMCV(ピコルナウイルス科) レオウイルス(レオウイルス科)	アラウェイ(Allaway)とバルネス(Barness)(1986 年) ポール(Paul)とリー(Lee)(1987 年)
ガラクトシルセラミド	HIV−1(レンチウイルス科)	バート(Bhat)ら(1991 年)
赤血球P抗原	パルボウイルス B19 (パルボウイルス科)	ブラウン(Brown)ら(1993 年)
BLVRop.1	ウシ白血病ウイルス (レトロウイルス科)	バン(Ban)ら(1993 年)
シアロ糖タンパク質GP−2	センダイウイルス (パラミクソウイルス科)	鈴木(Suzuki)ら(1985 年)
シアル酸	インフルエンザウイルス (オルトミソウイルス科) レオウイルス(レオウイルス科) A 群ブタロタウイルス (ロタウイルス科) ヒトコロナウイルス OC43、ウシコロナウイルス (コロナウイルス科)	ヘルラー(Herrler)ら(1985 年) フェマンデス(Femandes)ら(1994 年) ロイスマ(Roisma)ら(1994 年) ブラサク(Vlasak)ら(1988 年)
ヘパラン硫酸	ヒトサイトメガロウイルス (ヘルペスウイルス科) HSV	コンプトン(Compton)ら(1993 年) ウードゥン(WuDunn)とスピア(Spear)(1989 年)

【００２７】

本明細書で用いられる「コレセプター」なる用語は、受容体へのウイルスの結合後または結合と同時に結合されている任意の受容体を意味する。したがって、コレセプターには、ウイルスのポリペプチド受容体複合体に結合することによって、直接的または間接的にウイルス侵入を促進する細胞上に存在する任意のポリペプチドまたは分子構成要素が含まれる。細胞へのウイルス侵入を促進するコレセプターに加えて、ウイルス侵入を直接的または間接的に促進することなく、細胞の付着または親和性を仲介するコレセプターも含まれる。コレセプターの特定の例は、免疫不全ウイルスを結合しうるＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４など、ケモカイン受容体を含有する第７貫通膜ドメイン（７－ＴＭ）である。その他の

コレセプターとしては、ＣＣＲ－２ｂ、ＣＣＲ３、ＣＣＲ８、Ｖ２８／ＣＸＣＲ１、ＵＳ２８、ＳＴＲＬ　３３／ＢＯＢ／ＴＹＭＳＴＲ、ＧＰＲ１５／Ｂｏｎｚｏ、およびＧＰＲ１が挙げられる。

【００２８】

本明細書で用いられる「ポリペプチド」、「タンパク質」、および「ペプチド」なる用語は同じ意味で用いられ、長さまたは翻訳後修飾（例えば、グリコシル化、リン酸化、脂質化、ミリスチン化、ユビキチン化）に関係なく、アミド結合によって共有結合されている少なくとも２個のアミノ酸の配列ポリマーを示す。Ｄ－およびＬ－アミノ酸、およびＤ－およびＬ－アミノ酸の混合物も含まれる。

【００２９】

キメラポリペプチドは、一般に天然のアミノ酸配列ではいっしょに見出されることのない２つ以上の部分を有するアミノ酸配列を指す。

【００３０】

本明細書に開示されているように、ＣＤ４ポリペプチド配列、およびＣＤ４を結合するＨＩＶエンベロープｇｐ１２０ポリペプチド配列を有するキメラポリペプチドは、アミノ酸スペーサー配列によって離されるとキメラ中で互いに結合する。ｇｐ１２０－ＣＤ４キメラは、ＣＣＲ５などのコレセプターを結合する能力がある。したがって、別の実施形態におけるキメラポリペプチドは、コレセプターを結合するウイルスのコートポリペプチド配列を有する。

【００３１】

ＣＤ４は、免疫不全と関連した種々のウイルスの侵入のターゲットであると思われる。例えば、リンパ球およびマクロファージなど免疫系の細胞は、ＣＤ４を発現し、ＨＩＶ、ＳＩＶ、ヘルペスウイルス７、および他の多くのウイルスによって感染しやすい。本明細書で用いられる「免疫不全」なる用語は、ウイルスに関して用いられると、そのウイルスが免疫源の細胞または免疫反応に関わる細胞を感染させる能力があることを意味し、一般にかかる感染は、感染した宿主の免疫機能を危うくしうる。したがって、本発明は、ＣＤ４を結合しうるウイルスまたはウイルス株のウイルスコートポリペプチドに適用可能である。

【００３２】

本発明によれば、免疫不全ウイルスのエンベロープポリペプチド配列を有するキメラポリペプチドが提供される。種々の態様において、エンベロープポリペプチド配列は、ＨＩＶ、ＨＴＬＶ、ＳＩＶ、ＦｅＬＶ、ＦＰＶ、およびヘルペスウイルスのポリペプチド配列である。他の態様において、ウイルスは、マクロファージ刺激またはリンパ球刺激ＨＩＶである。別の態様において、ＨＩＶは、ＨＩＶ－１またはＨＩＶ－２である。種々の他の態様において、エンベロープポリペプチド配列は、ｇｐ１２０、ｇｐ１６０、またはｇｐ４１である。

【００３３】

本発明のキメラポリペプチドの受容体およびウイルスコートポリペプチド配列は、例えば、２つのポリペプチド間に相互作用する複合体を形成するために、それらの間にスペーサー領域を必要とする。理論によって制約されることは望まないが、スペーサーは受容体とウイルスコートポリペプチド配列との間の移動または自由度を可能にし、相互作用複合体を形成する。

【００３４】

本明細書で用いられる「スペーサー」は、ウイルスコートポリペプチド配列を受容体ポリペプチド配列に接続すると同時に、相互作用複合体を形成するために必要な移動または自由度を与える任意のサイズまたは性質の物理的または化学的成分、あるいは共有または非共有結合を指す。本発明において、スペーサーは、「ｅｎｄ　ｔｏ　ｅｎｄ」の配向で２つのポリペプチド配列を結合することが好ましい。「ｅｎｄ　ｔｏ　ｅｎｄ」とは、コートポリペプチドのアミノまたはカルボキシル末端アミノ酸が受容体ポリペプチド配列のアミノまたはカルボキシル末端アミノ酸に接続していることを意味する。したがって、スペ

ーサーは、例えば、本明細書ではＨＩＶ　ｇｐ１２０およびＣＤ４で例示されているように、コートポリペプチド配列のカルボキシル末端アミノ酸を受容体ポリペプチド配列のアミノ末端アミノ酸に接続しうる。あるいは、スペーサーは、コートポリペプチドのアミノ末端アミノ酸を受容体ポリペプチドのカルボキシル末端アミノ酸、またはポリペプチド配列のカルボキシル末端アミノ酸、またはポリペプチド配列の２個のアミノ末端アミノ酸に接続することができる。

【００３５】

スペーサーの特定の例には、１個以上のアミノ酸またはペプチド類似体が含まれる。アミノ酸スペーサーは、例えば、実質的に任意の長さとすることができ、例えばわずか５個でもよいし、２００個以上ものアミノ酸でもよい。したがって、アミノ酸スペーサーは、約１０～約１００個のアミノ酸を有することができ、または約１５～約５０個のアミノ酸を有しうる。スペーサーは約２０～約４０個のアミノ酸を有することが好ましい。スペーサーの他の例としては、ポリペプチド配列の末端間のジスルフィド結合が挙げられる。糖質スペーサーも意図されている。当業者は、ウイルスコートポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列との相互作用複合体の形成を可能にするように機能しうる他の成分を理解するであろうし、または容易に確認できる。

【００３６】

受容体およびコートポリペプチド配列は、任意のアミノ酸の長さでありうる。それらは、キメラポリペプチドにおける場合、ポリペプチド配列が互いに結合することを可能にする長さを有することが好ましい。したがって、受容体およびコートポリペプチド配列は、天然の完全長受容体および完全長コートポリペプチド配列、ならびにポリペプチド配列の一部を含む。例えば、受容体、およびコートポリペプチド配列のアミノ酸切断部位、内部欠失、またはサブユニットが含まれる。かかる改変形態は、相互に相互作用が可能であることが好ましい。例えば、切断型または欠失型コートポリペプチド配列は、受容体ポリペプチド配列との相互作用が可能であることが好ましい。切断型受容体ポリペプチド配列の例は、ＣＤ４　Ｄ１およびＤ２ドメインであり、これらはＨＩＶエンベロープポリペプチド配列と相互作用が可能である（図９）。切断型コートポリペプチド配列の例は、アミノ末端６０アミノ酸およびカルボキシ末端２０アミノ酸（例えば、ＴｃＳｃにおける）を欠く切断型ＨＩＶ　ｇｐ１２０である。

【００３７】

したがって、本発明によれば、切断型または内部欠失型配列を含むキメラポリペプチドが提供される。ある実施形態においては、ウイルスポリペプチド配列または受容体ポリペプチド配列は、それらの対応する完全長ポリペプチド配列と比較して、１個以上のアミノ酸が除去されている。ある態様においては、切断型ウイルスコートポリペプチド配列は、ＨＩＶエンベロープポリペプチド配列であり、別の態様においては、切断型受容体ポリペプチド配列はＣＤ４配列である。本明細書で例示されているように、切断型ＨＩＶエンベロープポリペプチド配列は、アミノ末端６０アミノ酸またはカルボキシ末端２０アミノ酸を欠くｇｐ１２０であり、切断型ＣＤ４ポリペプチドはＤ１およびＤ２ドメインを含む。種々の他の態様において、キメラポリペプチドは内部欠失型ウイルスコートポリペプチド配列または内部欠失型ＣＤ４ポリペプチド配列である。

【００３８】

切断型、内部欠失型、およびサブユニットのポリペプチド配列に加えて、さらにポリペプチド配列の改変も含まれる。かかる改変は、改変キメラポリペプチドが実質的に未改変キメラポリペプチドと同じ活性または機能を有する限り、キメラポリペプチドを含むポリペプチド配列の１つまたは両方のアミノ酸配列の軽微な置換、変形、または誘導体化が含まれる。例えば、ウイルスコートまたは受容体ポリペプチド配列は、脂質、脂肪酸（パルミチン酸塩、ミリスチン酸塩）、脂質を有し、リン酸化され、または一般的にポリペプチド配列を伴う他の翻訳語修飾を有しうる。

【００３９】

改変の別の例は、２つのポリペプチドまたはキメラポリペプチドのいずれかに対して明確

な機能性を与える異種ドメインの追加である。異種ドメインは、それが追加の機能を与える限り、任意の小有機分子または無機分子、あるいは高分子でありうる。異種ドメインは、ウイルスコートポリペプチドと受容体ポリペプチドとの間の相互作用または親和性に影響を及ぼすこともあり、及ぼさないこともある。明確な機能を与える異種ドメインの特定の例は、ターゲティング（例えば、受容体リガンド、抗体等）を与えるアミノ酸配列、免疫増強機能（例えば、免疫グロブリン、アジュバント）を与えるアミノ酸配列、精製、分離、または検出を可能にするアミノ酸配列（例えば、ｍｙｃ、Ｔ７標識、ポリヒスチジン、アビジン、ビオチン、レクチン等）を含む。

【００４０】

特定の異種ドメインは、ｃ－ｍｙｃポリペプチド配列および／またはＩｇＧ１重鎖ポリペプチド配列を含みうる。異種ドメインは、複数の機能を有しする。例えば、ＩｇＧ１は、ｉｎ　ｖｉｖｏで免疫増強剤として機能しうると同時に、調製され、分離され、または検出されうる（例えば、セイヨウワサビ過酸化酵素またはアルカリホスファターゼなど酵素活性を有する二次抗体との反応によって）付着分子として機能しうる。当業者は、他の異種ドメインについて知るとともに、それらを所望の用途および機能によって適切に選択することができる。

【００４１】

したがって、本発明によれば、１つ以上の異種ドメインを有するキメラポリペプチドが提供される。１つの実施形態において、異種ドメインは、ｃ－ｍｙｃポリペプチド配列ｇｌｕ－ｇｌｎ－ｌｙｓ－ｌｅｕ－ｉｌｅ－ｓｅｒ－ｇｌｕ－ｇｌｕ－ａｓｐ－ｌｅｕ、（配列番号：１４）である。別の実施形態において、異種ドメインは、Ｈ鎖を含む免疫グロブリンポリペプチド配列（配列番号：３２）である。

【００４２】

受容体およびコートポリペプチド配列は、任意の長さのアミノ酸でありうる。それらは、キメラポリペプチドにおける場合、ポリペプチド配列が互いに結合することを可能にする長さを有することが好ましい。したがって、受容体およびコートポリペプチド配列は、天然の完全長受容体および完全長コートポリペプチド配列、ならびにポリペプチド配列の一部を含む。

【００４３】

ある態様では、本発明は、Ｄ１Ｄ２ドメインおよびｍｙｃペプチド「標識」（配列番号：２）、またはキメラポリペプチドをコードする配列番号：２と同一の少なくとも９５％の配列を含む、ＨＩＶ　ｇｐ１２０（ＢａＬ株）、アミノ酸スペーサーポリペプチド、ＣＤ４ポリペプチド配列を含む完全長一本鎖（ＦＬＳＣ）キメラポリペプチドを含む。

【００４４】

別の態様において、本発明は、ＦＬＳＣポリペプチドのフューリン開裂部位における一本鎖変異を有するＦＬＳＣポリペプチドを含み、ここで、ｇｐ１２０（ＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ）、またはキメラポリペプチドをコードする配列番号：２と同一の少なくとも９５％の配列の末端で、ＲはＴに変化する。具体的には、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔは、アミノ酸５０６（配列番号：４）でアルギニンからトレオニン変異を含有する。

【００４５】

本明細書に例示されているように、ポリペプチド配列は、改変キメラポリペプチドが実質的に未改変キメラポリペプチドと同じ活性または機能を有する限り、キメラポリペプチドを含むポリペプチド配列の１つまたは両方のアミノ酸配列の置換、変形、または誘導体化が含まれる。例えば、ウイルスコートまたは受容体ポリペプチド配列は、脂質、脂肪酸（パルミチン酸塩、ミリスチン酸塩）、脂質を有し、リン酸化され、または一般的にポリペプチド配列を伴う他の翻訳語修飾を有しうる。

【００４６】

さらに別の態様において、ウイルスコーまたは受容体ポリペプチド配列は、それらの対応する未改変ポリペプチド配列と比較して１つ以上のアミノ酸が置換されている。例えば、実質的に同じ活性または改善された免疫反応を示す受容体を再現するＣＤ４を含むポリペ

プチドをコードするヌクレオチド配列（配列番号：５）が提供される。具体的には、キメラポリペプチドＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ（配列番号：４）のＣＤ４　Ｄ１Ｄ２ドメインにおけるＫＫＶＶＬＧＫＫＧＤＴＶＥＬＴＣＴＡＳＱＫＫＳＩＱＦＨＷのアミノ酸配列をコードする遺伝子配列は、以下にＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９（配列番号：６）と呼ばれるＣＮＬＡＲＣＱＬＲＣＫＳＬＧＬＬＧＫＣＡＧＳＦＣＡＣＧＰのアミノ酸配列（アミノ酸５２８～５５６（配列番号：２０））をコードするヌクレオチド配列（配列番号：１９）で置換される。

【００４７】

本明細書で用いられる「実質的に同じ活性または機能」なる用語は、こうして改変されたキメラポリペプチドに関して用いられる場合、ポリペプチドが、本明細書に記載され、または当業界において周知のように、非改変ポリペプチドと関連した活性のほとんど、すべて、または多くを保持していることを意味する。同様に、コレセプターと相互作用するキメラポリペプチドの能力に影響を及ぼすことがない改変が本明細書に含まれる。同じく、ウイルスコートタンパク質のみの投与よりも強力な免疫反応を誘発する能力に影響を及ぼすことないキメラポリペプチドの改変が含まれる。

【００４８】

本明細書に含まれる「活性」または「機能的」である改変キメラポリペプチドは、ルーチンの機能的アッセイにより同定しうる。例えば、抗体結合アッセイ、コレセプター結合アッセイを用いることによって、または２つのポリペプチド配列が結合しない場合に通常、隠れている遷移状態の複合体中に曝露されるエピトープの誘導を測定することによって、改変キメラポリペプチドが活性を有するかどうかを容易に決定することができる。

【００４９】

強力な免疫反応を誘発するキメラポリペプチドは、例えば、対象へのキメラの投与後に抗体価を測定することによって同定しうる。ウイルスコートポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列との間の相互作用、またはより強力な免疫反応を誘発するように相互作用することがなく、対応する非改変キメラポリペプチドと、およびそのようものとして、実質的に同じ活性または機能を有することがない、ウイルスコートポリペプチド配列と受容体配列を有するキメラポリペプチドの能力を破壊する改変は含まれていない。

【００５０】

本明細書で用いられる、ポリペプチドに関して用いられる「相同」または「相同性」なる用語は、２つのポリペプチド間のアミノ酸配列の類似性を指す。両方のポリペプチドにおけるアミノ酸の位置が同一のアミノ酸によって占有している場合、それらはその位置で相同性である。したがって、「実質的に相同性」によって、完全ではないが大幅に相同性であり、それに対して相同性である配列として活性のほとんど、またはすべてを保持するアミノ酸配列が意味される。

【００５１】

改変キメラポリペプチドは非改変キメラポリペプチドに伴う活性または機能を保持するため、改変キメラポリペプチドは一般に、非改変ポリペプチドのアミノ酸配列と「実質的に同一」または「実質的に相同性」のアミノ酸配列を有することになる。本明細書で用いられる「実質的に同一」または「実質的に相同性」なる用語は、ポリペプチド配列に関して用いられる場合、ポリペプチドの配列が基準配列に対して少なくとも５０％同一であることを意味する。改変ポリペプチドおよび実質的に同一のポリペプチドは通常、基準ポリペプチドに対して少なくとも７０％、あるいは８５％、より多くは９０％、最も多くは９５％の相同性となる。ポリペプチドについて、配列間で上述した相同率を得る比較の長さは通常、少なくとも２５アミノ酸、あるいは少なくとも５０アミノ酸、より多くは少なくとも１００アミノ酸、および最も多くは２００アミノ酸以上となる。

【００５２】

本明細書に記載されている実質的に同一または相同性のポリペプチドとしては、キメラポリペプチドの機能を破壊することがない（機能的アッセイ、例えば、本明細書に記載されているように測定される）アミノ酸配列の位置に配置される付加、切断、内部欠失または

挿入、同類または非同類置換、または他の改変が挙げられる。置換の特定の例は、１個以上のアミノ酸が別の化学的または生物学的に同様の残基によって置換されている場合である。本明細書で用いられる「同類置換（ｃｏｎｓｅｒｖａｔｉｖｅ　ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎ）」なる用語は、化学的または生物学的に同様の残基による１個の残基の置換を指す。同類置換の例としては、別のものに対するイソロイシン、バリン、ロイシン、またはメチオニンなどの疎水性残基の置換、リシンに対するアルギニン、アスパラギン酸に対するグルタミン酸、またはアスパラギンに対するグルタミン等など、別のものに対する極性残基の置換が挙げられる。当業者は、活性を実質的に変化させることなく、化学的に同様の他の残基で改変または置換されうる多くのアミノ酸を認識するであろう。

【００５３】

実質的に同一または相同性のポリペプチドとしては、さらに機能または活性を改善したり与えたりする改変を有するものも挙げられる。例えば、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔは、改変ＦＬＳＣの安定性を増大する変異フューリン部位を有する（例えば、図１３を参照）。

【００５４】

改変ポリペプチドは、それらの中のアミノ酸の１個以上が化学的に変化または誘導される側鎖を有する「化学的誘導体」をさらに含む。かかる誘導体化ポリペプチドとしては、例えば、遊離アミノ基が塩酸アミン、ｐ－トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ（ｃａｒｏｂｅｎｚｏｘｙ）基を形成し、遊離カルボキシ基が塩、メチル、およびエチルエステルを形成し、Ｏ－アシル誘導体またはＯ－アルキル誘導体を形成する遊離ヒドロキシル基のほか、自然発生的アミノ酸誘導体、例えば、プロリンに対する４－ヒドロキシプロリン、リシンに対する５－ヒドロキシリシン、セリンに対するホモセリン、リシンに対するオルニチン等が挙げられる。共有結合、例えば、環化ポリペプチドを産生する２つのシステイン残基間を形成するジスルフィド結合を変化させうるＤ－アミノ酸およびアミノ酸誘導体も含まれる。

【００５５】

本明細書で用いられる「単離型」または「実質的に純粋」は、本発明のキメラポリペプチド、それらの配列フラグメント、およびポリヌクレオチドの修飾物質として用いられる場合、それらがヒトの介入によって産生され、それらの天然のｉｎ　ｖｉｖｏ細胞環境から分離されることを意味する。一般に、こうして分離されたポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、他のタンパク質、核酸、脂質、糖質、またはそれらが自然に伴う他の材料を実質的に含まない。

【００５６】

通常、ポリペプチドは、少なくとも６０重量％タンパク質および自然に伴う他の分子を含まない場合に実質的に純粋である。調製物は、多くは少なくとも７５重量％、より多くは少なくとも９０重量％、最も多くは少なくとも９５重量％で純粋である。実質的に純粋なキメラポリペプチドは、例えば、細胞中のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させ、産生されるポリペプチドを分離することによって得ることができる。例えば、実施例に記載されているように、哺乳動物細胞中のｇｐ１２０－ＣＤ４ポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドの発現により、免疫親和性カラムを用いて培養基からのキメラ（ｃｈｉｍｅｒｉｃａｌ）ポリペプチドの分離が可能である。あるいは、キメラポリペプチドは化学的に合成されうる。純度は、任意の適切な方法、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、およびその後のゲルの染色（例えば、銀染色）、またはＨＰＬＣ分析によって測定することができる。

【００５７】

本発明のキメラポリペプチドおよびそれらの変形は、当業界で周知の方法によって調製することができる。ポリペプチドの変形は、例えば、エキソヌクレアーゼ欠失、化学的修飾、または異種ドメインをコードするポリヌクレオチド配列の融合によって、部位特異的（例えば、ＰＣＲを利用する）またはランダム変異（例えば、ＥＭＳ）によって導入することができる。キメラポリペプチドは、細菌、酵母菌、または哺乳動物細胞などの宿主細胞中のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現、および一般的な生化学的方法（

例えば、免疫親和性精製、ゲル精製、発現スクリーニング等）を用いた精製により発現キメラポリペプチドを精製することによって得ることができる。他の公知の方法は、ドイチャー（Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒ）ら（Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（タンパク質精製ガイド：酵素学における方法）、１９９０年、第１８２巻、アカデミック・プレス（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）において記載されている。これらの内容を本明細書に援用する。

【００５８】

本発明はさらに、キメラポリペプチド、それらのフラグメント、および相補配列をコードするポリヌクレオチド配列を提供する。ある実施形態では、核酸は、本明細書に例示されるｇｐ１２０－ＣＤ４ポリペプチドをコードする。例えば、配列番号：１は、ｇｐ１２０（配列番号：２３）およびＣＤ４ Ｄ１Ｄ２（配列番号：２５）をコードするヌクレオチド配列を含む、上述したＦＬＳＣをコードする配列を規定する。配列番号：３はＦＬＳＣ Ｒ／Ｔをコードする配列を規定し、この配列では、ｇｐ１２０におけるフューリン開裂部位と推測されるｇｐ１２０のｃ末端において、アルギニンアミノ酸がトレオニンに置換され、それによってＦＬＳＣ上のＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔの安定性が改善されている。ＦＬＳＣ－ＲＴのヌクレオチド配列は、配列番号：２９およびＣＤ４Ｄ１Ｄ２（配列番号：２５）によってコードされる改変ｇｐ１２０を含む。さらに、本発明は、置換フューリン開裂部位を含むキメラポリペプチドＦＬＳＣ Ｒ／Ｔ ＣＤ４Ｍ９をコードするポリヌクレオチド配列番号：５を提供し、さらに、ＣＤ４受容体を再現するアミノ酸配列をコードする配列でＣＤ４ Ｄ１Ｄ２領域をコードする遺伝子配列の置換を提供し、それによって、ＦＬＳＣまたはＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔに対する免疫反応の改善および追加の安定性を提供する。ＦＬＳＣ Ｒ／Ｔ ＣＤ４Ｍ９は、改変ｇｐ１２０をコードする配列番号：２９、およびＣＤ４Ｍ９をコードする配列番号：１９を含むヌクレオチド配列によってコードされる。ＦＬＳＣ Ｒ／Ｔ ＣＤ４Ｍ９キメラポリペプチドは、配列番号：２３および１９を追加的に含みうる。

【００５９】

さらに別の実施形態では、ＴｃＳＣ（配列番号：１２）がｇｐ１２０－ＣＤ４ポリペプチド（配列番号：１３）をコードし、該配列においてはｇｐ１２０のアミノ末端およびカルボキシ末端からアミノ酸配列が切断されている。ＴｃＳＣのヌクレオチド配列は、切断型ｇｐ１２０をコードする配列（配列番号：２７）およびＣＤ４Ｄ１Ｄ２（配列番号：２５）を含む。別の実施形態では、キメラポリペプチドｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１が、追加の標識（配列番号：３１）を有するヌクレオチド配列番号：１によってコードされる。

【００６０】

本明細書で用いられる「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「プライマー」は同じ意味で用いられ、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）、２本鎖または１本鎖、直鎖状または環状のいずれかを指す。ＲＮＡは、スプライスされていない、またはスプライスされたｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、またはアンチセンスＲＮＡｉでありうる。ＤＮＡは、相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、ゲノムＤＮＡ、またはアンチセンスでありうる。具体的に挙げられるのは、本発明のキメラポリペプチドをコードするように機能しうる、ヌクレアーゼ変性に対して抵抗性であるものなど、ヌクレオチド類似体および誘導体である。ヌクレアーゼ抵抗性オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、本明細書に記載された本発明の核酸ワクチンに特に有用である。

【００６１】

「単離型」または「実質的に純粋な」ポリヌクレオチドは、核酸が、それが由来する生物の自然発生的ゲノムにおいて直接隣接している５’末端または３’末端を有するコード配列と直接隣接していないことを意味する。したがって、この用語は、例えば、組換えＤＮＡ（例えば、ＰＣＲによって、またはクローニング中に生成される制限エンドヌクレアーゼ処理によって生成されるｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡフラグメント）のほか、ベクターに組込まれる組換えＤＮＡ、独立して複製するプラスミドまたはウイルス、あるいは原核生物または真核生物のゲノムＤＮＡが含まれる。これは、例えば、キメラまたは融合の組

換えＤＮＡの一部も含む。したがって、この用語は、ｃＤＮＡライブラリーにおける無数の配列中、またはゲル上に分画されたライブラリーの限定ダイジェスト中に存在するが、特徴づけられていない核酸を含むことはない。

【００６２】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝的暗号の結果として変性した核酸も含む。２０個の天然アミノ酸があり、そのほとんどは１以上のコドンによって特徴づけられる。すべての変性ポリヌクレオチド配列は、本発明のキメラポリペプチドをコードする配列に含まれる。

【００６３】

本発明のポリヌクレオチド配列は、当業界で周知の標準方法（例えば、分子クローニング法、化学的合成）を用いて得ることができ、純度は、ポリアクリルアミドまたはアガロースゲル電気泳動、配列決定分析などによって測定することができる。ポリヌクレオチドも当業界で周知であるハイブリダイゼーション法またはコンピュータによる方法を用いて分離することができる。かかる方法としては、（１）プローブで相同性ヌクレオチド配列を検出するゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡライブラリーのハイブリダイゼーション、（２）ＤＮＡ配列（例えば、発現ライブラリーを用いて）によって発現されるポリペプチドの抗体スクリーニング、（３）当該の核酸配列にアニーリングする能力があるプライマーを用いたゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、（４）関連配列の配列データベースのコンピュータ検索、および（５）サブトラクション核酸ライブラリーのディファレンシャル・スクリーニングが挙げられるが、これらに限定されない。したがって、例えば、ＣＤ４をコードするものなど、ポリヌクレオチドをコードする他の受容体を得るために、相同性配列の存在についてライブラリーをスクリーニングすることができる。

【００６４】

本発明は、実質的に相同性のポリヌクレオチドも含む。本明細書で用いられる「相同性」なる用語は、核酸分子に関して用いられる場合、２つのヌクレオチド配列間の類似性を指す。両方の分子におけるヌクレオチドの位置が同一のヌクレオチドによって占有されている場合、それらはその位置で相同性である。「実質的に相同性」の核酸配列は、少なくとも５０％の相同性、より多くは少なくとも７５％の相同性、最も多くは９０％以上の相同性である。実質的に相同性の本発明のキメラポリペプチドと同様、キメラポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドと実質的に相同性のポリヌクレオチドは、それが相同性である配列と関連した活性または機能のほとんど、またはすべてを保持するポリペプチドをコードする。ポリヌクレオチドについては、配列間の比較の長さは、一般に少なくとも３０個のヌクレオチド、あるいは少なくとも５０個のヌクレオチド、より多くは少なくとも７５個のヌクレオチド、最も多くは１１０個以上のヌクレオチドとなる。ポリヌクレオチド配列ギャップおよびミスマッチオリゴヌクレオチドの原因である相同性配列を識別するためのアルゴリズムは、ＢＬＡＳＴなど当業界で周知である（例えば、アルトシュール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ）ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９０年（１５）、ｐ．４０３～４１０を参照）。

【００６５】

さらに、ポリヌクレオチドは、キメラポリペプチド、例えば、ｍＲＮＡをコードするポリヌクレオチドの存在または量を確認するためにハイブリダイゼーションプローブとして有用である（サムブルック（Ｓａｍｂｒｏｏｋ）ら著、分子クローニング法：実験マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）、１９８９年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）、ニューヨーク）。通常、かかるプローブは、非関連配列へのハイブリダイゼーションの可能性を低下させるために所望の配列に対して特異的であるように設計されている。かかるプローブは、放射性核種、発光成分などを用いて検出可能であるために改変することができる。ハイブリダイゼーション条件も所望の特異性を得るために改変することができる。例えば、適度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件として、約３７℃または４２℃下に２×　ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ

（ハイブリダイゼーション条件）、室温下に０．５×　ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ（低ストリンジェントな洗浄）、約４２℃下に０．５×　ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ（適度に高ストリンジェントな洗浄）が挙げられる。適度に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の例は以下の通りである：約５２℃下に０．１×　ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ（適度に高ストリンジェントな洗浄）。高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の例は以下の通りである：約６５℃下に０．１×　ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ（高い厳重洗浄）。

【００６６】

本発明のポリヌクレオチドは、必要に応じて、裸であり、または細胞膜を通過するために適した担体（例えば、ポリヌクレオチド－リポソーム複合体またはコロイド分散系）中にあり、ベクター（例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクターなど）中に収納され、不活性ビーズまたは他の異種ドメイン（例えば、抗体、リガンド、ビオチン、ストレプトアビジン、レクチンなど）、または本明細書に記載され、あるいは当業界で周知の他の適切な組成物に結合されることができる。したがって、ポリヌクレオチド送達のウイルスおよび非ウイルス手段が達成されうるとともに、意図されている。本発明のポリヌクレオチドは、それらに結合される、本明細書に記載された種々の異種ドメインなど、明確な機能性を有するポリペプチドをコードする追加の核酸配列も含有しうる。

【００６７】

本発明のポリヌクレオチドは、例えば、ヌクレアーゼに対して抵抗性であるように改変され、医薬組成物におけるその安定性を増強することもできる。記載されたポリヌクレオチドは、特にかかるポリヌクレオチドが本明細書に開示され、または当業界で周知の発現系に組込まれている場合、本発明のキメラポリペプチドをコードするために有用である。したがって、発現ベクターを含むポリヌクレオチドも含まれている。

【００６８】

細胞中の増殖または発現のために、本明細書に記載されたポリヌクレオチドをベクターに挿入することができる。「ベクター」なる用語は、プラスミド、ウイルス、または核酸の挿入または組込みによって操作されうる当業界で周知の他の媒介体を指す。かかるベクターは、遺伝子操作（すなわち「クローニングベクター」）に用いることができ、または挿入ポリヌクレオチド（すなわち「発現ベクター」）を転写または翻訳するために用いることができる。ベクターは一般に、細胞およびプロモーター中の増殖のための少なくとも複製の起源を含有する。発現ベクター内に存在するプロモーターを含む対照要素が含まれ、適切な転写および翻訳を促進する（例えば、イントロンのスプライシングシグナル、ｍＲＮＡおよび停止コドンのイン・フレーム（ｉｎ－ｆｒａｍｅ）翻訳を可能にする遺伝子の正確なリーディングフレームの維持）。本明細書に記載されたポリヌクレオチドのｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現は、核酸に操作可能に結合されるプロモーターによって得ることができる。「プロモーター」は、プロモーターが操作可能に結合される核酸の転写を導くに十分な最小限の核酸配列を指す（例えば、ビター（Ｂｉｔｔｅｒ）ら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（酵素学における方法）、１９８７年（１５３）、ｐ．５１６～５４４を参照）。プロモーターは構成的に転写を導くことができ、組織特異的であり、または誘導性あるいは抑制性の転写を与えることができ、かかる要素は一般にこうして調節される遺伝子の５’領域または３’領域に配置されている。

【００６９】

本発明においては、コレセプターを結合するウイルスのために、ウイルス感染しやすい細胞（例えば、コレセプターを発現する細胞）に、キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入し、発現させることが有利である。このようにして、発現キメラポリペプチドは、コレセプターに近接した形質変換感受性細胞によって分泌され、それによってコレセプターへのウイルスのアクセスを抑制または予防し、次いで、細胞のウイルス感染を抑制し、予防する。このために、組織特異的プロモーターをポリヌクレオチド配列に操作可能に結合し、適切なターゲット細胞においてキメラポリペプチドの発現を与えることができる。

【００７０】
本明細書で用いられる「組織特異的プロモーター」なる語句は、特定の細胞、例えば、肝細胞、造血性細胞、または動物内の特定組織の細胞において操作可能に結合されたポリヌクレオチドの発現を与える、特定の細胞または組織において活性であるプロモーターを意味する。この用語は、１つの組織内の主に選択ＤＮＡの発現を調節するが、１つ以上の他の組織内でも発現をひき起こす、いわゆる「リーキー（ｌｅａｋｙ）」プロモーターもカバーする。
【００７１】
誘導性プロモーターを用いて、細胞内の発現を調節することもできる。「誘導性プロモーター」は、その活性レベルが外部シグナルまたは物質（例えば、メタロチオネインＩＩＡプロモーター、熱ショックプロモーター）による処理に応じて増大するプロモーターを意味する。「抑制性プロモーター」または「条件（ｃｏｎｄｉｔｉｏｎａｌ）プロモーター」は、その活性レベルが抑制因子または同等の化合物に応じて低下するプロモーターを意味する。抑制因子がもはや存在しない場合、転写が活性化または抑制される。かかるプロモーターは、組み合わせて用いることができ、イントロンやエンハンサー配列など、転写および発現に必要である追加のＤＮＡ配列も含みうる。
【００７２】
本明細書で用いられる「操作可能に結合される」なる用語は、選択されたポリヌクレオチド（例えば、キメラポリペプチドをコードする）と調節配列が、適切な分子（例えば、転写活性化因子タンパク質）が調節配列に結合されている場合に転写を可能にするような方法で接続されていることを意味する。通常、プロモーターはポリヌクレオチドの５’末端に位置しており、プロモーターがポリヌクレオチドの発現を調節しうる転写開始部位の近接でもありうる。しかし、第１ベクター上のプロモーターがタンパク質の発現を制御し、次いで第２ベクター上のポリヌクレオチドの発現を制御するプロモーターを調節する間接的な操作可能な結合も可能である。
【００７３】
細菌系におけるクローニングの場合、Ｔ７等などの構成プロモーターのほか、バクテリオファージγのｐＬ、ｐｌａｃ、ｐｔｒｐ、ｐｔａｃなどの誘導プロモーターを用いることができる。哺乳動物系におけるクローニングの場合、ＳＶ４０、ＲＳＶ等などの構成プロモーター、または哺乳動物細胞のゲノム由来の誘導プロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）、または哺乳動物由来の誘導プロモーター（例えば、マウス乳腺主要ウイルスの長い末端反復、アデノウイルス後期プロモーター）を用いることができる。組換えＤＮＡまたは合成法によって製造されるプロモーターを用いて、本発明の核酸配列の転写を得ることもできる。
【００７４】
組換えウイルスまたはウイルス要素を利用して発現を導く哺乳動物の発現系を人工的に作り出すことができる。例えば、アデノウイルス発現ベクターを用いる場合、核酸配列はアデノウイルス転写／翻訳対照複合体、例えば、後期プロモーターおよび三者間リーダー配列にライゲーションするすることができる。あるいは、ワクシナウイルス７．５Ｋプロモーターを用いることができる（例えば、マケット（Ｍａｃｋｅｔｔ）ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９８２年（７９）、ｐ．７４１５～７４１９、マケットら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、１９８４年（４９）、ｐ．８５７～８６４、パニカリ（Ｐａｎｉｃａｌｉ）ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９８２年（７９）、ｐ．４９２７～４９３１を参照）。
【００７５】
哺乳動物の発現系は、アデノウイルスベクター（米国特許第５，７００，４７０号および同第５，７３１，１７２号）、アデノ関連ベクター（米国特許第５，６０４，０９０号）、単純ヘルペスウイルスベクター（米国特許第５，５０１，９７９号）、およびレトロウイルスベクター（米国特許第５，６２４，８２０号，同第５，６９３，５０８号、および同第５，６７４，７０３号、および国際公開第９２／０５２６６号および同第９２／１４

８２９号）を含む、「遺伝子治療」法のために特別に設計されたベクターをさらに含む。弱毒化ワクチン（Ｍ．ジラード（Ｇｉｒａｒｄ）ら、Ｃ Ｒ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＩＩＩ、１９９９年（３２２）、ｐ．９５９～６６）、Ｂ．モス（Ｍｏｓｓ）ら、ＡＩＤＳ、補遺２、１９８８年（１）、ｐ．Ｓ１０３～１０５）、セムリキ森林ウイルス（Ｍ．ジラード（Ｇｉｒａｒｄ）ら、Ｃ Ｒ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＩＩＩ、１９９９年（３２２）、ｐ．９５９～６６）、Ｓ．Ｐ．モスマン（Ｍｏｓｓｍａｎ）ら、Ｊ Ｖｉｒｏｌ．、１９９６年（７０）、ｐ．１９．５３～６０）、またはサルモネラ（Ｒ．ポウェル（Ｐｏｗｅｌｌ）ら著、感染症の管理のための分子手法（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ａｐｐｒｏａｃｈｓ ｔｏ ｔｈｅ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ ｄｉｓｅａｓｅｓ）（ｐ．１８３～１８７）所収、Ｆ．ブラン（Ｂｒａｎ）、Ｅ．ノルビィ（Ｎｏｒｒｂｙ）、Ｄ．バートン（Ｂｕｒｔｏｎ）、およびＪ．メッカラノス（Ｍｅｃｋａｌａｎｏｓ）（編）、１９９６年、コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ）（ニューヨークのコールド・スプリング・ハーバー（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ））、Ｍ．Ｔ．シャータ（Ｓｈａｔａ）ら、Ｍｏｌ Ｍｅｄ Ｔｏｄａｙ、２０００年（６）、ｐ．６６～７１）などのワクチン運搬体にキメラポリペプチドコード遺伝子を導入し、適切に結び付けられ、折り畳まれたウイルスコートタンパク質、および受容体配列、例えば、ｇｐ１２０およびＣＤ４の発現のための有効かつ信頼できる手段を提供することができる。ウシ乳頭腫ウイルス（ＢＰＶ）に基づくウイルスは、染色体外要素として複製する能力を有する（サーバー（Ｓａｒｖｅｒ）ら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８１年（１）、ｐ．４８６）。マウス細胞への染色体外ベクターの侵入直後に、ベクターは細胞当り約１００～２００のコピーを複製する。挿入ｃＤＮＡの転写には宿主染色体へのプラスミドの一体化を必要としないため、高レベルの発現が生じる。かかるベクターは遺伝子治療においても使用されている（米国特許第５，７１９，０５４号）。ＣＭＶに基づくベクターも含まれる（米国特許第５，５６１，０６３号）。

【００７６】

酵母菌の発現のために、構成プロモーターまたは誘導プロモーターを含有する多くのベクターを使用することができる（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（分子生物学における最新のプロトコル）、第２巻、第１３章、オーズベル（Ａｕｓｂｅｌ）ら編、１９８８年、グリーン・パブリッシュ（Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈ）協会（Ａｓｓｏｃ）＆ウィリー・インターサイエンス（Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ）、グラント（Ｇｒａｎｔ）ら著「酵母菌の発現および分泌ベクター（Ｅｘｐｒｅｓｓｏｎ ａｎｄ Ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｙｅａｓｔ）」、酵素学における方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ）、第１５３巻所収、ｐｐ．５１６～５４４、１９８７年、ウー（Ｗｕ）アンド・グロスマン（Ｇｒｏｓｓｍａｎ）編（３）、１９８７年、アカデミック・プレス（Ａｃａｄ．Ｐｒｅｓｓ）、ニューヨーク、グローバー（Ｇｌｏｖｅｒ）著、ＤＮＡクローニング、第ＩＩ巻（ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｖｏｌ．ＩＩ）、第３章、１９８６年、ＩＲＬプレス（Ｐｒｅｓｓ）、ワシントンＤ．Ｃ．、ビター（Ｂｉｔｔｅｒ）著「酵母菌における異種遺伝子発現（Ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ Ｙｅａｓｔ）」、酵素学における方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ）、第１５２巻、ｐｐ．６７３～６８４、ベルガー（Ｂｅｒｇｅｒ）とキンメル（Ｋｉｍｍｅｌ）編、１９８７年、アカデミック・プレス（Ａｃａｄ．Ｐｒｅｓｓ）、ニューヨーク、および酵母菌の分子生物学（Ｔｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｙｅａｓｔ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、ストラテム（Ｓｔｒａｔｈｅｍ）ら編、１９８２年、コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ）、第１巻、第ＩＩ巻）。ＡＤＨまたはＬＥＵ２などの構成酵母プロモーター、またはＧＡＬなどの誘導プロモーターを用いてもよい（「酵母におけるクローニング（Ｃｌｏｎｉｎｇ ｉｎ Ｙｅａｓｔ）」、Ｒ．ロスステイン（Ｒｏｔｈｓｔｅｉｎ）、ＤＮＡクローニング。実践的方法（ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ．Ａ Ｐｒａ

ｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ）、第１１巻、第３章所収、Ｄ．Ｍ．グローバー（Ｇｌｏｖｅｒ）編、１９８６年、ＩＲＬプレス（Ｐｒｅｓｓ）、ワシントンＤ．Ｃ．）。あるいは、例えば、相同性組換えによって、外来核酸配列の酵母染色体への一体化を促進するベクターが当業界で周知であり、これを用いることができる。挿入ポリヌクレオチドがより従来型の酵母発現ベクターに長すぎる場合（例えば、約１２ｋｂ超）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）が一般的に用いられる。ポリヌクレオチドはｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現のために発現ベクターに挿入することができ（例えば、市販されているｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写／翻訳キットを用いて）、または適切な核酸の適切なｉｎ　ｖｉｖｏ細胞、器官、組織、または生物への転移によって原核生物または真核生物のいずれかにおける発現を促進するプロモーター配列を含有する発現ベクターに挿入することができる。

【００７７】

本明細書で用いられる「組換え遺伝子（ｔｒａｎｓｇｅｎｅ）」は、人工的に宿主細胞に挿入されるポリヌクレオチドの一部であり、その細胞から発達する生物の一部となる。組換え遺伝子は、１つ以上のプロモーター、および選択されたＤＮＡに操作可能に結合される選択されたＤＮＡの発現に必要なイントロンなど他のＤＮＡを含むことができ、エンハンサー配列を含みうる。組換え遺伝子は、トランスジェニック生物と部分的または完全に異種（すなわち外来）であるポリヌクレオチドを含み、または生物の内在性遺伝子と相同性の遺伝子を示しうる。組換え遺伝子は、宿主細胞のゲノムに一体化し、自己複製プラスミドとして維持されうる。

【００７８】

本明細書で用いられる「宿主細胞」は、増殖し、転写し、コードポリペプチドを発現しうるポリヌクレオチドが挿入される細胞である。この用語は、対象宿主細胞の子孫をも含む。すべての子孫が親細胞と同一とはいえないと理解されるが、それは複製中に生じる変異がありうるためである。宿主細胞としては、細菌、酵母、昆虫、および哺乳動物の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、組換えバクテリオファージポリヌクレオチド、プラスミド核酸、またはコスミド核酸発現ベクターで形質転換された細菌、組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母、組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ、タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）を感染させた、または組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミド）で形質転換された植物細胞系、組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系、または組換えウイルス発現ベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス）を感染させた動物細胞系、または安定した発現のために人工的に作り出された形質転換動物細胞系が挙げられる。

【００７９】

本発明のポリペプチドを長期間発現させるために、安定した発現が好ましい。したがって、複製細胞のウイルス起源を含有する発現ベクターを用いて、適切な制御要素（例えば、プロモーター／エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等）によって制御される核酸で形質転換することができる。特定の理論によって束縛されること、または限定されることは望まないが、哺乳動物細胞における発現ベクターの安定した維持は、宿主細胞の染色体へのベクターの一体化によって生じると考えられている。必要に応じて、発現ベクターは、選択的圧力に耐性を与える選択マーカーをコードする遺伝子や、遺伝子が細胞に導入されたことを示すレポーターをコードする遺伝子を含むことができ、それによってベクターを有する細胞が識別され、成長させられ、増殖される。本明細書で用いられる「レポーター遺伝子」は、その発現が分析されうる遺伝子を意味し、かかる遺伝子としては、限定されることなく、ｌａｃＺ、アミノ酸生合成遺伝子、例えば、酵母ＬＥＩ２遺伝子、ルシフェラーゼ、または哺乳動物クロラムフェニコールトランスアセチラーゼ（ＣＡＴ）遺伝子が挙げられる。レポーター遺伝子は、染色体に一体化することができ、または自己複製プラスミド（例えば、酵母２ミクロンプラスミド）に担持されうる。また、選択可能なマーカーは、本発明のポリヌクレオチドを含有する第１ベクターとともに宿主細胞に同時トランスフェクションされる第２ベクター上に存在してもよい。

【００８０】
アミノグリコシドＧ４１８に対する抵抗性を与えるネオマイシン遺伝子（コルベレ－ガラピン（Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎ）ら、Ｊ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９８１年（１５０）、ｐ．１）、およびハイグロマイシンに対する抵抗性を与えるハイグロマイシン遺伝子（サンテレ（Ｓａｎｔｅｒｒｅ）ら、Ｇｅｎｅ（遺伝子）、１９８４年（３０）、ｐ．１４７）を含むがこれに限定されない、多くの選択系を用いることができる。最近、別の選択可能な遺伝子、すなわち、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にするｔｒｐＢ、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にするｈｉｓＤ（ハルトマン（Ｈａｒｔｍａｎ）ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９８８年（８５）、ｐ．８０４７）、およびオルニチンデカルボキシラーゼインヒビター、２－（ジフルオロメチル）－ＤＬ－オルニチン、ＤＦＭＯに対する抵抗性を与えるＯＤＣ（オルチニンデカルボキシラーゼ）（マクコログ（ＭｃＣｏｌｏｇｕｅ）著、分子生物学におけるカレントコミュニケーション（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ）所収、１９８７年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）編）が記載されている。

【００８１】
本明細書で用いられる「形質転換」なる用語は、細胞に対して外因性のポリヌクレオチド（例えば、組換え遺伝子）の取込み後の細胞における遺伝子変化を意味する。したがって、「形質転換細胞」は、組換え技術によってポリヌクレオチドが導入されている細胞、またはその子孫である。形質転換細胞は、人間全体を含むことはない。宿主細胞の形質転換は、当業者に周知の従来の方法によって行うことができる。宿主細胞が真核生物である場合、ＤＮＡ形質転換の方法は、例えば、リン酸カルシウム、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソーム、およびウイルスベクターを含む。真核生物細胞は、本発明のポリヌクレオチド配列またはそのフラグメント、および本明細書に記載され、または当業界で周知の選択可能なマーカーをコードする第２ＤＮＡ分子との同時形質転換も可能である。別の方法は、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）またはウシ乳頭腫ウイルスなどの真核生物ウイルスベクターを使用し、真核生物細胞を一時的に感染または形質転換し、タンパク質を発現させることである（例えば、Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ　Ｖｉｒａｌ　Ｖｅｃｔｏｒｓ（真核生物ウイルスベクター）、１９８２年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）、グルッツマン（Ｇｌｕｔｚｍａｎ）編）。宿主が原核生物（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））である場合、対数増殖後に収穫された細胞からＤＮＡ取込み能力があるコンピテント細胞を調製し、その後に当業界で公知の方法を用いて$CaCl_2$によって処理することができる。原核生物の形質転換は、宿主細胞の原形質融合によっても行うことができる。

【００８２】
本発明と同一のものを含有するキメラポリペプチド、ポリヌクレオチド、および発現ベクターは、標準的な方法を用いてリポソーム内にカプセル化し、細胞または全生物に導入することができる。ポリヌクレオチドの送達には陽イオンリポソームが好ましい。タンパク質およびポリヌクレオチドを含めて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでの種々の組成物を導入するためのリポソームの使用は、当業者には周知である（例えば、米国特許第４，８４４，９０４号、同第５，０００，９５９号、同第４，８６３，７４０号、および同第４，９７５，２８２号）。

【００８３】
リポソームは、対応する細胞受容体が同定されているポリペプチドなどのリガンドを、リポソーム調製の際に添加することによって所定の細胞型または組織にターゲティングすることができる。例えば、ＣＤ４＋細胞に感染するウイルスの場合、ＣＤ４＋細胞は適切なターゲットであり、ＨＩＶ　ｇｐ１２０は、本明細書に記載されたキメラポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含有するリポソームの細胞内導入のための適切なリガンドであり

うる。モノクローナル抗体もターゲティングのために用いることができ、多種多様の細胞表面に対して特異的な多くのかかる抗体が当業者には周知であり、入手可能である。選択されたリガンドは、プリフォームされたリポソーム中の脂質アンカーに共有結合されているか、またはリポソーム調製中に取込まれる（リー（Ｌｅｅ）とロー（Ｌｏｗ），Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、１９９４年（２６９）３、ｐ．１９８、リーとロー、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔｕ、１９９５年（１２３３）、ｐ．１３４を参照）。

【００８４】

本発明と同一のものをコードするキメラポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、全生物に導入することができる。特に、コレセプターに結合するウイルスコートポリペプチドを含有するキメラポリペプチドについては、本発明のキメラポリペプチドを発現するトランスジェニック動物が、キメラ発現の長期効果の試験、および発現キメラポリペプチドは対応するウイルスによって感染を保護するか抑制するかの判定に有用であろう。

【００８５】

したがって、別の実施形態において、本発明は、キメラポリペプチドを発現するヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。好ましい動物は、対応する受容体ポリペプチド配列が周知であるウイルスに感染しやすい動物である。好ましい動物は、本明細書に記載された、ヒト以外の霊長類（例えば、マカクザル、チンパンジー、サル、テナガザル、オランウンターン等）、家畜類などの哺乳動物である。

【００８６】

「トランスジェニック動物」なる用語は、その体細胞または生殖細胞系が、組換えウイルスのマイクロインジェクションまたは感染によるなど、細胞より小さいレベルでの意図的な遺伝子操作によって、直接的または間接的に受け取られる遺伝子情報を有する動物を指す。「トランスジェニック」なる用語は、本明細書に記載されているように、遺伝子操作されたトランスジェニック動物から得られた細胞または組織（すなわち「トランスジェニック細胞」「トランスジェニック組織」）をさらに含む。本発明の文脈において、「トランスジェニック動物」は、伝統的な交配によって、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ授精で生成される動物を包含せず、１個以上の細胞が組換えＤＮＡを受容する動物を示す。トランスジェニック動物は、組換え遺伝子に関してヘテロ接合またはホモ接合のいずれかでありうる。トランスジェニック動物を生成するための方法は当業界で公知である（例えば、米国特許第５，７２１，３６７号、同第５，６９５，９７７号、同第５６５０，２９８号、および同第５６１４，３９６号を参照）。

【００８７】

本明細書に記載されたキメラポリペプチドを用いて、抗体などの別途の試薬を生成することができる。本発明の抗体は、本明細書に記載された種々の治療方法において有用である。例えば、免疫性を与えられた対象において生成された抗体は、ウイルス感染に対して対象を保護し、あるいは、レシピエント対象に転移され、感染に対して第２の対象を受動的に保護することができる。ウィルスコート・ポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列との間に複合体形成時に曝露されるエピトープに結合する抗体も生成することができる。さらに、本発明の抗体は、診断方法、精製方法、およびスクリーニング方法（例えば、隠れたエピトープ、コレセプター等の識別）において有用である。

【００８８】

したがって、本発明によれば、本明細書に記載された複合体形成時に曝露される隠れたエピトープに対して特異的な抗体を含めて、キメラポリペプチドに結合する抗体が提供される。１つの実施形態において、抗体はｉｎ　ｖｉｔｒｏでの異なる地理的分岐群からの多数のウイルス分離株およびウイルスを中和する（「広範中和」と呼ぶ）。別の実施形態において、抗体はｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでウイルス感染を抑制し、予防し、遮断する。これらの実施形態の種々の態様において、中和されるウイルスは、本明細書に記載されたＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２免疫不全ウイルスを含む免疫不全ウイルスである。ポリクローナル抗体、異なるエピトープ特異性を有するプールされたモノクローナル抗体、および別個のモノクローナル抗体調製物を含む抗体も提供される。

【００８９】
キメラポリペプチドに対する抗体は、キメラポリペプチドを動物に投与することによって生成される。これらの抗体は、当業界で公知の方法を用いて生成、分離、および精製することができる。したがって、別の実施形態において、本発明は、キメラポリペプチドに対する抗体を生成する方法を提供する。本発明の方法は、キメラポリペプチドを対象に投与し、キメラポリペプチドに結合する抗体を分離する工程を含む。１つの実施形態において、生成された抗体は、ウィルスコート・ポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列との間の結合時に曝露される隠れたエピトープに結合する。

【００９０】
抗体は、ウィルスコート・ポリペプチド配列（例えば、エンベロープポリペプチド配列）と受容体ポリペプチド配列が互いに結合する場合に曝露される隠れたエピトープに結合することが好ましい。例えば、ＨＩＶエンベロープポリペプチド配列ｇｐ１２０は、ＣＤ４受容体ポリペプチド配列への結合時にエピトープを曝露し、曝露されたエピトープに対する抗体はＨＩＶの広範な中和に至りうる。かかるエピトープは、異なるウィルス分離株および地理的分岐群の中に共存し、これらのエピトープに方向づけられた抗体の広域中和活性の原因となりうる。

【００９１】
理論によって束縛されることは望まないが、ＣＤ４結合の非存在下に、隠れたエピトープは曝露されず、または抗原性ではない。本明細書で用いられる「エピトープ」なる用語は、抗体のパラトープが結合する抗原上に抗原性決定因子を指す。エピトープ決定因子は通常、アミノ酸または炭水化物側鎖などの分子の化学的に活性な表面群からなり、通常、特異的な３次元構造的特性、および特異的変化特性を有する。本明細書で用いられる「隠れた（ｃｒｙｐｔｉｃ）」なる用語は、その特徴または特性が明らかになるために、構造的または配座の変化を必要とする特性または特徴を指し、変化がおこらなければ該特徴または特性は「隠されて」いる。隠れたエピトープは、ウイルスコートタンパク質または受容体ポリペプチド配列のいずれかに存在しうる。

【００９２】
「抗体」なる用語は、本明細書に記載されたキメラポリペプチド中に存在するエピトープ決定因子への結合能がある無傷分子のほか、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖなど、そのフラグメントを含む。他の抗体フラグメントは、そのフラグメントがその抗原と選択的に結合する能力を保持している限り、含まれる。本発明の抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖ）は、抗体のタンパク質分解加水分解、例えば、全抗体のペプシン消化によって調製することができる。開示されたキメラポリペプチドに結合する抗体は、無傷キメラポリペプチドまたはそのフラグメントを免疫抗原として用いることによって調製することができる。キメラポリペプチドフラグメントの場合、ウイルスコートポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列は、互いに結合する能力を維持し、存在する隠れたエピトープが曝露されるようになることが好ましい。動物を免疫化するために用いられるキメラポリペプチドは、翻訳されたポリペプチド由来であり、または化学的に合成され、必要に応じて、担体に接合することができる。免疫化ペプチドに化学的に結合される一般的に使用されるかかる担体としては、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、サイログロブリン、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、および破傷風トキソイドが挙げられる。

【００９３】
モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって製造される（参考によって本明細書に援用される、コーラー（Ｋｏｈｌｅｒ）ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９７５年（２５６）、ｐ．４９５、およびハーロー（Ｈａｒｌｏｗ）ら、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（抗体：実験マニュアル）、１９８８年、ｐ．７２６、コールド・スプリング・ハーバー出版（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｕｂ．）編）。簡単に言えば、抗体を含む組成物をマウスに注射し、血清サンプルを分析することによって抗体産生の存在を確認し、脾臓を除去してＢリンパ球を得、Ｂリンパ球を骨髄腫細

胞と融合してハイブリドーマを生成し、ハイブリドーマをクローニングし、抗原に対する抗体を生成する陽性クローンを選択し、ハイブリドーマ培養から抗体を分離することによってモノクローナル抗体を得ることができる。モノクローナル抗体は、例えば、プロテインＡセファロースによるアフィニティークロマトグラフィー、サイズ除外クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーを含む種々の定着した方法によってハイブリドーマ培養から分離し、精製することができる（例えば、コリガン（Ｃｏｌｉｇａｎ）ら著「ウサギ、ラット、マウス、およびハムスターにおけるポリクローナル抗血清の生成（Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｏｌｙｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｓｅｒａ ｉｎ Ｒａｂｂｉｔｓ，Ｒａｔｓ，Ｍｉｃｅ ａｎｄ Ｈａｍｓｔｅｒｓ）」、免疫学における最新のプロトコール（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）所収、§§２．７．１～２．７．１２および§§２．９．１～２．９．３、およびバーンズ（Ｂａｒｎｅｓ）ら著「免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）の精製（Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｇ（ＩｇＧ））」、分子生物学における方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）所収、１９９２年、第１０巻、ｐｐ．７９～１０４、ヒューマナ・プレス（Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ）を参照）。ポリクローナル抗体の調製は当業者に公知である（例えば、参考によって本明細書に援用される、グリーン（Ｇｒｅｅｎ）ら著「ポリクローナル抗血清の生成（Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｏｌｙｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｓｅｒａ）」、免疫化学プロトコール（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ）所収、１９９２年、ｐｐ．1～５、マンソン（Ｍａｎｓｏｎ）編、ヒューマナ・プレス（Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ）、ハーローら（１９９８年）、上掲書、およびコリガンら（１９９２年）、上掲書、§２．４．１を参照）。

【００９４】

治療目的のために、１つの種において生成されるキメラポリペプチドに対する抗体をヒト化し、その抗体が、例えば、受動免疫のために、宿主に投与される場合に免疫反応を誘発しないようにすることができる。一般に、ヒト化抗体は、ヒト以外の一定領域をヒトの一定領域で置換することによって生成される。かかる抗体ヒト化法は当業界で周知であり、本発明の方法において特に有用である（モルシオン（Ｍｏｒｒｓｉｏｎ）ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９８４年（８１）、ｐ．６８５１、タケダ（Ｔａｋｅｄａ）ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９８５年（３１４）、ｐ．４５２、シンガー（Ｓｉｎｇｅｒ）ら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１９９３年（１５０）、ｐ．２８４４）。

【００９５】

キメラポリペプチドを結合する抗体、特に、隠れたエピトープを結合する抗体は、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏで（すなわち、対象における）ウイルスを中和する。したがって、かかる抗体は、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏでウイルス感染を予防または抑制することができ、感染に伴い症状の一部または全部を改善しうる。かかる抗体は、一対象において生成し、次いで別の対象に、すなわち、受動免疫療法のために導入することができる。あるいは、キメラポリペプチドを結合する抗体は、対象において生成される場合、その対象を感染から保護し、感染に伴う症状の一部または全部を改善することができる。

【００９６】

したがって、本発明によれば、対象におけるウイルス感染を抑制し、予防し、改善するたけの方法が提供される。一実施形態において、本発明の方法は、キメラポリペプチドに結合する抗体の有効量を対象に投与し、それによって対象における感染を予防し、抑制する工程を含む。別の実施形態において、本発明の方法は、キメラポリペプチドの有効量を対象に投与し、それによって対象におけるウイルス感染を予防し、抑制するために十分な免疫反応を生成する工程を含む。さらに別の実施形態において、本発明の方法は、本発明のキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの有効量を対象に投与する工程を含む。種々の態様において、キメラポリペプチドは、本明細書に記載された免疫不全ウィルスエンベロープポリペプチドを含有する。

【００９７】
キメラポリペプチドまたはキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが投与される対象におけるウィルス感染を抑制し、予防し、改善するための方法において、免疫反応も生成することができる。免疫反応は、本質的に液性である可能性が高いが、キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与することによりＣＴＬ反応を誘発しうる。本発明の方法は、必要に応じて、他のウイルス療法と併用することもできる。
【００９８】
「有効量」は、対象におけるウイルス感染を抑制し、予防し、または改善するのに十分となり、または対象における免疫反応を生成するのに十分な量である。したがって、キメラポリペプチドの有効量は、コートタンパク質がそれに基づくポリペプチドまたはウイルスに対する免疫反応を導き出す量でありうる。ウイルスにすでに感染した対象に投与される有効量も、ウイルス負荷を減少し、またはＣＤ４＋細胞の数を増加させる量でありうる。有効量は、感染した対象から別の（非感染または感染）対象へのウイルスの感染を抑制する量でありうる。
【００９９】
キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が対象に投与される本発明の方法において、キメラポリペプチドに対するＣＴＬ反応が、対応するコートポリペプチド配列を含有するウイルスに対して生成されうる。
【０１００】
本発明のキメラポリペプチド、ポリヌクレオチド、および抗体は、ヒトを含む対象に投与されるため、本発明は、開示されたキメラポリペプチド、ポリヌクレオチド、および抗体を含む医薬組成物も提供される。したがって、対象に投与される組成物は、「薬学的に許容される」または「生理学的に許容される」製剤となる。
【０１０１】
本明細書で用いられる「薬学的に許容される」または「生理学的に許容される」は、好ましくは過剰な有害な副作用（例えば、悪心、頭痛等）なしに、対象に投与されうる担体、希釈剤、賦形剤などを指す。投与のためのかかる製剤としては、滅菌水性または非水性溶液、懸濁液、および乳剤が挙げられる。非水性溶剤の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体としては、水、アルコール／水溶液、乳剤、または食塩水や緩衝溶剤を含む懸濁液が挙げられる。賦形剤としては、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース、塩化ナトリウム、乳酸化リンガーまたは不揮発性油が挙げられる。静脈内賦形剤としては、液体および栄養補充薬、電解補充薬（リンガーデキストロースに基づくものなど）などが挙げられる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガス等などの保存剤および他の添加剤も存在しうる。当業界で周知の対象に投与するために適した種々の医薬組成物が、本発明において適用可能である（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（レミントンの医薬科学）、第１８版、１９９０年、マック・パブリッシング社（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．）（ペンシルバニア州イーストン（Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ））、Ｔｈｅ Ｍｅｒｃｋ Ｉｎｄｅｘ、第１２版、１９９６年、メルク・パブリッシング・グループ（Ｍｅｒｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｇｒｏｕｐ）（ニュージャージー州ホワイトハウス（Ｗｈｉｔｅｈｏｕｓｅ，ＮＪ））。
【０１０２】
投与組成物の作用期間の管理または送達の制御により、ポリエステル、ポリアミン酸、ヒドロゲル、ポリビニルピロリドン、エチレン－酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン、またはラクチド／グリコリドコポリマー、ポリラクチド／グリコリドコポリマー、またはエチレン酢酸ビニルコポリマーなどの粒子またはポリマー物質への組成物の組込みよって達成しうる。組成物の放出速度は、かかる高分子の濃度または組成を変更することによって制御されうる。コロイド分散系としては、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、および水中油乳剤、ミセル、混合ミ

セル、およびリポソームを含む脂質系が挙げられる。

【０１０３】

本発明の方法によって投与される組成物は、注射によって、ゆっくり時間をかけた灌流によって、ボーラス投与によって（例えば、針指し創傷から生じるＨＩＶ感染に対する受動保護の場合）、または微細加工植込み式装置によって非経口的に投与することができる。組成物は、吸入によって、静脈内、腹腔内、筋内、皮下、腔内（例えば、膣または肛門）、経皮、局所、または血管内投与することができる。組成物は、複数回投与することができる。ウイルス感染または伝播を治療、抑制、または予防するために、または免疫反応を誘発するために必要な用量または「有効量」は、感染の症状の一部または全部を改善するのに十分となることが好ましいが、感染の進行または悪化を予防することも、ＨＩＶを含めて多くのウイルス感染には十分な成果である。有効量は、当業者によって容易に決定しうる（例えば、アンセル（Ａｎｓｅｌ）ら著、医薬的ドラッグ・デリバリー・システム（Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、５版（リー（Ｌｅａ）とフェビガー（Ｆｅｂｉｇｅｒ）（１９９０年）、ジェナロ（Ｇｅｎｎａｒｏ）編）を参照）。

【０１０４】

本発明のキメラポリペプチド、ポリヌクレオチド、および抗体は、診断目的にも有用である。例えば、感染のためにコレセプターを利用するウイルス由来のウイルスコートポリペプチド配列を有するキメラポリペプチドを用いて、キメラポリペプチドに対する低下した結合アフィニティーを有するコレセプターを発現する対象を識別することができる。低下した結合アフィニティーを有する対象は、ウイルスによる感染リスクの減少を示す可能性が高くなる。あるいは、キメラポリペプチドに対する増大した結合アフィニティーを有するコレセプターを発現する対象は、ウイルス感染のリスクが増大することになる。このようにして、ウイルス感染に対するリスクの減少または増大を示す対象を識別することができる。例えば、ＨＩＶｇｐ１２０－ＣＤ４からなるキメラポリペプチドに対するアフィニティーの増大または減少を示すＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４を発現する対象はそれぞれ、ＨＩＶ感染のリスクが増大または減少することになる。したがって、かかる方法は、予後の評価に有用であり、高アフィニティーの結合コレセプターを発現する対象の予後は不良の可能性がある。

【０１０５】

コレセプターを利用するウイルスのウイルスコートポリペプチド配列を有する本明細書に開示されたキメラポリペプチドの場合、かかるキメラポリペプチドは、ウイルスのコレセプターへの結合を調節する物質を同定するために有用である。かかるキメラポリペプチドは、キメラポリペプチド内の受容体配列へのウイルスコートポリペプチド配列の分子内相互作用／結合を調節する物質を同定するためにも有用である。したがって、コレセプターを利用しえないウイルスのコートポリペプチドを含有する記載されたキメラポリペプチドを用いて、キメラ分子内の受容体配列へのコート配列の結合を調節する物質を同定することができる。

【０１０６】

したがって、本発明によれば、ウイルスとウイルスコレセプターとの結合を調節する物質を同定する方法、およびウイルスとウイルス受容体との結合を調節する物質を同定するための方法が提供される。

【０１０７】

１つの実施形態において、本発明は、被検物質の存在下および非存在下で、キメラポリペプチドとコレセプターを結合させる条件下で、キメラポリペプチドをウイルスコレセプターと接触させる工程と、被検物質の存在下および非存在下の結合を検出する工程とを含む。別の実施形態では、本発明の方法は、分子内複合体を形成するキメラポリペプチドを被検物質と接触させる工程と、キメラ内のウイルスコートポリペプチド配列と受容体ポリペプチド配列との結合を検出する工程とを含む。被検物質の存在下の結合の量の減少により、ウイルスとウイルスコレセプターまたは受容体との相互作用／結合を抑制する物質が同

定される。被検物質の存在下の結合の増大により、ウイルスとウイルスコレセプターまたは受容体との相互作用／結合を刺激する物質が同定される。

【０１０８】

接触は、溶液中、固相中、無傷細胞上、またはヒト以外の霊長類などの生物内で起こりうる。種々の実施形態において、ウイルスは、ＨＩＶなどの免疫不全ウイルスであり、コレセプターは、ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４などのケモカインである。細胞侵入のためにコレセプターを利用するウイルスの結合は、その後の感染、ウイルス増殖、およびそれらから結果として生じる最終的な病理的症状にとって重要な工程である。したがって、別の実施形態では、ウイルスの細胞侵入、感染、および増殖を抑制する物質、およびウイルス感染に伴う症状を改善する物質を同定するための方法が提供される。かかる物質を同定するために本発明の方法において、被検物質は、キメラポリペプチドをコレセプターポリペプチドと接触させた後、あるいは、キメラポリペプチドをコレセプターポリペプチドと接触させる前に添加されうる。

【０１０９】

候補の物質としては、抗体、抗ウイルス薬、コレセプターポリペプチド配列（例えば、ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４由来）、ペプチド類似体、またはそれらの活性フラグメントが挙げられる。候補の物質は、分子量が５０ダルトンを超え、かつ約２，５００ダルトン未満である小有機化合物のような有機分子も包含する。候補の物質は、タンパク質との構造的相互作用、特に水素結合に必要な官能基を含み、通常、少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシル、またはカルボキシル基、好ましくは、機能的化学基の少なくとも２つを含む。候補の物質は多くの場合、環状カーボン（ｃｙｃｌｉｃａｌ　ｃａｒｂｏｎ）構造または複素環構造、および／または１種以上の上記の官能基で置換される芳香族または多芳香族構造を含む。候補の物質はペプチド類、糖類、脂肪酸ステロイド類、プリン類、ピリミジン類、誘導体、構造的類似体、またはそれらの組合せを含むが、これらに限定されない生体分子の中にも見出される。

【０１１０】

候補の物質は、合成または天然化合物のライブラリーを含めて、多種多様の供給元から得られる。例えば、ランダム化オリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含めて、多種多様の有機化合物および生体分子のランダムおよび自在合成のために多数の手段が利用可能である。あるいは、細菌、真菌、植物、および動物の抽出物の形における天然化合物のライブラリーが入手可能または容易に生成される。さらに、天然または合成的に生成されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的、および生化学的手段によって容易に改変され、これを用いて組合せライブラリーを生成することができる。周知の薬剤は、アシル化、アルキル化、エステル化、アミジ化（ａｍｉｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ）等などの自在またはランダム化学的改変にかけ、構造的類似体を得ることができる。方法により結合が検出される場合、１つ以上の分子を標識に結合し、ここで標識は直接的または間接的に検出可能なシグナルを提供する。種々の標識としては、ラジオアイソトープ、蛍光、化学ルミネセンス、酵素、特異的結合分子、粒子、例えば、磁粉などが挙げられる。特異的結合分子としては、ビオチンとストレプトアビジン、ジゴキシンと抗ジオキシン等などの対が挙げられる。特異的結合膜については、相補膜は通常、周知の方法に従って、検出を提供する分子で標識される。

【０１１１】

種々の他の試薬をアッセイに含めることができる。これらには、最適なタンパク質－タンパク質結合を促進し、かつ／または非特異的またはバックグラウンド相互作用を削減するために用いられる塩、中性タンパク質、例えば、アルブミン、界面活性剤等などの試薬が含まれる。プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌薬等など、アッセイの効率を改善する試薬を用いることができる。化合物の混合は、必要な結合が提供される順序で添加される。インキュベーションは、通常、４℃～４０℃の適切な温度下に行われる。インキュベーション期間は最適な活性のために選択されるが、迅速な高処理量のスクリーニングを促進するように最適化することもできる。通常、０．１～１時間で十分

であろう。

【０１１２】

種々の実施形態において、ウイルスは、本明細書に記載されているように、ＨＩＶ、ＨＴＬＶ、ＳＩＶ、ＦｅＬＶ、ＦＰＶ、またはヘルペスウイルスなどの免疫不全ウイルスである。追加の実施形態において、コレセプターは、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ４、ＣＣＲ－２ｂ、ＣＣＲ３、ＣＣＲ８、Ｖ２８／ＣＸ３ＣＲ１、ＵＳ２８（ヘルペスウイルスコードするケモカイン様受容体）、ＳＴＲＬ３３／ＢＯＢ／ＴＹＭＳＴＲ、ＧＰＲ１５／Ｂｏｎｚｏ、またはＧＰＲ１ポリペプチド配列である。

【０１１３】

本明細書に記載された本発明の方法によって同定された物質は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでの細胞のウイルスの結合または感染を抑制するその能力についてさらに試験することができる。したがって、本発明によれば、細胞のウイルス感染を抑制する物質を同定する方法が提供される。本発明の方法は、被検物質の存在および非存在下に、キメラポリペプチドとコレセプターを結合させる条件下に、ウイルス感染しやすい細胞を感染性ウイルスと接触させる工程と、被検物質が細胞のウイルス結合または感染を抑制するかどうかを判定する工程と、それによってウイルス感染を抑制する物質を同定する工程とを含む。種々の実施形態において、被検物質は、感染性ウイルス粒子との細胞の接触前後に添加される。この方法はまた、非ヒト霊長類などの任意の他の動物に行われうる。

【０１１４】

本明細書に記載されたキメラポリペプチドは、新規なコレセプターを同定し、またはコレセプターとしてのタンパク質を特徴づけるためにも有用である。このようにして、ウイルスおよびその後のウイルスの病原性をよりよく理解することができ、それによって感染の治療の改善が可能となる。例えば、新規なコレセプターを同定し、またはコレセプター機能を特徴づけるための１つの方法がツーハイブリッド系であり、これにより、ポリペプチドを相互作用させることによって発現が誘導されるレポーターの活性化を通じて、タンパク質－タンパク質の相互作用を検出することができる。したがって、適切なキメラポリペプチドを酵母または哺乳動物のツーハイブリッド系におけるベイト配列として使用し、新規なコレセプターを含む相互作用タンパク質を同定する目的にライブラリーをスクリーニングすることができる。タンパク質－タンパク質相互作用を検出する十分に確立された生化学的方法（例えば、カラムクロマトグラフィー、勾配クロマトグラフィー、共免疫沈澱分析等）も、コレセプターの同定または潜在的なコレセプター機能を有するタンパク質の特徴づけにおいて適用可能である。

【０１１５】

コレセプターを結合するキメラポリペプチドは、コレセプター結合部位を同定するためにも有用である。例えば、コレセプターポリペプチドフラグメントを生成し、フラグメントを適切なキメラポリペプチドと接触させることによる。接触は、溶液中、（例えば、共沈殿）、固相中（例えば、アフィニティーカラム）、または無傷細胞上（例えば、細胞表面上のコレセプターフラグメントを接触させ、コレセプターフラグメントがキメラポリペプチドの細胞への結合を抑制するかどうを検出する）。コレセプター結合部位は、同定されると、これを抗ウイルス剤として、例えば、感染を治療するために用いることができる。

【０１１６】

他に特に規定がなければ、本明細書で用いられた技術用語および学術用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと同様または同等の方法および材料は、本発明の実施または試験において用いることはできるが、適切な方法および材料は以下に記載されている。本明細書で言及されたすべての刊行物、特許出願、特許、および他の文献は、その全体が参考によって援用される。不一致の場合、定義を含めて本明細書は調整される。また、材料、方法、および実施例は例示されているだけであり、限定は意図されていない。本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、および特許請求の範囲から明らかであろう。本発明はさらに以下の実施例において記載されているが、これらにより特許請求の範囲に記載された本発明の範

囲が限定されることはない。

【実施例】

【０１１７】

実施例Ｉ

本実施例では、一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドＦＬＳＣ、ＴｓＳＣ、ＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ、およびＲＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９をコードするポリヌクレオチドの構成が記載される。一本鎖複合体を構築する方法は、２０～３０個のアミノ酸リンカー配列のｇｐ１２０のＣ末端とＣＤ４のＮ末端との間への配置に基づく。スイス（Ｓｗｉｓｓ）ＰＤＢビュアーを用いた可溶性ＣＤ４および１７ｂに結合された改変ｇｐ１２０の結晶構造の分析（ドウォン（Ｄｗｏｎｇ），Ｐ．Ｄ．ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９８年（３９３）、ｐ．６４８～５９）は、キメラ分子がｇｐ１２０－ＣＤ４複合体の形成をもたらす分子内相互作用の能力のあることを示した。以下の順序でそれぞれのコード配列を配置することによって、ｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドをコードする一本鎖核酸（配列番号：１）を構成した：（１）５’末端で、マクロファージ刺激ＨＩＶ、ＢａＬのｇｐ１２０をコードする合成コドン、（２）グリシン、アラニン、およびセリンからなる２０アミノ酸リンカーをコードする配列、（３）可溶性ＣＤ４ドメイン１および２（Ｄ１Ｄ２）の配列、および（４）３’末端で、ＦＬＳＣ対するｃ－ｍｙｃ腫瘍遺伝子由来の短いポリペプチドをコードする配列。ＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔヌクレオチド配列（配列番号：３）は、アルギニンがトレオニンで置換されているｇｐ１２０のｃ末端で変異を有するタンパク質（配列番号：４）をコードする。ＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９（配列番号：５）は、ＣＤ４　Ｄ１Ｄ２領域が、ＣＤ４　Ｄ１Ｄ２領域の機能的活性を再現するペプチドをコードするＣＤ４Ｍ９の配列コーディングで置換されている本発明のキメラポリペプチド（配列番号：６）のヌクレオチド配列の変化をさらに含む。ｒｅｖ独立的に高レベルの発現が可能であるため（ハース（Ｈａａｓ），Ｊ．ら、Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．、１９９６年（６：３）、ｐ．１５～２４）コドン最適化ｇｐ１２０配列を用いた。使用したヒトＣＤ４は、Ｔ４－ｐＭＶ７由来であった（マドン（Ｍａｄｄｏｎ），Ｐ．Ｊ．ら、Ｃｅｌｌ、１９８６年（４７）、ｐ．３３３～４８）、メリーランド州ベテスダ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）のＮＩＨ　ＡＩＤＳ試薬貯蔵部（ＮＩＨ　ＡＩＤＳ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｒｅｐｏｓｉｔｏｒｙ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ））。ｍｙｃポリペプチド配列によりキメラポリペプチドの便利な分析、精製、および他の操作が可能である。

【０１１８】

３種類の配列を含む完全なポリペプチドをＰＣＲによって生成し、強力な伸長因子促進剤（ＥＦ　１）を用いてｐＥＦ６（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に挿入し、発現を推進した。制限酵素部位をこの構築物（ｐＥＦ６－ＳＣＢａｌで指定）に導入し、他の免疫不全ウイルスの他のエンベロープ遺伝子との便利な交換を可能にした。

【０１１９】

簡単に言えば、プラスミドｐＭＲ１Ｗ１－９およびＴ４－ｐＭＶ７をテンプレートとして用いたＰＣＲによってＦＬＳＣを構成した。ｇｐ１２０順方向プライマーは、ＧＧＧ－ＧＧＴ－ＡＣＣ－ＡＴＧ－ＣＣＣ－ＡＴＧ－ＧＧＧ－ＴＣＴ－ＣＴＧ－ＣＡＡ－ＣＣＧ－ＣＴＧ－ＧＣＣ（配列番号：７）であり、逆方向プライマーは、ＧＧＧ－ＴＣＣ－ＧＧＡ－ＧＣＣ－ＣＧＡ－ＧＣＣ－ＡＣＣ－ＧＣＣ－ＡＣＣ－ＡＧＡ－ＧＧＡ－ＴＣＣ－ＡＣＧ－ＣＴＴ－ＣＴＣ－ＧＣＧ－ＣＴＧ－ＣＡＣ－ＣＡＣ－ＧＣＧ－ＧＣＧ－ＣＴＴ（配列番号：８）であった。ＣＤ４順方向プライマーは、ＧＧＧ－ＴＣＣ－ＧＧＡ－ＧＧＡ－ＧＧＴ－ＧＧＧ－ＴＣＧ－ＧＧＴ－ＧＧＣ－ＧＧＣ－ＧＣＧ－ＧＣＣ－ＧＣＴ－ＡＡＧ－ＡＡＡ－ＧＴＧ－ＧＴＧ－ＣＴＧ－ＧＧＣ－ＡＡＡ－ＡＡＡ－ＧＧＧ－ＧＡＴ（配列番号：９）であり、逆方向プライマーは、ＧＧＧ－ＧＴＴ－ＴＡＡ－ＡＣＴ－ＴＡＴ－ＴＡＣ－ＡＧＡ－ＴＣＣ－ＴＣＴ－ＴＣＴ－ＧＡＧ－ＡＴＧ－ＡＧＴ－ＴＴＴ－ＧＴＴ－ＣＡＧ－ＣＴＡ－ＧＣＡ－ＣＣＡ－ＣＧＡ－ＴＧＴ－ＣＴＡ－ＴＴＴ－ＴＧＡ－ＡＣＴ－Ｃ（配列番号：１０）であった。その結果得られるＰＣＲ生成物を、Ｋｐｎ１およびＰｍｅ１制限部位を用いてｐＥＦ６（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州カールスバッド（Ｃａｒｌ

ｓｂａｄ，ＣＡ））にサブクローン化した。
【０１２０】
ｐＥＦ６－ＴｃＳＣプラスミドを構成するために、ｐＥＦ６－ＦＬＳＣにおける完全長ｇｐ１２０発現配列をｇｐ１２０配列の切断型の種類（ＤＣ１ＤＣ５ＤＶ１Ｖ２）に交換した。切断型ｇｐ１２０は、ＧＧＧ－ＧＧＴ－ＡＣＣ－ＡＴＧ－ＣＣＣ－ＡＴＧ－ＧＧＧ－ＴＣＴ－ＣＴＧ－ＣＡＡ－ＣＣＧ－ＣＴＧ－ＧＣＣ－ＡＣＣ－ＴＴＧ－ＴＡＣ－ＣＴＧ－ＣＴＧ－ＧＧＧ－ＡＴＧ－ＣＴＧ－ＧＴＣ－ＧＣＴ－ＴＣＣ－ＴＧＣ－ＣＴＣ－ＧＧＡ－ＡＡＧ－ＡＡＣ－ＧＴＧ－ＡＣＣ－ＧＡＧ－ＡＡＣ－ＴＴＣ－ＡＡＣ－ＡＴＧ－ＴＧＧ（配列番号：１５）を順方向プライマーとして、ＧＧＧ－ＧＧＡ－ＴＣＣ－ＧＡＴ－ＣＴＴ－ＣＡＣ－ＣＡＣ－ＣＴＴ－ＧＡＴ－ＣＴＴ－ＧＴＡ－ＣＡＧ－ＣＴＣ（配列番号：１６）を逆方向プライマーとして用いて生成した。Ｖ１およびＶ２領域を、ＣＴＧ－ＴＧＣ－ＧＴＧ－ＡＣＣ－ＣＴＧ－ＧＧＣ－ＧＣＧ－ＧＣＣ－ＧＡＧ－ＡＴＧ－ＡＡＧ－ＡＡＣ－ＴＧＣ－ＡＧＣ－ＴＴＣ－ＡＡＣ－ＡＴＣ－ＧＧＣ－ＧＣＧ－ＧＧＣ－ＣＧＣ－ＣＴＧ－ＡＴＣ－ＡＧＣ－ＴＧＣ（配列番号：１７）を順方向プライマーとして、ＧＣＡ－ＧＣＴ－ＧＡＴ－ＣＡＧ－ＧＣＧ－ＧＣＣ－ＣＧＣ－ＧＣＣ－ＧＡＴ－ＧＴＴ－ＧＡＡ－ＧＣＴ－ＧＣＡ－ＧＴＴ－ＣＴＴ－ＣＡＴ－ＣＴＣ－ＧＣＣ－ＣＧＣ－ＧＣＣ－ＣＡＧ－ＧＧＴ－ＣＡＣ－ＧＣＡ－ＣＡＧ（配列番号：１８）を逆方向プライマーとして用いて除去した。
【０１２１】
ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９にクローン化するために用いられるＣＤ４Ｍ９配列（配列番号：１９）は、５’～３’プライマーＧＣＧ－ＧＣＣ－ＧＣＴ－ＴＧＣ－ＡＡＣ－ＣＴＧ－ＧＣＣ－ＣＧＣ－ＴＧＣ－ＣＡＧ－ＣＴＧ－ＣＧＣ－ＴＧＣ－ＡＡＧ－ＡＧＣ－ＣＴＧ－ＧＧＣ－ＣＴＧ－ＣＴＧ－ＧＧＣ－ＡＡＧ－ＴＧＣ－ＧＣＣ－ＧＧＣ－ＡＧＣ－ＴＴＣ－ＴＧＣ－ＧＣＣ－ＴＧＣ－ＧＧＣ－ＣＣＣ－ＴＡＡ－ＧＡＡ－ＴＴＣ（配列番号：２１）を順方向プライマーとして、ＧＡＡ－ＴＴＣ－ＴＴＡ－ＧＧＧ－ＧＣＣ－ＧＣＡ－ＧＧＣ－ＧＣＡ－ＧＡＡ－ＧＣＴ－ＧＣＣ－ＧＧＣ－ＧＣＡ－ＣＴＴ－ＧＣＣ－ＣＡＧ－ＣＡＧ－ＧＣＣ－ＣＡＧ－ＧＣＴ－ＣＴＴ－ＧＣＡ－ＧＣＧ－ＣＡＧ－ＣＴＧ－ＧＣＡ－ＧＣＧ－ＧＧＣ－ＣＡＧ－ＧＴＴ－ＧＣＡ－ＡＧＣ－ＧＧＣ－ＣＧＣ（配列番号：２２）を逆方向として用いて同時にアニーリングすることによって生成した。フラグメントをＮｏｔ１およびＢａｍＨ１で切断し、次いでＮｏｔ１およびＢａｍＨ１で切断することによって調製されていたｐＥＦ６－ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔにサブクローン化し、ゲルを精製し、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ配列からｈＤ１Ｄ２を軽減ｈＤ１Ｄ２を除去した。クローンは配列決定によって確認された。
【０１２２】
組換え体構築物は、図１に示される。スペーサー領域（配列番号：１１）およびＣＤ４Ｄ１Ｄ２（配列番号：２６）を有するＢａＬｇｐ１２０（配列番号：２４）配列を含むキメラ組換え体を完全長一本鎖（ＦＬＳＣ）で表した。第２の構築物は、ｇｐ１２０結晶構造を溶解するために用いられる分子により近似した複合体を生成するように設計された。この構築物は、切断型一本鎖（ＴｃＳＣ）で表し、ΔＣ１ΔＣ５ΔＶ１Ｖ２ｇｐ１２０をコードする配列を完全長コード配列（配列番号：２８）の代わりに用いることを除き、ＦＬＳＣと同様に構成した。ＢａＬ　ｇｐ１２０がアミノ酸５０６（配列番号：３０）で変異されているＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ、および配列配列番号：３０および２０を含有するＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９で表した構築物も示されている。本実施例に示されたスペーサーのアミノ酸配列は、ＧＳＳＧＧＧＧＳＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＡＡＡ（配列番号：１１）である。
実施例ＩＩ
本実施例ではｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドによる細胞の形質変換、および発現された可溶性ポリペプチドのキャラクタライゼーションが記載される。組換え体ｐＥＦ６－ＦＬＳＣまたはｐＥＦ６－ＴｃＳＣを、メーカーのプロトコール（ベーリンガーーマンハイム（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｈｅｉｍ））に従

い、フューゲン（Ｆｕｇｅｎｅ）を用いて、２９３細胞にトランスフェクションした。５μｇ／ｍｌブラスチシジンによる選択によって安定したトランスフェクタントを得た。安定した細胞株（２９３－ＳＣ）を異なる条件下で培養し、抗－ｇｐ１２０モノクローナル抗体（Ｙ．Ｈ．アバチオグル（Ａｂａｃｉｏｇｌｕ）ら、ＡＩＤＳ Ｒｅｓ．Ｈｕｍ．Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ、１９９４年（１０）、ｐ．３７１～８１）または抗ヒトＣＤ４ポリクローナル血清（Ｋ．Ｃ．ディーン（Ｄｅｅｎ）ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９８年（３３１）、ｐ．８２～４、Ｒ．Ｌ．ウィリー（Ｗｉｌｌｅｙ）ら、Ｊ Ｖｉｒａｌ．、１９９２年（６６）、ｐ．２２６～３４、ＮＩＨ ＡＩＤＳ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｒｅｐｏｓｉｔｏｒｙの混合物を用いて免疫ブロット分析によってキメラポリペプチドの産生を評価した。

【０１２３】

簡単に言えば、キメラポリペプチドを含有する細胞培養上清を収集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥローディングバッファー（７５ｍＭ Ｔｒｉｓ、２％ＳＤＳ、１０％グリセロール、０．００１％ブロムフェノールブルー、ｐＨ８．３）中で沸騰させた。次に、試料を４～２０％ＳＤＳ－ポリアクリルアミド勾配ゲル中で電気泳動した。次いで、ゲル分画タンパク質をニトロセルロース膜に移した。次に、膜上の非特異的結合部位をｔｒｉｓ緩衝食塩水、ｐＨ７中の２％脱脂粉乳で３０分間ブロックした。それから、抗－ＣＤ４ポリクローナルウサギ血清（Ｔ４－４、ＮＩＨ ＡＩＤＳ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｒｅｐｏｓｉｔｏｒｙ（メリーランド州ベテスダ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ））またはＨＩＶｇｐ１２０に対するマウスモノクローナル抗体の混合物のいずれかで膜を探索した。図２に示されているように、トランスフェクションされた細胞は、予想サイズ（１５０ｋＤ）の可溶性タンパク質を発現した。このポリペプチドは、抗－ｇｐ１２０抗体および抗－ＣＤ４抗体の両方と反応性であり、したがって、無傷キメラポリペプチドを示した。

【０１２４】

他の試験では、抗－ｍｙｃ抗体との反応性は検出され、１５０ｋＤ種のキメラポリペプチドとして同一性がさらに確認された。このポリペプチドに加えて、ｇｐ１２０およびＣＤ４ Ｄ１Ｄ２／ｍｙｃ標識について予想サイズにマッチするバンドが確認され、キメラポリペプチドの一部がスペーサーで開裂していたことを示した。生物学的に適合性のプロテアーゼインヒビター（Ｐｅｆａｂｌｏｃ；メーリンガーーマンハイム）の添加により、実質的に開裂されていないキメラポリペプチド分子が得られた。これは、ｇｐ１２０－ＣＤ４の開裂がセリンプロテアーゼによって生じることを示す。２９３－ＳＣ細胞株によって生成されたｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドの量を、ヒツジ抗－ｇｐ１２０抗体Ｄ７３２４（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｎｚｙｍｅｓ）、ｇｐ１２０Ｃ５領域における高保存エピトープに対するヒツジポリクローナルＩｇＧ（Ｊ．Ｐ．ムーア（Ｍｏｏｒｅ）、ＡＩＤＳ、１９９０年（４）、ｐ．２９７～３０５、Ｊ．Ｐ．ムーアら、Ｊ Ｖｉｒｏｌ．、１９９２年（６７）、ｐ．８６３～８７５、Ｊ．Ｐ．ムーアら、ＡＩＤＳ、１９９０年（４）、ｐ．３０７～３１５）、およびｇｐ１２０標準曲線による抗－ｇｐ１２０捕捉ＥＬＩＳＡを用いて測定した。

【０１２５】

簡単に言えば、リン酸緩衝食塩水中のＤ７３２４ ２μｇ／ｍｌをプラスチックプレートに吸収させた。非特異的結合部位を緩衝食塩水中２％脱脂粉乳でブロックした。次いで、２９３－ＳＣ株からの飽和濃度の細胞培養上清をプレートに添加した。ＨＩＶ感染患者からの不活化ヒト血清および西洋ワサビペルオキシダーゼに接合した抗ヒトＩｇＧを用いて捕捉キメラポリペプチドを検出した。２９３－ＳＣ細胞株は、推定約３μｇ／ｍｌのｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドを分泌する。２９３－ＳＣ細胞株は血清を含まない条件で増殖するように適合された。免疫ブロット法試験は、ｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドの一部の開裂が存在することを示したため、精製一本鎖の試料を架橋し、架橋試料について、ｇｐ１２０およびＣＤ４分子が結合したままであるかどうかを判定した。簡単に言えば、２９３－ＳＣ細胞株によって生成された上清からの一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４を免疫親和性カラムを用いて精製した。抗－ｇｐ１２０ヒトモノクローナル抗体Ａ３２

をＣＮＢｒ活性化セファロース４Ｂ（アマシャム・ファルマシア・バイオテク（Ａｍｅｒｓｈａｍ－Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃ）（ニュージャージー州ピスケイトウェイ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ））））に結合することによってカラムを構成した。Ａ３２は、ｇｐ１２０上の高不連続エピトープに対して特異的であり、ＣＤ４に結合したエンベロープを優先的に認識する。結合ｇｐ１２０－ＣＤ４を０．１Ｍ酢酸、ｐＨ２．５で溶離し、凍結乾燥し、ＰＢＳに対して透析した。メーカーのプロトコールを用いてＢＣＡアッセイ（バイオ・ラッド（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）（カリフォルニア州ハーキュリューズ（Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ））によってタンパク質濃度を測定した。次いで、精製ｇｐ１２０－ＣＤ４の２０μｌアリコートをホモ二価性クロスリンカー、ＢＳ３の１ｍＭ溶液で架橋し、４～２０％ポリアクリルアミドゲルでの非架橋ｇｐ１２０－ＣＤ４とともに電気泳動した。分画タンパク質をニトロセルロースに移し、抗－ｇｐ１２０モノクローナル抗体の混合物の後、アルカリホスファターゼ標識抗マウスＩｇＧで免疫ブロッティングし、市販のＢＣＩＰ／ＮＢＴ（ＫＰＬ）の混合物で視覚化した。

【０１２６】

図３は、これらの試験の結果を示し、非架橋ｇｐ１２０－ＣＤ４はレーン１にあり、架橋ｇｐ１２０－ＣＤ４はレーン２にある。レーン１は、免疫親和性カラムが開裂および非開裂一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４を精製することを示す。レーン２に示されているように、架橋により、１５０ｋＤａと３００ｋＤａでの２つの広いバンドが生成され、このパターンは、溶液中の一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４が関連１５０ｋＤａ分子として存在することを示している。ｇｐ１２０およびＣＤ４のサブユニットは、開裂イベント後でも結合したままである。３００ｋＤａバンドは、ｇｐ１２０－ＣＤ４の一部が溶液中で二量体であり、個別の分子上でエンベロープとＣＤ４ドメインとの分子間相互作用によって結合する一本鎖分子を表しうることを示している。一定の条件下での一本鎖分子のｇｐ１２０およびＣＤ４成分への明らかな開裂（図２）は、かかるプロセスが潜在的にｉｎ　ｖｉｖｏで起こりうるため、ＤＮＡワクチンへの関心となりうる。しかし、これらの試験は、開裂にもかかわらず、一本鎖分子はｇｐ１２０－ＣＤ４複合体として結合したままであったことを示す（図３）。天然のＦＬＳＣの構造的特性をより詳細に検討するために、上記で検討した同じタンパク質の異なる濃度（１μＭ～０．３μＭ）の調製物をＰＢＳ中で共有架橋し、溶液中に存在する多量体構造を固定した。次いで、架橋材料を抗－ＣＤ４抗体による免疫ブロット法によって分析した。図４に示されているように、１７２ｋＤの大タンパク質バンド（差し込み図；バンドＡ）が、高分子量の２つの小バンドとともに一貫して可視的であった。小バンド（差し込み図；バンドＢ）の一方は約３０２ｋＤの明らかなサイズを有したが、他方（差し込み図；バンドＣ）はゲルへ十分に移動せず、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによるサイズの正確な評価はできなかった。異なるタンパク質バンドの外観および比率は、架橋前のＦＬＳＣ濃度に左右されなかった。したがって、濃度分析によって示されたように、バンドＡ、Ｂ、およびＣが一貫してそれぞれ、総タンパク質の約６５％、２５％、および１０％を示した。

【０１２７】

ＦＬＳＣと比較すると、架橋ＴｃＳＣのクロマトグラフィーのプロフィールはより複雑であった。非変性条件下に、ＴｃＳＣは、１６６ｋＤ～３５３ｋＤの範囲の広い一連のピークとして溶離した。かかるプロフィールは、短いＴｃＳＣポリペプチドが発現および／または精製時に複数の高順位の構造物を形成することを示した。この反応は、ＴｃＳＣが主に、個別の分子におけるｇｐ１２０配列とＣＤ４配列との相互作用によって結合された可変サイズの鎖のポリペプチドとして存在することを示す。ＴｃＳＣは、ｇｐ１２０から２０Ｃ－末端アミノ酸を除去することによって生成されたため、ｇｐ１２０のＣＤ４のコア構造とＣＤ４ｂｄとの距離は短縮したが、これがＴｃＳＣの分子間ｇｐ１２０－ＣＤ４相互作用を達成し、鎖間複合体の形成を有利にする能力を阻害しているとみられる。しかし、ＴｃＳＣは、ｇｐ１２０－ＣＤ４複合体の抗原性および機能的特徴も示した。多数のＴｃＳＣ分子を含む分子間相互作用のため、より小さな比率の総タンパク質が、表面コレセプターと相互作用する能力のあるコレセプター結合部位を発現した。あるいは、ＴｃＳＣ

におけるＶ１／Ｖ２領域の除去は、ＣＣＲ５に対するＢａＬエンベロープの相対親和性を低下させうる。さらに、ｇｐ１２０とＣＤ４成分とのリンカーを伸長するＴｃＳＣの改変により、高い比率の鎖間複合体の形成が可能となりうる。ＴｃＳＣの多量体の性質がこの分子をＦＬＳＣに対して不利な立場にするかどうかは不明のままであるが、それは他の多量体の試験により、それらが単量体の対応物よりも強力なイムノゲンであることを示しているためである（Ａ．Ｌ．デビコ（ＤｅＶｉｃｏ）ら、ＡＩＤＳ　Ｒｅｓ．、１９９９年（Ｉ）、ｐ．４～１４、Ｓ．Ａ．ジェフス（Ｊｅｆｆｓ）ら、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ、１９９６年（７７）、ｐ．１４０３～１４１０、Ｒ．Ａ．ラ・カッセ（ＬａＣａｓｓｅ）ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、１９９９年（２８３）、ｐ．３５７～３６２）。

実施例ＩＩＩ

本実施例では、ｇｐ１２０およびＣＤ４と反応性の数種類の抗体へのｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドの結合を示すデータが記載される。ｇｐ１２０のＣＤ４への結合は、分子における構造変化をもたらし、コレセプター結合ドメインの曝露につながった。したがって、このドメインにおけるエピトープに対して向けられた抗体は、適切に畳み込まれた一本鎖分子と強く反応するはずである。キメラ分子における曝露エピトープを測定するために、ＦＬＳＣ分子とＴｃＳＣ分子の抗原性を比較した。精製ＦＬＳＣおよびＴｃＳＣを抗原捕捉ＥＬＩＳＡによって免疫化学分析にかけた。簡単に言えば、ＢａＬｇｐ１２０、ｇｐ１２０－ｒｓＣＤ４複合体または一本鎖キメラ分子を、ｇｐ１２０のＣ－末端１５アミノ酸、Ｄ７３２４（Ｊ．Ｐ．モーアら、ＡＩＤＳ　Ｒｅｓ．Ｈｕｍ．Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ、１９８Ｘ年（４）、ｐ.３６９～３７９）由来のペプチドに対して生じた精製ポリクローナルヒツジ抗体（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｅｎｚｙｍｅｓ（カリフォルニア州ファルブルック（Ｆａｌｌｂｒｏｏｋ，ＣＡ））を用いて捕捉し、基質に吸収させた。Ｄ７３２４をＰＢＳ中で２μｇ／ｍｌに希釈し、室温下に一夜インキュベートすることによって、９６穴プレート（Ｍａｘｉｓｏｒｂプレート、ＶＷＲサイエンティフィック（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）（ミズーリ州セントルイス（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ））に吸着させた。プレートをＢＬＯＴＴＯ（トリス緩衝食塩水中の５％脱脂粉乳）処理し、ウェルへの非特異的結合を予防した。ＴＢＳでプレートを洗浄した後、試料をＢＬＯＴＴＯ中に希釈し、２００μｌのアリコートを正副二通のＤ７３２４－コートウェル中に室温で１時間インキュベートした。ＢＬＯＴＴＯ中で１０００倍に希釈した不活化ＨＩＶ－Ｉ＋血清のプールを用いた後、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したヤギ抗ヒトＩｇＧ（ＫＰＬ（メリーランド州ゲイサーズバーグ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ））を用いて結合抗原を検出した。

【０１２８】

ＣＤ４の関与後のｇｐ１２０を優先的に結合することが以前に示されたモノクローナル抗体（ＭＡｂ　Ａ３２、１７ｂ、および４８ｄ）を用いた後（Ｍ．サリ（Ｔｈａｌｉ）ら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、１９９３年（６７）、ｐ．３９７８～３９８６）、適切に標識された二次抗体を用いることによって検出も行われた。抗体のうちの２つ、１７ｂおよび４８ｄは、ＣＤ４結合によって誘導されるコレセプター付着部位内で結合する（Ｎ．スリバン（Ｓｕｌｌｉｖａｎ）ら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、１９９８年（７２）、ｐ．４６９４～４７０３、Ａ．トルコラ（Ｔｒｋｏｌａ）ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９６年（３８４）、ｐ．１８４～１８６、Ｌ．ウー（Ｗｕ）ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９６年（３８４）、ｐ．１７９～１８３）。フリーｇｐ１２０のＣ１～Ｃ５領域における保存エピトープを認識する抗体Ｃ１１も試験した。抗体をＢＬＯＴＴＯ中に希釈し、室温で１時間インキュベートした。各インキュベーション工程間にＴＢＳで３回プレートを洗浄した。試料中に存在するｇｐ１２０配列の量を市販の組換えＨＩＶ　ＩＩＩＢ　ｇｐ１２０（バートルズ（Ｂａｒｔｌｅｓ）（ワシントン州イサクアー）（Ｉｓｓａｑｕａｈ，ＷＡ））で生成された標準曲線に基づき測定した。ＢａＬｇｐ１２０－ｒｓＣＤ４複合体を含む比較試験において、Ｄ７３２４コートプレートをｇｐ１２０の飽和濃度で試験した。ウェルの洗浄後、過剰濃度のｒｓＣＤ４（１μｇ／ｍｌ）をウェルに添加し、１時間インキュベートして複合体を形成した。Ｄ７３２４エピトープを欠くＴｃＳＣ抗原を評価するために、捕捉のために抗－ＣＤ

４　ＭＡｂ４５（バートルズ（ワシントン州イサクアー）（Ｉｓｓａｑｕａｈ，ＷＡ））を用いて代わりのＥＬＩＳＡフォーマットを作った。１μｇ／ｍｌで抗体をプラスチックに吸着させ、ウェルをＢＬＯＴＴＯでブロックした。次いで、上述したように、指定のヒト血清またはヒトモノクローナル抗体を用いてアッセイを行った。

【０１２９】

図５Ａに示されているように、抗体のすべては、ＦＬＳＣと強く反応した。しかし、抗体１７ｂ、４８ｄ、およびＡ３２の半最大結合濃度は、ＦＬＳＣ対ｇｐ１２０のみで一貫して高く、可溶性、非共有ＢａＬｇｐ１２０－ｒｓＣＤ４複合体で確認されたものと同等であった。ＦＬＳＣの高い免疫活性は、ＣＤ４誘導エピトープに対して向けられた抗体に対して特異的であったが、ＦＬＳＣ対フリーｇｐ１２０での抗体Ｃ１１の半最大結合濃度における有意差は確認されなかった。

【０１３０】

図５Ｂに示されているように、１７ｂおよび４８ｄのＴｃＳＣとの反応性レベルは、平行して分析されたＦＬＳＣで確認されたものと同等であった。予想されたように、抗体Ｃ１１およびＡ３２は、それらのぞれぞれのエピトープの大部分がＴｃＳＣ構造物から除去されたため、ＴｃＳＣと反応することはなかった。

【０１３１】

一本鎖分子におけるｇｐ１２０とＣＤ４の結合も、ｇｐ１２０上のＣＤ４結合部位におけるエピトープの曝露をブロックするはずである。かかる結合が起こったこと、ｇｐ１２０のＣＤ４結合部位がもはや結合のために利用できなかったことを確認するために、Ｍａｂ４５捕捉フォーマット、およびｇｐ１２０上のＣＤ４結合ドメイン（ＣＤ４ｂｄ）に対して向けられた一連のモノクローナル抗体（ＩｇＧｌｂ１２、Ｆ９１、および２０５～４６９）を用いてＦＬＳＣおよびＴｃＳＣを評価した。

【０１３２】

図５Ｃに示されているように、これらの抗体のうちＦＬＳＣまたはＴｃＳＣと反応したものはなかったが、平行して試験したプールＨＩＶ＋血清では陽性反応が確認された。このデータは、ＦＬＳＣおよびＴｃＳＣ分子内に存在するＣＤ４配列とｇｐ１２０　ＣＤ４結合ドメインとの相互作用を示す。

【０１３３】

要約して言えば、これらの結果は、ｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドの反応性が、可溶性のｇｐ１２０とＣＤ４を組合せる（非架橋）ことによって製造された複合体で確認されたものと同等であり、ｇｐ１２０のみでのものより高いことを示している。これらのデータは、一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４分子が、遷移状態のＨＩＶエンベロープ－ＣＤ４複合体と同様の相互作用複合体を形成したことを示す。捕捉ｇｐ１２０－ＣＤ４も、ウエスタンブロット分析と一致したように、他のＥＬＩＳＡ試験における抗－ＣＤ４抗血清および抗－ｍｙｃ抗体と反応した。総合すれば、これらのデータは、一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４分子の大多数が、適切に畳み込まれたｇｐ１２０－ＣＤ４複合体を表すことを示している。

実施例ＩＶ

本実施例では、ＣＣＲ５－特異的ＨＩＶエンベロープ配列を含有するｇｐ１２０－ＣＤ４キメラ分子のＣＣＲ５発現細胞への結合を示すデータが記載される。

【０１３４】

ｇｐ１２０－ＣＤ４複合体の形成は通常、適切なコレセプターと相互作用するエンベロープドメインを曝露する（Ｍ．サリら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、１９９３年（６７）、ｐ．３９７８～３９８６）、Ｍ．Ａ．ボディカ（Ｖｏｄｉｃｋａ）ら、Ｖｉｒｏｌ．、１９９７年（２３３）、ｐ．１９３～１９８）。したがって、適切に畳み込まれたｇｐ１２０－ＣＤ４複合体および細胞のウイルス感染を抑制するその能力の別の尺度は、ＣＣＲ５コレセプターに結合する能力である。

【０１３５】

コレセプターに結合する一本鎖複合体の能力を評価するために、精製一本鎖ｇｐ１２０－

ＣＤ４分子を、ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４のいずれかを発現する細胞と相互作用させた。簡単に言えば、ｇｐ１２０－ＣＤ４一本鎖を含有する上清を、ｐＥＦ６－ＳＣで２９３細胞を一時的にトランスフェクションすることによって生成した。次いで、上清をＡ３２の免疫親和性カラムに添加し、精製された一本鎖を０．２Ｍ酢酸、ｐＨ２．５で溶離し、Ｄ７３２４－捕捉ＥＬＩＳＡ、および、記載されているように、免疫ブロットによって分析した。一本鎖を含有する画分を収集し、ｐＨ７に平衡させ、濃縮した。

【０１３６】

結合のために、精製一本鎖調製物を、ＣＣＲ５を発現するＬ１．２細胞と反応させた（Ｌ．ウーら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９６年（３８４）、ｐ．１７９～１８３、Ｌ．ウーら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１９９７年（１８６）、ｐ．１３７３～１３８１）。Ｌ１．２、Ｌ１．２／Ｘ４、およびＬ１．２／Ｒ５細胞、コレセプターを発現しないマウスＢ細胞株、ＣＸＣＲ４、またはＣＣＲ５を濃度を低下させた精製一本鎖タンパク質と混合した。３７℃下、１時間のインキュベーション後、細胞を洗浄した。結合一本鎖分子が、１μｇ／ｍｌのＭＡｂ　Ｃ１１（Ｊ．Ｅ．ロビンソン（Ｒｏｂｉｎｓｏｎ）ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｕｐｐｌ．、１９９２年（１６Ｅ）、ｐ．７１、Ｍ．サリら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、１９９３年（６７）、ｐ．３９７８～３９８６）、抗－ｇｐ１２０ＭＡｂの後、蛍光分子、フィコエリトリンで標識された抗－ヒトＩｇＧによって検出された。Ｃ１１は、Ｃ１－Ｃ４領域によって形成される構造決定因子を認識する。結合蛍光のレベルは、ＦＡＣＳキャリバー計器（ベクトン・ディッキンソン（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）を備えた蛍光活性化細胞選別装置（ＦＡＣＳ）分析によって測定した。各試料の平均蛍光強度をセルクエスト３．１．３プログラム（ベクトン・ディッキンソン）を用いて計算した。

【０１３７】

図６に示されているように、両方の一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４複合体（ＦＬＳＣおよびＴｃＳＣ）は、ＣＣＲ５発現には結合したが、ＣＸＣＲ４発現、Ｌ１．２細胞には結合しなかった。最大結合は、対照として試験された可溶性ＢａＬ　ｇｐ１２０－ｒｓＣＤ４複合体で確認されたものと同等の濃度（１０μｇ／ｍｌ）でのＦＬＳＣで確認された。比較では、飽和結合に接近するには約１０倍高い濃度のＴｃＳＣが必要であった。したがって、ｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドは、マクロファージ刺激ｇｐ１２０を含有する分子に対して予想されたように、ＣＣＲ５に対する機能的コレセプター結合部位を示す。

【０１３８】

これらの試験においてＣＸＣＲ４への結合が認められないことは、ＣＤ４に対するｇｐ１２０－ＣＤ４キメラにおけるＨＩＶエンベロープポリペプチドの明らかな特異性に照らしてまったく予想外であったわけではない。したがって、ＣＸＣＲ４または他のコレセプターに結合するポリペプチドキメラを構成することによって、または、本明細書に記載されているように、別のコレセプターに結合するキメラポリペプチドを得るために、ウイルスコートポリペプチドを改変することによって、他のコレセプターに結合する他のウイルスコートポリペプチド受容体ポリペプチドキメラを得ることができる。

【０１３９】

一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４がその受容体結合部位を通じてＣＣＲ５に結合していることを明らかにするために、ｇｐ１２０のコレセプター結合部位と相互作用することが示されており、コレセプター発現細胞との相互作用からｇｐ１２０／ｓＣＤ４を防ぐ、１７ｂ抗体と４８ｄ抗体の競合結合試験を行った。対照のために、別のｇｐ１２０抗体、Ｃ１１、およびｇｐ４１抗体Ｆ２４０を用いた。これらの抗体のすべては、ＨＩＶ－１感染患者由来である。各抗体を１０μｇ／ｍｌで使用し、３μｇ／ｍｌの精製一本鎖分子とともに、ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４のいずれかを発現するＬ１．２細胞に添加した。結合ｇｐ１２０－ＣＤ４は、Ｃ１１の後、ＰＥで標識された抗－ヒトＩｇＧによって検出された。ｇｐ１２０－ＣＤ４の量は、ＦＡＣＳによって測定し、競合抗体を含まない対照ウェルにおける総結合の百分率で表した。

【０１４０】

図７に示されているように、１７ｂおよび４８ｄは、両方の一本鎖複合体の細胞への結合を強く抑制した。これらの抗体の存在下に、ＣＣＲ５発現細胞上の結合シグナルは、Ｌ１．２／ＣＸＣＲ４およびＬ１．２親細胞で確認されたバックグラウンド結合と同じであった。興味深いことに、強力な中和抗体である、２Ｇ１２も、ＣＣＲ５とのすべての複合体形態の相互作用を減少させた。比較では、コレセプター結合ドメインの外側でエピトープを認識する抗－ｇｐ１２０抗体、Ｃ１１、Ａ３２、および抗－ｇｐ４１抗体、Ｆ２４０はすべて、ＦＬＳＣまたはＴｃＳＣのＣＣＲＳ発現Ｌ１．２細胞への結合を減少させなかった。

【０１４１】

これらの結果は、ｇｐ１２０コレセプター結合部位が、コレセプターへの結合に重要であることを示す。これらの結果は、ｇｐ１２０－ＣＤ４とコレセプターとの結合／相互作用を抑制する物質が、かかるアッセイを用いて同定しうることも示す。かかる物質は、治療薬として潜在的な価値を有しうる。

【０１４２】

要約して言えば、データは、ウイルスコート受容体複合体の遷移状態構造を再現する可溶性、キメラポリペプチドの有効な発現を示している。この成果を考えると、ウイルスまたは同様のコートポリペプチドエピトープを有するウイルスに対する免疫反応を生成するように対象の免疫化のためにポリペプチドをコードするキメラポリペプチドまたはポリヌクレオチドを使用することが可能となる。生成される免疫反応は、抗体（液性）またはＣＴＬ反応でありうる。さらに、キメラポリペプチドが生細胞の表面上の適切なコレセプターに結合するという事実を考えると、ウイルス感染からコレセプターを発現する細胞を受動的に保護するために、免疫不全ウイルスに激しく曝露された対象にポリペプチドを投与することができる。

実施例Ｖ

本実施例では、ｇｐ１２０－ＣＤ４キメラ分子が、同じコレセプターを用いてＨＩＶ株による感染を中和しうることを示すデータが記載される。一本鎖分子をさらに、Ｒ５およびＸ４ウイルスを中和するそれらの能力について検査した。ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４のいずれかを発現する合計10^4Ｕ３７３／ＣＤ４／ＭＡＧＵＩ細胞（Ｍ．Ａ．ボディカ（Ｖｏｄｉｃｋａ）ら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、１９９７年（２３３）、ｐ．１９３～１９８）を一夜、平底組織培養ウェルに付着させた。次いで、培養基を除去し、種々の濃度のキメラタンパク質を含有する新鮮培地１００μｌで置換した。次いで、$50TCID_{50}$のウィルスを含有する追加の培地１００μｌを培養に添加した。次いで、混合物全体を、合胞体が可視的になるまで、通常、３～５日以内、３７℃でインキュベートした。次いで、培養ウェルを、メーカーのプロトコール従って、Ｐ－ガラクトシダーゼ化学ルミネセンス試薬、ガラトスター（Ｇａｌａｔｏｓｔａｒ）（トロピックス（Ｔｒｏｐｉｘ）（マサチューセッツ州ベッドフォード（Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ））で処理した。ウイルス感染を化学ルミネセンスの関数として測定し、Ｖｉｃｔｏｒ^{2}蛍光プレートリーダー（ＥＧ＆Ｇワラック（Ｗａｌｌａｃ）（メリーランド州ゲイサーズバーク（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ））を用いて定量化した。バックグラウンドシグナルをウイルスの非存在下に行ったアッセイにおいて測定した。次いで、試験アッセイで得られたシグナルを、バックグラウンド値を引くことによって補正した。細胞とウイルスのみを含有する対照ウェルの補正された光単位によって各実験ウェルの補正された相対光単位を割ることによって感染率を計算した。９０％抑制量（ID_{90}）値を試験タンパク質濃度対感染抑制率のプロットから測定した。全試験条件を３とおり行った。

【０１４３】

図８に示されているように、ＦＬＳＣとＴｃＳＣは両方ともＲ５ＨＩＶ－１ＢａＬ分離株を強く、かつ選択的に中和したが、２０４４分離株の抑制はわずか（ID_{90}＞１０μｇ／ｍｌ）しか認められなかった。比較では、非複合体ＢａＬｇｐ１２０が、予想したように、そのＣＤ４との直接的な相互作用により、ＨＩＶ－１ＢａＬおよびＸ４（ＨＩＶ－１２０４４）の侵入を抑制した。したがって、データは、ウイルスコートポリペプチド受容

体キメラ分子が細胞コレセプターに結合し、それによって結合または感染のためにコレセプターを利用するウィルスによる細胞の結合または感染をブロックすることができる。

実施例ＶＩ

本実施例では、免疫グロブリンポリペプチド配列、ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１を有する改変ｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドの構造および発現が記載される。この典型的な異種ドメインは、接着および免疫増強機能を含む、機能性をｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドに付加し、安定性を延長し、循環半減期および胎盤関門を交差させる能力を増大させる。本実施例は、ｇｐ１２０－ＣＤ４ーＩｇＧ１キメラが無傷細胞の表面上に発現したコレセプターに結合そ、ＨＩＶウイルスを中和することを示す。ＨＩＶ－１のエンベロープタンパク質のサブユニットであるＧｐ１２０は、ＣＤ４に結合し、複合体がＣＣＲ５などのコレセプターと相互作用することを可能にする構造変化を受ける。この相互作用は、ＨＩＶ－１のターゲットＣＤ４＋細胞への感染を可能にする。ＨＩＶ－１のコレセプターとの相互作用を干渉する抗体または他の物質は、感染を予防することができる。

【０１４４】

かかる物質を同定するために、ＩｇＧ１重鎖、ヒンジＣＨ２、およびＣＨ３を形成する一定の領域に融合することによって、一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４を改変した（図９）。ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１を用いて、ＨＩＶ－１のコレセプターとの相互作用をブロックし、抑制し、または崩壊させる物質を同定することができる。配列番号：２４、１１、２６、および３２を含有するｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１ポリペプチドも針刺し創傷などの急性曝露後のＨＩＶ感染を予防する受動免疫治療薬として用いることができよう。

【０１４５】

少なくとも配列番号：２３、２５および３１をからなるｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１含有プラスミド２９３個の細胞を一時的にトランスフェクションし、発現タンパク質を培養上清の免疫ブロッティングによって特徴づけた。簡単に言えば、収集した上清試料を４～２０％勾配ＰＡＧＥゲル上で電気泳動した。分画タンパク質をニトロセルロースに移し、抗－ｇｐ１２０モノクローナル抗体の混合物で検出した。図１０に示されているように、一時的にトランスフェクションされた細胞は、ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１を発現した（レーン１）。ＨＩＶ－１ＢａＬ由来の精製ｇｐ１２０を発現する細胞からの上清（レーン２）を相対サイズの比較のために電気泳動した。ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１ポリヌクレオチドは、ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１重鎖キメラの予測サイズを有するタンパク質をコードする。最初のｇｐ１２０－ＣＤ４と同様、ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１の一部分は開裂され、ｇｐ１２０（「開裂ｇｐ１２０」）である可能性が最も高い１２０ｋＤａのタンパク質フラグメントを生成する。このフラグメントのサイズは、ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１がスペーサー内で開裂していることを示す。ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１が結合コレセプターに対して許容状態の構造に折り畳まれることを確実にするために、ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４コレセプターのずれかを発現するＬ１．２細胞に上清の希釈液を添加した。蛍光試薬であるユーロピウムで標識された抗－ヒトＩｇＧで結合ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１が検出された。蛍光の量は、結合材料の量に直接関連している。

【０１４６】

図１１に示されているように、ｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１は、ＣＣＲ５を発現するＬ１．２細胞に特異的に結合する。また、このアッセイを用いて、ＣＸＣＲ４への結合はほとんど検出されなかったが、これはｇｐ１２０－ＣＤ４での結果と一致している。これらの試験は、追加の、または増強された機能性を与える異種ドメインが、細胞コレセプターに結合する複合体を形成するそれらの能力に影響を及ぼすことなく、キメラ分子に添加しうることを示している。ＣＣＲ５発現細胞へのキメラｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１重鎖の結合が、ｇｐ１２０のコレセプター結合部位によって仲介されたことを確認するために、ブロッキング抗体１７ｂの存在下に結合を試験した。簡単に言えば、ＭＡｂ／ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１競合試験のために、酪酸ナトリウム活性化Ｌ１．２細胞発現コレセプターを、Ｖ底プレートに10^5／ウェルで添加した。１０μｇ／ｍｌ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１および１μｇ／ｍｌ　ＭＡｂを細胞に添加した。細胞およびタンパク質をいっしょに３７℃で１

時間インキュベートした。細胞をペレットにし、ＴＢＳで３回洗浄した。５μｇ／ｍｌのフェトエリセリン標識抗－ヒトＩｇＧで４℃下に１時間、結合物質を検出した。次いで、細胞を３回、ＴＢＳで洗浄し、蛍光活性化細胞選別装置（ＦＡＣＳ）で分析した。

【０１４７】

図１２に示されているように、ｇｐ１２０上のＣＣＲ５結合ドメインを認識する抗体である１７ｂは、ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１のＬ１．２Ｒ．５との相互作用をブロックするが、対照抗体のＦ２４０はブロックしない。これらのデータは、ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１がご１２０上のＲ５結合ドメインによってＲ５コレセプターと相互作用することを示している。次いで、キメラｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１重鎖が細胞へのウイルス侵入をブロックしうるかを確認するために、中和アッセイを行った。簡単に言えば、ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４のいずれかを発現するＵ３７３／ＣＤ４／ＭＡＧＩ細胞を、10^4細胞／ウェルで一夜、平底組織培養トレイに付着させた。培地を除去し、次いで異なる濃度のＭＡｂおよび免疫付着因子を培地１００μｌ中の細胞に添加した。次いで、ウイルス（培地１００μｌ中の５０$TCID_{50}$／ウェル）を添加し、合胞体が可視的になるまで、通常、３～５日以内、３７℃でインキュベートした。メーカーのプロトコール従って、Ｐ－ガラクトシダーゼ化学ルミネセンス試薬、ガラトスターを用いてプレートを読み、生成された化学ルミネセンスを既述の通りＶｉｃｔｏｒ^{2}を用いて定量化した。ウイルス増殖率を相対光単位を用いることによって計算した（実験ウェル）－－ウイルスを含まないバックグラウンドウェル）／（ウイルスを含むがタンパク質を含まないウェル）－－（バックグラウンドウェル）（表２）。ID_{50}とID_{90}を図で測定した。

【０１４８】

【表３】

表2
FLSC−IgG1によるX4、R5、
およびX4／R5HIVの中和

U373/CD4/CCR5					
	FLSC−IgG1	2G12	2F5	1lgGlbl2	対照lgG
ID90(μg/mL)					
BaL	3.1	>10	>10	1.57	>10
ADA	4.58	>10	>10	>10	>10
89.6	3.56	8.07	>10	3.39	>10

U373/CD4/CXCR4					
	SClg	2Gl2	2F5	lgGlbl2	対照lgG
ID90(μg/mL)					
2044	>10	>10	>10	1.57	>10
2005	>10	>10	>10	>10	>10
89.6	>10	>10	>10	5.34	>10

表2のデータは、FLSC-IgGが細胞侵入のためにR5を使用するウイルスを遮断する

【０１４９】

ＦＬＳＣ－ＩｇＧは、現在、受動免疫療法における治験で評価されている抗体、２Ｇ１２、２Ｆ５、およびＩｇＧｌｂ１２と同じく有効にウイルスを中和する。したがって、これらのデータは、特にＨＩＶ感染を抑制するｇｐ１２０－ＣＤ４キメラの有用性、および一般に結合または細胞侵入のためにコレセプターを利用する他のウイルスのインヒビターとしてのウイルスコートタンパク質－受容体の適用をさらに確約するものである。

実施例ＶＩＩ

本実施例では、フューリン開裂部位の変異がＦＬＳＣ複合体の安定性を改善することを示

すデータが記載される。ＦＬＳＣフラグメントを分離する開裂部位の位置は、みじかいＴｃＳＣは変性を示さなかったため、おそらくＦＬＳＣにおいてのみ存在するＣ末端ｇｐ１２０配列内に位置している。特に、これらの配列は、フューリンプロテアーゼによって通常開裂されるｇｐ１２０　ｇｐ４１接合を包含する（Ｍ．ジラード（Ｇｉｒａｒｄ）ら、Ｃ　Ｒ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＩＩＩ、１９９９年（３２２）、ｐ．９５９～９６６）。自然のフューリン部位でのＦＬＳＣの開裂は、ｇｐ１２０およびＣＤ４成分の構造、およびそれらの相互作用能力に対する最小の影響を有するＦＬＳＣフラグメントの反応と一致するであろう。

【０１５０】

この推定上のフューリン部位が開裂、ＢａＬｇｐ１２０の原因であるかどうを判定するために、ＣＤ４、ＦＬＳＣ、およびＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔの最初の２つのドメイン（Ｖ１Ｖ２）からなるｓＣＤ４分子で複合体形成されたＢａＬｇｐ１２０を、ｇｐ１２０のＣ末端に対して特異的な抗体によってプラスチック上に捕捉した（抗体結合はＲ／Ｔ変異によって影響されなかった）。４つのドメインＶ１～Ｖ４ｓＣＤ４を捕捉複合体上に３０μｇ／ｍｌで開始することで滴定した。４つのドメインｓＣＤ４は、２つのドメインＶ１Ｖ２よりもｇｐ１２０に対する高い親和性を有し、したがって、複合体からの小さい単位とは競合しないであろう。結合された４つのドメインＣＤ４は、抗体ＯＫＴ４で検出されたが、これは４つのドメインＣＤ４を結合するだけである。図１３の結果は、フューリン開裂部位の変異が、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔで見られるＶ１　Ｖ２が開裂ＦＬＳＣと同じく容易に分離することを防ぎ、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ複合体の安定性を改善する。ＲＴのＢａＬｇｐ１２０ｃ末端への変異の導入は、ＦＬＳＣで確認されるフューリン介在開裂を排除する。この開裂の削減により、リンカー配列の連続性が改善し、ｇｐ１２０およびＣＤ４成分の局所濃度を増大させることによってＦＬＳＣ構造の安定性が改善する（図１３を参照）。この増大の実験結果は、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔで見られる２つのドメインＣＤ４と競合する可溶性の４つのドメインＣＤ４の能力の削減である。

実施例ＶＩＩＩ

本実施例では、ｇｐ１２０－ＣＤ４改変キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドによる細胞のトランスフェクション、および発現された可溶性ポリペプチドの特徴づけが記載される。組換え体ｐＥＦ６－ＦＬＳＣ、ｐＥＦ６－ＲＬＳＣ－Ｒ／Ｔ、ｐＥＦ６－ＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９、およびｐＥＦ６－ＢａＬｇｐ１２０を、メーカーのプロトコール（ベーリンガーマンハイム）に従い、Ｆｕｇｅｎｅを用いて２９３個の細胞にトランスフェクションした。５μｇ／ｍｌブラスチシジンによる選択によって安定したトランスフェクタントを得た。簡単に言えば、キメラポリペプチドを含有する細胞培養上清を収集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥローディングバッファー（７５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２％ＳＤＳ、１０％グリセロール、０．００１％ブロムフェノールブルー、ｐＨ８．３）中で沸騰させた。次いで、試料を４～２０％ＳＤＳ－ポリアクリルアミド勾配ゲル中で電気泳動した。次いで、ゲル分画タンパク質をニトロセルロース膜に移した。次いで、膜上の非特異的結合部位をｔｒｉｓ緩衝食塩水、ｐＨ７中の２％脱脂粉乳で３０分間ブロックした。次いで、ＨＩＶ　ｇｐ１２０に対するマウスモノクローナル抗体の混合物でプローブし、結合抗体をアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗－マウスＩｇＧで検出した。

【０１５１】

図１４に示されているように、ＢａＬｇｐ１２０（レーン１）およびＦＬＳＣ－Ｒ／ＴＣＤ４Ｍ９（レーン４）は、約１２０ｋＤａの分子量で移動した。ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９は約１３０ｋＤａであることが予測されるが、１０ｋＤａの差はこのブロットで確認するのは困難である。ＦＬＳＣ（レーン２）は、タンパク質のｃ－末端のフューリン部位で開裂している１５０ｋＤａのタンパク質である。この開裂により、ＦＬＳＣのｇｐ１２０およびＣＤ４の成分は分離される。低い１２０ｋＤａバンドはこの開裂の結果である。放出されたＣＤ４成分は、タンパク質を検出するために使用された抗体がｇｐ１２０に対して特異的であったため、このブロットでは可視的ではない。一定の条件でのｇｐ１２０およびＣＤ４成分への一本鎖分子の明らかな開裂は、かかるプロセスが潜在的にｉｎ

ｖｉｖｏで起こりうるため、ＤＮＡワクチンへの関心となりうる。

【０１５２】

本実施例では、フューリン開裂部位がＦＬＳＣ複合体の安定性を改善することを示すデータが記載されている。開裂部位の位置は、ＦＬＳＣフラグメントを分離する開裂部位の位置は、おそらくＦＬＳＣにおいてのみ存在するＣ末端ｇｐ１２０配列内に位置している。特に、これらの配列は、フューリンプロテアーゼによって通常開裂されるｇｐ１２０　ｇｐ４１接合を包含する（Ｍ．ジラード（Ｇｉｒａｒｄ）ら、Ｃ　Ｒ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＩＩＩ、１９９９年（３２２）、ｐ．９５９～９６６）。自然のフューリン部位でのＦＬＳＣの開裂は、ｇｐ１２０およびＣＤ４成分の構造、およびそれらの相互作用能力に対する最小の影響を有するＦＬＳＣフラグメントの反応と一致するであろう。結果は、フューリン開裂部位の変異が、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔで見られるＶ１　Ｖ２が開裂ＦＬＳＣと同じく容易に分離することを防ぎ、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ複合体の安定性を改善することを示す。結果として、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔを作成するために用いられるＲ／Ｔ変異は、この開裂を最小限に抑え、タンパク質を安定させる。

実施例ＩＸ

本実施例では、ｇｐ１２０およびＣＤ４０と反応性の抗体へのｇｐ１２０－ＣＤ４キメラポリペプチドの結合を示すデータが記載されている。ｇｐ１２０のＣＤ４０への結合は、分子における構造変化をもたらし、コレセプター結合ドメインの曝露につながる。したがって、このドメインにおけるエピトープに対して向けられた抗体は、適切に畳み込まれた一本鎖分子と強く反応するはずである。キメラ分子における曝露エピトープを測定するために、ＢａＬｇｐ１２０、ＦＬＳＣ、ＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ、およびＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤＭ９分子の抗原性を比較した。検出は、ＣＤ４の関与後のｇｐ１２０を優先的に結合することが以前に示されたモノクローナル抗体１７ｂを用いた後（Ｍ．サリ（Ｔｈａｌｉ）ら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、１９９３年（６７）、ｐ．３９７８～３９８６）、適切に標識された二次抗体を用いることによって行われた。抗体１７ｂは、ｇｐ１２０がＣＤ４と相互作用するとますます曝露されることになるエピトープを認識し、コレセプター付着部位（ＣＣＲ５）内で結合するヒトモノクローナル抗体である。（Ｎ．スリバン（Ｓｕｌｌｉｖａｎ）ら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、１９９８年（７２）、ｐ．４６９４～４７０３、Ａ．トルコラ（Ｔｒｋｏｌａ）ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９６年（３８４）、ｐ．１８４～１８６、Ｌ．ウー（Ｗｕ）ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９６年（３８４）、ｐ．１７９～１８３）。抗体をＢＬＯＴＴＯ中に希釈し、室温で１時間インキュベートした。各インキュベーション工程間にＴＢＳで３回プレートを洗浄した。試料中に存在するｇｐ１２０配列の量を市販の組換えＨＩＶ　ＩＩＩＢ　ｇｐ１２０（バートルズ（Ｂａｒｔｌｅｓ）（ワシントン州イサクアー（Ｉｓｓａｑｕａｈ，ＷＡ））で生成された標準曲線に基づき測定した。１μｇ／ｍｌで抗体をプラスチックに吸着させ、ウェルをＢＬＯＴＴＯでブロックした。次いで、上述したように、指定のヒト血清またはヒトモノクローナル抗体を用いてアッセイを行った。

【０１５３】

図１６に示されているように、ＢａＬｇｐ１２０、ＦＬＳＣ、ＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ、およびＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤＭ９分子による１７ｂの結合曲線は、その両方がいずれもｇｐ１２０とＣＤ４を含有するＦＬＳＣ－Ｒ／ＴまたはＦＬＳＣキメラタンパク質への１７ｂの結合によって増強された。１７ｂもＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９に結合し、効率はＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔのものと同等であり、１７ｂエピトープがＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９タンパク質中に曝露されることを示している。総合すれば、これらのデータは、一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４分子であるＦＬＳＣ、ＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ、およびＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤＭ９が、適切に畳み込まれたｇｐ１２０－ＣＤ４複合体を表すことを示している。

実施例Ｘ

本実施例では、ＣＣＲ５－特異的ＨＩＶエンベロープ配列を含有するｇｐ１２０－ＣＤ４キメラ分子のＣＣＲ５発現細胞への結合を示すデータが記載される。ｇｐ１２０－ＣＤ４複合体の形成は通常、適切なコレセプターと相互作用するエンベロープドメインを曝露す

る（Ｍ．サリら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、１９９３年（６７）、ｐ．３９７８～３９８６）、Ｍ．Ａ．ボディカ（Ｖｏｄｉｃｋａ）ら、Ｖｉｒｏｌ．、１９７７年（２３３）、ｐ．１９３～１９８）。したがって、適切に畳み込まれたｇｐ１２０－ＣＤ４複合体および細胞のウイルス感染を抑制するその能力の別の尺度は、ＣＣＲ５コレセプターに結合する能力である。

【０１５４】

コレセプターに結合する一本鎖複合体の能力を評価するために、精製一本鎖ｇｐ１２０－ＣＤ４分子を、ＣＣＲ５を発現するか、またはコレセプターを有さないずれかのイヌ胸腺細胞、Ｃｆ２Ｔｈと相互作用させた。簡単に言えば、ｇｐ１２０－ＣＤ４一本鎖キメラポリペプチドＦＬＳＣ－Ｒ／ＴおよびＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤＭ９分子を含有する上清を、ｐＥＦ６で２９３個の細胞の一時的なトランスフェクションによって生成した。

【０１５５】

結合のために、精製一本鎖調製物を、ＣＣＲ５を発現するか、またはコレセプターを有さないイヌ胸腺細胞と相互作用させた。結合一本鎖分子を、抗－ｇｐ１２０ＭＡｂ、Ａ３２で検出した後、蛍光分子、フィコエリトリンで標識されたＰＥ標識ヤギ抗－ヒトＩｇＧによって検出した。結合蛍光のレベルは、ＦＡＣＳキャリバー計器（ベクトン・ディッキンソン（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）を備えた蛍光活性化細胞選別装置（ＦＡＣＳ）分析によって測定した。蛍光の量は結合物質の量と直接関連している。各試料の平均蛍光強度をセルクエスト３．１．３プログラム（ベクトン・ディッキンソン）を用いて計算した。図１５に示されている結果は、ＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９が、ＣＣＲ５発現細胞には結合するが、コレセプターを含まない細胞には結合せず、効率はＦＬＳＣ－Ｒ／Ｔのものと同等であることを示す。

実施例ＸＩ

本実施例では、ＦＬＳＣ接種マウスからの血清による一次Ｒ５ＨＩＶ－１（９２ＢＲ０２０）の中和が記載される。Ｃ５８７Ｂ１／６マウスに対し、コレラ毒素（ＣＴ）１０μｇと混合したマウス１匹当り２５μｇのＦＬＳＣを４回接種した。接種は２週間の間隔をおいて行った。最終接種の１４日後、個々のマウスから血清を採集し、一次Ｒ５ＨＩＶ－１分離株９２ＢＲ０２０に対する中和活性について分析した、開始時１：２の血清の連続希釈液を、５０ＴＣＩＤ$_{50}$感染用量のウイルス／ウェルおよび10^4Ｕ３７３／ＣＤ４／Ｒ５／ＭａＧＩ細胞／ウェルと混合した。２４時間後、血清、ウィルス、および培地を新鮮培地２００μｌと交換した。アッセイは、合胞体が可視的になるまでの５日間インキュベートした。ＨＩＶ－１の増殖は、メーカーのプロトコール従って、化学ルミネセンス試薬、ガラトスター（トロピックス（Ｔｒｏｐｉｘ）を用いて測定された細胞ライセート中のｂ－ガラクトシダーゼの産生によって示された。ウイルス感染を化学ルミネセンスの関数として測定し、Ｖｉｃｔｏｒ^2（ＥＧ＆Ｇワラック（Ｗａｌｌａｃ）（メリーランド州ゲイサーズバーク（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ））蛍光プレートリーダーを用いて定量化した。バックグラウンドシグナルをウイルスおよび血清の非存在下に行ったアッセイで測定した。次いで、試験アッセイで得られたシグナルを、バックグラウンド値を引くことによって補正した。細胞とウイルスのみを含有する対照ウェルの補正された光単位によって各実験ウェルの補正された相対光単位を割ることによって感染率を計算した。ＦＬＳＣ接種マウスからの血清は、＃０、＃１、＃２、＃３、＃４で標識され、ナイーブマウスは「Ｃ」で標識されている。

【０１５６】

図１７に示されているように、希釈係数の増大とともに、ウイルス感染の増大も認められる。さらに、対照マウスから分離された血清は、ウイルス感染に対する影響をしめさなかったが、マウス＃２からの血清の高濃度はウイルス感染の最小量を示した。

【０１５７】

要約して言えば、データは、ウイルスコート受容体複合体の遷移状態構造を再現する可溶性、キメラポリペプチドの有効な発現を示している。この成果を考えると、ウイルスまたは同様のコートポリペプチドエピトープを有するウイルスに対する免疫反応を生成するよ

うに対象の免疫化のためにポリペプチドをコードするキメラポリペプチドまたはポリヌクレオチドを使用することが可能となる。生成される免疫反応は、抗体（液性）またはＣＴＬ反応でありうる。さらに、キメラポリペプチドが生細胞の表面上の適切なコレセプターに結合するという事実を考えると、ウイルス感染からコレセプターを発現する細胞を受動的に保護するために、免疫不全ウイルスに激しく曝露された対象にポリペプチドを投与することができる。

実施例ＸＩＩ

ＦＬＳＣ、およびＢａＬｇｐ１２０とｓＣＤ４の複合体をＤ７３２３コートＥＬＩＳＡプレート上に捕捉した。Ｄ７３２４は、ｇｐ１２０のＣ－末端領域に対して反応性であり、捕捉ＥＬＩＳＡによってＨＩＶ－１エンベロープタンパク質の抗原性を検査するために一般的に用いられている抗体である。次いで、ＢａＬｇｐ１２０／ｓＣＤ４複合体を０．５ｍＭビス（スルホスシニミジル）スベリン酸（ピアス）で３０分間架橋し、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＬで処理し、反応を停止した。次いで、ＢａＬｇｐ１２０／ｓＣＤ４とＦＬＳＣプレートをＴＢＳで洗浄した。Ｖ３ループ（３９Ｆ）、Ｃ１～Ｃ５（Ｃ１１）、Ｃ１～Ｃ４（Ａ３２）、コレセプター結合ドメイン（１７ｂ）、およびＢａＬｇｐ１２０のＣ３～Ｖ４（２Ｇ１２）領域を捕捉抗原上に滴定した。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗ヒトＩｇＧで結合抗体を検出した。

【０１５８】

図１８は、架橋反応がＢａＬｇｐ１２０／ｓＣＤ４複合体の構造を変化させ、３９Ｆ、Ｃ１１、Ａ３２、および１７ｂエピトープの抗原性を減少させることを示している。対照的に、これらのエピトープはＦＬＳＣで閉鎖されていない。この抗原性の変化はこれらのエピトープの機能に影響を及ぼすことになる。例えば、１７ｂによって認識さえたエピトープはＲ５コレセプターと相互作用する。クロスリンカーによるこのエピトープの閉鎖により架橋複合体のコレセプターとの相互作用能力が低下することになる。この所見は、架橋複合体がそのコレセプターによってＨＩＶ－１を潜在的にブロックしうる試薬の検査には用いられないことも示す。

実施例ＸＩＩＩ

調製Ｒ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１を０．５ｍＭビス（スルホスシニミジル）スベリン酸（ピアス）で３０分間架橋し、次いで１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＬで処理し、反応を停止した。次いで、ＳＤＳ－ＰＡＧＥの還元条件および非還元条件で架橋物質を非架橋物質と比較した。図１９に示されているように、還元ゲル（中央レーン）での非架橋物質は、１８０ｋＤａで実行され、ＢａＬｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１キメラの予想サイズである。小さいバンドは、およそＣＤ４－ＩｇＧのサイズであり、キメラが分子のＢａＬｇｐ１２０とＣＤ４－ＩｇＧ部分との間で開裂していることを示す。この所見は、Ｒ／Ｔ変異はフューリンプロテアーゼによる開裂を除去するが、別のプロテアーゼはｇｐ１２０のｃ末端で作用しうることを示す。非還元条件（右レーン）の非架橋物質は、３６０ｋＤａで実行され、完全にアセンブルされた免疫付着因子である。この所見は、物質の一部分は開裂しているが（中央レーンを参照）、免疫付着因子は結合したままであることを示す。アセンブル構造を安定させる物質の架橋により、この所見が確認される（左レーン）。ここで物質は予想通り約３６０ｋＤａで実行されている。高分子量の形態は可視的でもあり、これは精製調製物の一部が凝集していることを示す。

【０１５９】

２９３個の細胞をｐｃＤＮＡ－ヒトＣＣＲ５またはｐｃＤＮＡ－アカゲザルＣＣＲ５またはプラスミドなしのいずれかで使用２４時間前に一時的にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞（10^5／ウェル）を３７℃下に１時間、指定濃度のＲ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１とともにインキュベートした。結合Ｒ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１をフィコエリトリン接合抗－ヒトＩｇＧで検出し、ＦＡＣＳによって分析した。図２０は、Ｒ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１がヒトとアカゲザルのＣＣＲ５に結合することを示す。

【産業上の利用可能性】

【０１６０】

ＣＣＲ５を発現するイヌ胸腺細胞を３μｇ／ｍＬ　Ｒ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１および指定濃度のケモカインとともに３７℃下に１時間インキュベートした。フィコエリトリン接合抗－ヒトＩｇＧを用いて結合Ｒ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１を検出し、ＦＡＣＳによって分析した。ＲＡＮＴＥＳは、ＣＣＲ５－特異的ケモカインであり、受容体に対してＲ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１と競合することが予想される。ＳＤＦは、ＣＸＣＲ４特異的ケモカインであり、これを対照として用いた。図２１は、Ｒ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１が、そのコレセプター、ＣＣＲ５によってＨＩＶ－１感染をブロックしうる試薬を規定するスクリーニング手段として用いることができるという証拠をさらに提供している。

【０１６１】

本明細書のすべての引例は、それらが開示するすべてについて、またすべての目的について参考によって援用される。本発明は、その詳細な説明とともに記載され、添付の特許請求の範囲によって規定されているが、前記の説明は発明の例示を意図したものであり、発明の範囲の限定は意図されていないことを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【０１６２】

【図１】例示的なキメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの構成を示す図である。完全長一本鎖（ＦＬＳＣ）キメラポリペプチドは、ＨＩＶｇｐ１２０（ＢａＬ株）、２０アミノ酸スペーサーポリペプチド、Ｄ１ドメインおよびｄ２ドメイン（Ｄ１　Ｄ２）を含むＣＤ４ポリペプチド配列、およびｍｙｃペプチド「標識」を含む。切断型一本鎖（ＴｓＳＣ）キメラは、Ｃ１（不変領域１）、Ｖ１（可変領域１）、Ｖ２、およびＣ５における欠失を含有する。ＴｃＳｃで示された欠失は、ＢａＬｇｐ１２０配列に従って番号付けされている。ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔキメラは、フューリン開裂部位における単一の変異を有し、ｇｐ１２０のｃ末端で、ＲがＴに変化している。ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９キメラは、ｇｐ１２０のフューリン開裂部位における単一変異、２１アミノ酸スペーサーポリペプチド、およびＣＤ４Ｍ９ペプチド配列を有する。

【図２】２９３－ＳＣ細胞によって発現されたＦＬＳＣおよびＴｃＳＣ可溶性キメラポリペプチドを含有する細胞培養上清のウェスタンブロット分析を示す図である。ｇｐ１２０（レーン１～４）およびＣＤ４（レーン５～８）で免疫ブロット法を行ったが、矢印は、ゲル移動が減少する順序に、ｇｐ１２０－ＣＤ４一本鎖（一本鎖）、開裂ｇｐ１２０（ｇｐ１２０フラグメント）、および開裂ＣＤ４（ＣＤ４フラグメント）を示す。

【図３】２９３－ＳＣ細胞によって発現されたｇｐ１２０－ＣＤ４の分析を示す図であり、非架橋ｇｐ１２０－ＣＤ４はレーン１にあり、架橋ｇｐ１２０－ＣＤ４はレーン２にある。

【図４】架橋後のＦＬＳＣの免疫ブロット分析を示す図である。異なるＦＬＳＣ濃度（１～０．０３μＭ）のそれぞれの相対総タンパク質率（％）が棒グラフに示されている：（Ａ）、４５％１７２ｋＤ；（Ｂ）、２５％３０２ｋＤ；および（Ｃ）、１０％高位のオリゴマー。

【図５Ａ－５Ｃ】ｇｐ１２０－ＣＤ４キメラの結合分析を示す図である。（Ａ）、架橋ｇｐ１２０／ｒｓＣＤ４および非複合体形成ｇｐ１２０と比較して、抗ｇｐ１２０抗体（１７ｂ、４８ｄ、Ａ３２、およびＣ１　１）でインキュベートした完全長一本鎖（ＦＬＳＣ）。１７ｂ、４８ｄ、およびＡ３２は、複合体形成ｇｐ１２０に対する優先的親和性を有する。バーは、標準誤差と共に示されている。（Ｂ）、ＦＬＳＣおよびＴｃＳＣにおけるヒト抗ｇｐ１２０モノクローナル抗体の相互半最大結合濃度（ＥＬＩＳＡ）。（Ｃ）、ｇｐ１２０　ＣＤ４結合ドメインと反応するモノクローナル抗体ＩｇＧｌｂ１２、Ｆ９１、および２０５～４６９の相互半最大結合。

【図６】ＣＣＲ５（Ｒ５）またはＣＸＣＲ４（Ｘ４）コレセプター発現Ｌ１．２細胞に結合するｇｐ１２０－ＣＤ４キメラ（ＦＬＳＣ、ＴｃＳＣ）の分析を示す図である。ＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４を発現しない対照細胞は、Ｌ１．２で示されている。５μｇ／ｍｌの抗ＣＤ４　Ｍａｂ４５を用いたフローサイトメトリーによって結合複合体を検出した。示されている値は、３回行った代表的なものである。

【図７】ｇｐ１２０結合抗体（１７ｂ、４８ｄ、Ａ３２、Ｃ１１、および２Ｇ１２）、およびｇｐ４１抗体（Ｆ２４０）の存在下にコレセプターに結合するｇｐ１２０－ＣＤ４（ＦＬＳＣ、ＴｃＳＣ）の分析を示す図である。Ｌ１．２細胞は、示されているように、コレセプターＣＣＲ５（Ｒ５）、ＣＸＣＲ４（Ｘ４）を発現し、またはコレセプターを示さなかった（Ｌ１．２）。抗体を含まない対照は、「＋」で示されている。未処理細胞で得られた参考測定値は、「－」で示されている。５μｇ／ｍｌのＭａｂ４５を用いたフローサイトメトリーによって結合複合体を検出した。結果は、マッチした対照アッセイにおいて得られた平均蛍光強度に対する結合率で示されている。３つの別個の試験から得られた平均値が示されている。標準誤差はバーで示されている。

【図８】ＦＬＳＣ、ＴｃＳＣ、ＢａＬｇｐ１２０、およびＢａＬｇｐ１２０－ｒｓＣＤ４複合体によるＨＩＶ－1_{2044}（Ｘ４特異的分離株）およびＨＩＶ－$_{Bal}$（Ｒ５特異的分離株）ウイルス中和の分析を示す図である。Ｕ３７３細胞は、ＣＤ４、Ｒ５またはＸ４のいずれか、およびＨＩＶ－１ＬＴＲプロモーターによって制御されたＰガラクトシダーゼを発現した。ＨＩＶ－1_{2044}に対するＦＬＳＣおよびＴｃＳＣのＩＤ$_{90}$は、試験した最大濃度では達成されず、したがって＞１０μｇ／ｍｌで示されている。

【図９】コードドメインを示すキメラｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１遺伝子を示す図である。実質的に最初のｇｐ１２０－ＣＤ４が、ＩｇＧ１重鎖ヒンジＣＨ２およびＣＨ３領域を有することによって、キメラｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１ポリペプチドの発現を可能にする、プラスミドにサブクローン化されている。

【図１０】２９３細胞において発現されたｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１キメラポリペプチドの免疫ブロット分析を示す図である。キメラｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１は、培養上清から分離され（レーン１）、精製ＨＩＶ株ＢａＬ　ｇｐ１２０ポリペプチド（と比較して示されているレーン２）。開裂ｇｐ１２０は、矢印によって示され、精製ｇｐ１２０と同時移動する。

【図１１】コレセプター発現Ｌ１．２細胞に結合するｇｐ１２０－ＣＤ４－ＩｇＧ１キメラポリペプチドの相互希釈分析を示す図である。ＣＣＲ５およびＣＸＣＲ４発現Ｌ１．２細胞が示されている。

【図１２】ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１がｇｐ１２０上のＲ５結合ドメインによってＲ５コレセプターと相互作用することを示すＣＣＲ５発現細胞に結合するＦＬＳＣ－ＩｇＧ１上のブロッキングＭＡｂ（１７ｂ）の分析を示す図である。

【図１３】フューリン開裂部位（Ｒ－Ｔ）の変異後のｇｐ１２０－ＣＤ４（ＦＬＳＣ）の安定性の改善を示す図である。

【図１４】ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９をＢａＬｇｐ１２０、ＦＬＳＣ、およびＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔと比較する免疫ブロットを示す図である。ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９は、ＣＤ４Ｍ９遺伝子配列に対するＦＬＳＣ　Ｒ／ＴにおけるＣＤ４　Ｄ１Ｄ２配列を転換することによって構成した。

【図１５】ＣＣＲ５（Ｒ５）に結合するＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９の分析を示す図である。分析の結果は、平均蛍光強度で示されている。図は、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９が、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔのものと同等の効率でＲ５発現細胞に結合することを示す。

【図１６】ｇｐ１２０がＣＤ４と相互作用するときに曝露が増大することになるエピトープの結合、および曝露される１７ｂエピトープがＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔ　ＣＤ４Ｍ９であり、ＦＬＳＣ　Ｒ／Ｔのものと同等であることを示す図である。

【図１７】ＦＬＳＣ接種マウスの血清による一次Ｒ５　ＨＩＶ－１（９２ＢＲ０２０）の中和を示す図である。

【図１８】ＢａＬｇｐ１２０／ｓＣＤ４複合体の共有架橋が、ＦＬＳＣ上に曝露されたエピトープを塞ぐことを示す図である。

【図１９】還元および非還元条件下に精製Ｒ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１を比較する免疫ブロットを示す図である。

【図２０】ヒトおよびアカゲザルＣＣＲ５へのＲ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１の結合を示す図である。

【図２１】ＣＣＲ５に結合するＲ／Ｔ　ＦＬＳＣ－ＩｇＧ１を競合的に抑制するランテスを示す図である。

【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
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016333 A2

(51) International Patent Classification[7]: C07K

(21) International Application Number: PCT/US02/26543

(22) International Filing Date: 21 August 2002 (21.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/934,060 21 August 2001 (21.08.2001) US

(71) Applicant: UNIVERSITY OF MARYLAND BIOTECHNOLOGY INSTITUTE [US/US]; Office of Research Admin./Tech. Dev., Suite 200, 701 E. Pratt Street, Baltimore, MD 21202 (US).

(72) Inventors: DEVICO, Anthony, L.; 4533 Peacock Avenue, Alexandria, VA 22304 (US). FOUTS, Timothy, R.; 7523 Swan Point Way, Columbia, MD 21405 (US). TUSKAN, Robert, G.; 1104 Roland Heights Avenue, Baltimore, MD 21211 (US).

(74) Agents: FUIERER, Marianne et al.; Intellectual Property/Technology Law, P.O. Box 14329, Research Triangle Park, NC 27709 (US).

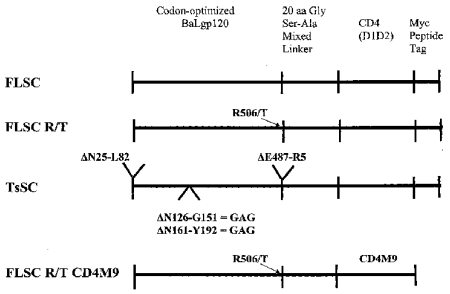
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: VIRUS COAT PROTEIN/RECEPTOR CHIMERAS AND METHODS OF USE



(57) Abstract: The invention relates to chimeric molecules comprising a virus coat sequence and a receptor sequence that can inter-act with each other to form a complex that is capable of binding a co-receptor. Such chimeric molecules therefore exhibit functional properties characteristic of a receptor-coat protein complex and are useful as agents that inhibit virus infection of cells due to occupancy of a co-receptor present on the cell. In particular aspects, the chimeric polypeptide includes an immunodeficiency virus envelope polypeptide, such as that of HIN , SN, FIV, FeL V, FPV and herpes virus. Receptor sequences suitable for use in a chimeric polypeptide include, for example, CD4 DID2 and CD4M9 sequences.

WO 03/016333 A2

WO 03/016333 A2

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.

VIRUS COAT PROTEIN/RECEPTOR CHIMERAS AND METHODS OF USE

BACKGROUND THE INVENTION

Field of the Invention

This invention relates generally to receptor ligand interactions, and more specifically to chimeric polypeptides having virus coat polypeptide and cell receptor polypeptide sequences that bind to each other and mimic the structural, functional and immunogenic properties that naturally occur when the virus protein and receptor interact *in vivo*.

Description of Related Art

Humoral immunity arising after primary infection with HIV-l may not prevent progression to AIDS (R. A. Koup *et al., Nature,* 370:416 (1994); R. A. Koup *et al., J. Virol.* 68:4650-5 (1994)). However, it is likely that Humoral immunity can prevent infection if an individual has high-titered neutralizing antibodies prior to exposure to the virus. This concept is largely supported by passive immunization studies in which chimps were transfused with neutralizing anti-V3 monoclonal antibodies or pooled, high-titered neutralizing antisera around the time of challenge with cell-free virus (E. A. Emini *et al., Nature:* 355:728-30 (1992); R. Shibata *et al., Nat. Med.,* 5:204-10 (1999)). Protection was obtained in both sets of studies, indicating that humoral immunity can be protective provided the right antibodies are present in sufficient titers at the time of challenge or shortly thereafter.

Additional studies suggest that humoral immunity can be protective against HIV-l. For example, passive immunization using the SCID-hu mouse system have shown that human monoclonal antibodies specific for the CD4 binding domain of gp120 can prevent infection (M. C. Gauduin *et al., Nat. Med.,* 3: 1389-93 (1997); P.W. Parren *et al., AIDS,* 9:Fl-6 (1995)). It has been further shown that passive transfer of a bivalent CD4-Ig "immunoadhesin," a chimera made between CD4 and the human IgG2 heavy chain, can protect in the HIV-l chimp challenge system (J. W. Eichberg *et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses,* 8: 1515-19 (1992); R.H. Ward *et al., Nature,* 352:434-6

(1991)). Additionally, neutralizing antibodies correlate strongly with protective immunity against SIV (J.L. Heeney *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95:* 10803-8 (1998)). Still further, passive transfer studies in rhesus macaques showed that high-titered chimp antibodies specific for the HIV-1 $_{DH12}$ isolate, provided sterilizing immunity in rhesus macaques against $SHIV_{DH12}$ if a sufficient concentration of the antibodies was used (R. Shibata et *al., Nat. Med.,* 5:204-10 (1999)). Also, passive-transfer experiments in rhesus macaques using HIVIg, 2G12, and 2F5 demonstrated 50% better protection in recipient groups compared to non-recipient controls against challenge with SHIV-89.6P (Mascola *et al.,* J. *Virol.,* 73:4009-18 (1999)). Thus, these studies support the idea that immunization strategies which elicit persistent, high-titered (or highly effective) neutralizing antibody responses of broad specificity may be protective. A successful strategy to reach this goal has been elusive. The subunit formulations of recombinant monomeric or oligomeric HIV envelope that have been tested elicit neutralizing responses against a narrow range of isolates (J.P. Moore *et al., AIDS,* 9:S117-136 (1995); Q. J. Sattentau, *Curr. Opin. Immunol.,* 8:540-5 (1996); R. Wyatt *et al., Science,* 280:1884-8 (1998)).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to chimeric polypeptides containing a virus coat polypeptide sequence and a viral receptor polypeptide sequence in which the coat polypeptide sequence and the receptor polypeptide sequence are linked by a spacer. The coat polypeptide and the viral receptor polypeptide sequences of the chimeric polypeptides can bind to each other. The chimeric polypeptides of the invention are useful for inducing an immune response and for producing antibodies. Further, the chimeric polypeptides are useful for preventing, inhibiting, or ameliorating a viral infection by passive protection against virus infection or by production of an immune response *(i.e.,* antibodies or a CTL response) by administration to a subject.

In various embodiments, the virus coat polypeptide sequence of a chimeric polypeptide is an envelope polypeptide sequence (e.g., full-length gp120 or a fragment), a virus that binds a co-receptor polypeptide, an immunodeficiency virus, including HIV (e.g., HIV-1 or HIV-2), SIV, FIV, FeLV, FPV, and a herpes virus. In various additional embodiments, the viral receptor polypeptide sequence is a CD4

polypeptide sequence, full-length or a fragment thereof, such as the D1, D2 domains and mutations thereof. Introducing envelope genes derived from viruses that use alternative co-receptors could further expand the potential of these single chain molecules affording protection from viral infection of different cell types that express the different co-receptors.

Chimeric polypeptides having heterologous domains also are provided. Such heterologous domains impart a distinct functionality and include tags, adhesins and immunopotentiating agents. For example, heterologous domains can have an amino acid sequence, such as a c-myc polypeptide sequence or an immunoglobulin polypeptide sequence (e.g., a heavy chain polypeptide sequence).

In accordance with the present invention, there are provided polynucleotide sequences having a nucleic acid sequence encoding chimeric polypeptides. The polynucleotides can be included in an expression vector and are useful for expressing chimeric polypeptides.

In accordance with the present invention, there are provided antibodies and functional fragments thereof that bind to the chimeric polypeptides of the present invention. The antibodies are useful in treatment methods and in diagnostic methods. Such antibodies can neutralize the immunodeficiency virus *in vitro* or *in vivo*, and can also be useful in inhibiting immunodeficiency virus infection, for example, by passive protection. Such antibodies can bind to an epitope produced by the binding of the virus coat polypeptide sequence and viral receptor polypeptide sequence. For example, such an epitope can be present on an envelope polypeptide sequence.

The chimeric polypeptides, polynucleotides and antibodies of the present invention are useful for treating viral infection, or for inducing an immune response. Thus, in accordance with the present invention, there are provided chimeric polypeptides, polynucleotides and antibodies in a pharmaceutically acceptable carrier.

Methods for producing an antibody include administering a chimeric polypeptide of the present invention in an amount sufficient for the subject to produce antibodies to the chimeric polypeptide. Such methods also can be useful, for example, for

inhibiting or ameliorating virus infection in a subject, or for passive protection, when the antibody is administered to a recipient subject.

Methods for inhibiting virus infection in a subject include administering an effective amount of a chimeric polypeptide of the invention, or a polynucleotide encoding same to inhibit virus infection of a cell. The administered chimeric polypeptide can prevent virus infection by binding to a viral co-receptor on the cells of the subject or produce a protective immune response. The chimeric polypeptide can be administered in an amount sufficient to ameliorate the virus infection in the subject.

A method that produces an immune response can produce an antibody response or a CTL response. The antibodies produced can neutralize the immunodeficiency virus *in vitro*. The antibodies also may bind to an epitope exposed by the binding of the two polypeptide sequences of the chimeric polypeptide.

Methods for identifying agents that modulate binding or interaction between a virus and a virus co-receptor, and a virus and a virus receptor, also are provided. In one embodiment, a method includes contacting a chimeric polypeptide having a coat protein of a virus that binds to a receptor with a co-receptor polypeptide (e.g., a CCR5 or CXCR4 polypeptide sequence) under conditions allowing the chimeric polypeptide and the co-receptor polypeptide to bind, in the presence and absence of a test agent, and detecting binding in the presence and absence of the test agent. Decreased binding in the presence of the test agent identifies an agent that inhibits binding between the virus and the virus co-receptor polypeptide.

In another embodiment, a method includes contacting a chimeric polypeptide under conditions allowing intramolecular binding within the chimeric polypeptide, in the presence and absence of a test agent, and detecting intramolecular binding or interaction within the chimeric polypeptide. Decreased binding in the presence of the test agent identifies an agent that inhibits intramolecular binding or interaction between the virus and the virus receptor polypeptide in the chimera. The agent can be added before or after contacting the chimeric polypeptide with the virus co-receptor polypeptide. The virus co-receptor or receptor polypeptide can be present on the surface of an intact cell, which can be present in an animal, such as a non-

human primate. The methods can be performed using an immunodeficiency virus, such as HIV, SIV, and the like. Test agents include a library of agents, such as peptides, organic molecules, antibodies and fragments thereof, antivirals, virus co-receptors, functional fragments, and peptide mimetics thereof.

Methods for identifying a chimeric polypeptide sequence that modulate (inhibits or stimulates) virus infection of a cell also are provided. In one embodiment, a method includes contacting a cell susceptible to virus infection with an infectious virus particle in the presence and absence of the chimeric polypeptide sequence of the present invention and determining whether the chimeric polypeptide modulates (inhibits or stimulates) virus infection of the cell *(in vitro* or *in vivo)*.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a diagram of a polynucleotide construct that encodes exemplary chimeric polypeptides. Full-length single chain (FLSC) chimeric polypeptide comprises an HIVgp120 (BaL strain), a 20 amino acid spacer polypeptide, a CD4 polypeptide sequence comprising the D 1 and D2 domains (D1 D2), and a myc peptide "tag." A truncated single chain (TsSC) chimera contains deletions in the Cl (constant region l), V1 (variable region I), V2, and C5. The deletions indicated for TcSC are numbered according to the BaL gp120 sequence. A FLSC R/T chimera has a single mutation in the furin cleavage site, an R is changed to a T, at the c-terminus of gp120. A FLSC R/T CD4M9 chimera has a single mutation in the furin cleavage site of gp120, a 21 amino acid spacer polypeptide and a CD4M9 peptide sequence.

FIG. 2 is a Western blot analysis of cell culture supernatant containing FLSC and TcSC soluble chimeric polypeptide expressed by 293-SC cells. Immunoblotting was performed with gp120 (lanes 1 to 4) and CD4 (lanes 5 to 8) and the arrows indicate, in order of decreasing gel mobility, gpl20-CD4 single chain (single chain), cleaved gpl20 (gp120 fragment) and cleaved CD4 (CD4 fragment).

FIG. 3 is an analysis of gp120-CD4 expressed by 293-SC cells; uncrosslinked gpl20-CD4 is in lane 1 and the crosslinked gp120-CD4 is in lane 2.

FIG. 4 is an immunoblot analysis of FLSC after crosslinking. The relative percent (%) total protein for each of the different FLSC concentrations (1-0.03*u*M) are shown in the bar graph: (A), 45% 172kD; (B), 25% 302kD; and (C), 10% higher order oligomer.

FIG. 5A-5C is a binding analysis of gp120-CD4 chimera. (A), Full length single chain (FLSC) incubated with anti-gp120 antibodies (17b, 48d, A32 and C1 1) in comparison to crosslinked gpl20/rsCD4 and uncomplexed gp120. 17b, 48d and A32 have preferential affinity for complexed gpl20 (gp120). Bars are shown with standard error. (B), Reciprocal half-maximal binding concentration of human anti-gp120 monoclonal antibodies in FLSC and TcSC (ELISA). (C), Reciprocal half-maximal binding of monoclonal antibodies IgGlb12, F91 and 205-469, which react with the gp120 CD4 binding domain.

FIG. 6 is an analysis of gp120-CD4 chimera (FLSC, TcSC) binding to CCR5 (R5) or CXCR4 (X4) co-receptor expressing L1.2 cells. Control cells that do not express CCR5 or CXCR4 are denoted L1.2. Bound complexes were detected by flow cytometry using 5 *u*g/ml of anti-CD4 Mab45. The values shown are of a representative study performed three times.

FIG. 7 is an analysis of gpl20-CD4 (FLSC, TcSC) binding to co-receptor in the presence of gpl20 binding antibodies (17b, 48d, A32, C11 and 2G12), and a gp41 antibody (F240). L1.2 cells expressed co-receptor CCR5 (R5), CXCR4 (X4), or no co-receptor (L1.2), as indicated. Antibody-free controls are denoted "+." Background measurements obtained with untreated cells are denoted "-." Bound complexes were detected by flow cytometry using 5 *u*g/ml Mab45. Results are presented as percent binding relative to the mean fluorescence intensity obtained in the matched control assay. Average values derived from three separate studies are shown. Standard errors are shown with bars.

FIG. 8 is an analysis of HIV-1_{2044} (an X4-specific isolate) and HIV-$_{Bal}$, (an R5-specific isolate) virus neutralization by FLSC, TcSC, BaLgp120 and BaLgpl20-rsCD4 complexes. U373 cells expressed CD4, either R5 or X4, and P-galactosidase regulated by the HIV-1LTR promoter. An ID_{90} for FLSC and TcSC against HIV-

I_{2044} was not achieved with the maximum concentrations tested and is therefore presented as >10 ug/ml.

FIG. 9 is a diagram of chimeric gpl20-CD4-IgGl gene showing the coding domains. It is essentially the original gp120-CD4 subcloned into a plasmid that has the IgGl heavy chain hinge CH2 and CH3 regions thereby permitting expression of chimeric gpl20-CD4-IgGl polypeptide.

FIG. 10 is an immunoblot analysis of a gpl20-CD4-IgGl chimeric polypeptide expressed in 293 cells. The chimeric gp120-CD4-IgGl was isolated from culture supernatant (lane 1) and is shown in comparison to purified HIV strain BaL gp120 polypeptide (lane 2). Cleaved gp120 is indicated by the arrow and co-migrates with purified gp120.

FIG. 11 is a reciprocal dilution analysis of gp120-CD4-IgGl chimeric polypeptide binding to co-receptor expressing L1.2 cells. CCR5 and CXCR4 expressing L1.2 cells are as indicated.

FIG. 12 is an analysis of a blocking MAb (17b) on FLSC-IgGl binding to CCR5 expressing cells showing that FLSC-IgGl interacts with the R5 co-receptor via the R5- binding domain on gpl20.

FIG. 13 shows the improved stability of gpl20-CD4 (FLSC) molecules following mutation of furin cleavage site (R-T).

FIG. 14 shows an immunoblot comparing FLSC R/T CD4M9 with BaLgp120, FLSC, and FLSC R/T. The FLSC R/T CD4M9 was constructed by switching the CD4 D1D2 sequence in FLSC R/T for a CD4M9 gene sequence.

FIG. 15 is an analysis of FLSC R/T CD4M9 binding to CCR5 (R5). Results of the analysis are shown as mean fluorescence intensity. The figure shows that the FLSC R/T CD4M9 binds to R5 expressing cells with an efficiency equivalent to that of FLSC R/T.

FIG. 16 shows the binding of an epitope that becomes increasing exposed when gp120 interacts with CD4 and that the 17b epitope that is exposed is FLSC R/T CD4M9 and equivalent to that of FLSC R/T.

FIG. 17 shows neutralization of primary R5 HIV-1 (92BR020) by sera from FLSC inoculated mice.

FIG. 18 shows covalent crosslinking of BaLgp120/sCD4 complexes occludes epitopes that are exposed on FLSC.

FIG. 19 shows an immunoblot comparing purified R/T FLSC-IgG1 in reducing and non-reducing conditions.

FIG. 20 shows binding of R/T FLSC-IgG1 to both human and rhesus CCR5.

FIG. 21 shows RANTES competitively inhibits R/T FLSC-IgG1 binding to CCR5.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is based on the discovery that a chimeric polypeptide comprising an HIV envelope polypeptide and a CD4 receptor can form an interacting complex capable of binding to a co-receptor. In the chimeric polypeptides of the present invention, HIV gp120 binding to CD4 mimics the envelope protein-CD4 transition state that occurs when HIV binds CD4 present on cells; gp120 displays conserved epitopes exposed upon complex formation that interact directly with co-receptor, CCR5. Formation of the envelope-CD4 transition state and subsequent binding to cell co-receptor is a critical step in HIV infection of cells. Therefore, antibodies or other agents that prevent or inhibit gp120-CD4 binding to co-receptor, for example, by binding epitopes exposed upon gpl20-CD4 complex formation could inhibit virus interaction with the co-receptor thereby mediating protection from HIV infection.

Accordingly, chimeric polypeptides or a nucleic acids encoding the chimeric polypeptides of the present invention can be used therapeutically for treating,

inhibiting, preventing or ameliorating virus infection, for example, by inducing an immune response to the transition state complex formed upon binding of a virus coat protein to a receptor polypeptide. Such chimeric polypeptides, also referred to herein as "single chain" molecules, can be used to screen for agents that inhibit, prevent or disrupt the binding of the coat polypeptide sequence to the polypeptide receptor sequence within the chimeric sequence, or binding of the chimera to a co-receptor polypeptide sequence, thereby identifying potential therapeutics for treating the corresponding viral infection. For example, an agent that inhibits, prevents or disrupts immunodeficiency virus envelope polypeptide CD4 complex binding to CCR5 can be a therapeutic agent for treating a subject having or at risk of having HIV.

Chimeric polypeptides are also useful for producing antibodies specific for the interacting coat protein-receptor complex. Such specific antibodies can be used for passive protection against virus infection or proliferation, for diagnostic purposes and for identifying and characterizing epitopes exposed upon complex formation (e.g., a cryptic epitope). Even in the absence of intramolecular binding between virus coat protein and a receptor, a chimeric polypeptide may be more effective at eliciting an immune response than a virus coat polypeptide sequence alone. Accordingly, such non-interacting chimeric polypeptides also are valuable and are included herein.

Chimeric polypeptides containing a virus coat polypeptide that binds a receptor and co-receptor have the additional advantage of passively protecting against virus infection by inhibiting virus access to cell co-receptors *in vivo*. Moreover, such chimeric polypeptides can be used to screen for therapeutics by identifying agents that inhibit, prevent or disrupt the binding of the chimeric polypeptide to co-receptor. For example, an agent that inhibits, prevents or disrupts binding of the immunodeficiency virus envelope polyeptide-CD4 complex to CCR5 can be a therapeutic agent for treating a subject having or at risk of having HIV. As virus binding to cell receptors is required for virus infection of any cell, chimeric polypeptides comprising a polypeptide sequence of any virus coat protein and a corresponding receptor are included in the invention compositions and methods.

In accordance with the present invention, there are provided chimeric polypeptides

comprising a virus coat polypeptide sequence and a viral receptor polypeptide sequence linked by a spacer. The coat polypeptide sequence and receptor polypeptide sequence of the chimeric polypeptide are linked by a spacer having a sufficient length of amino acids such that the two polypeptide sequences of the chimeric polypeptide preferably bind or interact. In one embodiment, the coat polypeptide sequence is an envelope polypeptide sequence of an immunodeficiency virus. In another embodiment, the coat polypeptide sequence is from a virus that binds a co-receptor polypeptide. In various other embodiments, the coat polypeptide sequence and the receptor polypeptide sequence are active fragments of a corresponding full-length native sequence.

As used herein, the term "coat" means a polypeptide sequence of virus origin that can bind to cells. Generally, virus coat proteins are present near the exterior surface of the virus particle and allow binding and subsequent penetration into the cell membrane. However, a coat polypeptide sequence includes any virus protein capable of binding to or interacting with a receptor polypeptide. Coat polypeptide sequences as defined herein may be non-covalently or covalently associated with other molecular entities, such as carbohydrates, fatty acids, lipids and the like. Coat polypeptide sequences may contain multiple virus polypeptide sequences. For example, a gag polypeptide sequence may also be included with an envelope polypeptide sequence in a chimeric polypeptide to maintain the envelope polypeptide sequence in a conformation that binds to a receptor polypeptide sequence.

Virus coat polypeptide sequences useful in the present invention can be of any origin including, for example, bacterial, plant, and animal viruses, so long as a corresponding cell receptor is known or can be identified. Examples of particular virus included are: *Retroviridae (e.g* human immunodeficiency viruses, such as HIV); *Picornaviridae (e.g.,* polio viruses, hepatitis A virus; enteroviruses, human coxsackie viruses, rhinoviruses, echoviruses); *Calciviridae (e.g.,* strains that cause gastroenteritis); *Togaviradae (e.g.,* equine encephalitis viruses, rubella viruses); *Flaviridae (e.g.,* dengue viruses, encephalitis viruses, yellow fever viruses); *Coronaviridae (e.g.,* coronaviruses); *Rhabdoriridae* (e.g., vesicular stomatitis viruses, rabies viruses); *Filoviridae* (*e.g.,* ebola viruses); *Paramyxoviridae (e.g.,* parainfluenza viruses, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus);

Orthomyxoviridae (e.g., influenza viruses); Bungaviridae (e.g., Hantaan viruses, bunga viruses, phleboviruses and Nairo viruses); *Arena viridae* (hemorrahagic fever viruses); *Reoviridae (e.g.,* reoviruses, orbiviruses and rotaviruses); *Birnaviridae; Hepadnaviridae* (Hepatitis B virus); *Parvoviridae* (parvoviruses); *Papovaviridae* (papilloma viruses, polyoma viruses); *Adenoviridae* (most adenoviruses); *Herpesviridae* (herpes simplex virus (HSV) 2 and 2, varicella zoster virus, cytomegalovirus (CMV), herpes viruses); *Poxviridae* (variola viruses, vaccinia viruses, pox viruses); and *Iridoviridae (e.g.,* African swine fever virus); and unclassified viruses (*e.g.,* the etiological agents of Spongiform encephalopathies, the agent of delta hepatitis (thought to be a defective satellite of hepatitis B virus), the agents of non-A, non-B hepatitis (class 1 = internally transmitted; class 2 = parenterally transmitted *(i.e.,* Hepatitis C); Norwalk and related viruses, and astroviruses). (See also, Table 1).

As used herein, the term "receptor" means any polypeptide expressed by a cell that a virus can bind. Generally, such receptors are naturally present on the surface of a cell, but can be engineered. Receptor polypeptides may be non-covalently or covalently associated with other molecular entities, such as carbohydrates, fatty acids, lipids and the like. A receptor polypeptide may comprise one or multiple contiguous polypeptide segments that are covalently or non-covalently attached. Such molecular entities or other polypeptide sequences may be important for receptor conformation, for example, for binding to a coat polypeptide sequence. Thus, additional elements including molecules important for receptor conformation may therefore be included in the chimeric polypeptides of the present invention. The receptor polypeptide sequence can be either prokaryotic or eukaryotic in origin.

If eukaryotic, both plant and animal receptors are contemplated. Preferred animal receptors are mammalian, including human and primates, for example, chimps, apes, macaques, gibbons, orangutans and the like, as well as other animal species, including domestic animals and livestock. An example of a human receptor is CD4. Other examples of receptors include glycosaminoglycan and CD2, CR1. Additional receptors are known and are applicable in the compositions and methods of the invention (see, for example, Table 1 J see also "Cellular Receptors For Animal Viruses" Eckard Wimmer, ed; Cold Spring Harbor Press (1994)).

TABLE I

Receptor (binding subunit)	Virus (family)	References
Immunglobulin like Molecules		
VCAM-1	EMC-D (Picornavaridae)	Huber (1994)
[CAM-1] (first domain)	Major Group HRVs, CAV 13, 18 and 21 (picornaviridae)	Colonno et al. (1986) Greve et al. (1989) Staunton et al (1989) Tomassini et at. (1989)
PVR (first domain)	Polioviruses (Picornaviridae) (1989)	Koike et at. (1990) Mendelsotm et at. (1989)
CD4 (first domain)	HIV-1, 2; SIV (Lentiviridae) Human herpesvirus 7	Daigleish et at. (1984); Klatzmaim et at. (1984) Lusso et at. (1994)
CEA, several member (first domain)	Mouse hepatitis virus (Coronaviridae)	Williams et al. (1978)
MHC I	Semliki Forest virus (Togaviridae) Factate dehydrogenuse virus Mouse cytomegatovirus (Herpesviridae) SV-40	Hetenius et at. (1978) Otdstone et at. (1980) Inada and Mims (1984) Wykes et at. (1993) Breau et al. (1992)
MHC II	Visna virus (Lentiviridae)	Dalziel et at. (1991)
Integrins		
VLA-2 (α-chain)	ECHO virus 1, 8 (Picornaviridae)	Bergelson et at. (1992, 1993)
(RGD-binding protein)	FMDV (Picornaviridae)	Fox et at. (1989) Mason et at. (1994)
αvβ3 (vibronectin)	CAV 9, ECHO virus 1.8 (Picornaviridae)	Roivainen et at. (1994)
Transport proteins		
Phosphate transporter Analogen	Gibbon ape leukemia virus (Retroviridae) Amphotropic murine (Retroviridae)	Johann et at. (1992) Miller et al. (1994)
Cationic amino acid transporter	Ecotropic murine leukemia virus (Retroviridae)	Albritton et al. (1989)
Signaling Receptors		

LDL Receptor protein family	Minor group HRVs (Picornaviridae) Subgroup A avian leucosis Sarcoma virus (family?)	Hofer et al. (1994) Bates et at. (1993) Connolly et at. (1994)
Acetyicholine receptor (α- 1) EGF receptor	Rabies virus (Rhabdoviridae) Vaccinia virus (Poxviridae)	Leniz (1990) Marsh and Eppstein (1987)
Leukocyte differentiation untigen [CD9]	Feline immunodeficiency Virus (Lentiviridae)	Willett et at. (1994)
Others		
Aminopeptidase N	Human corona virus 229E (Coronaviridae) TGEV (Coronaviridae)	Yeager et at. (1992) Delmas et at. (1992)
Complement receptor CR2	EBV (Herpesviridae)	McClure (1992)
High affinity laminin receptor	Sindbis virus (Togaviridae)	Wang et at. (1992)
Decay-accelerating factor [CD55]	ECHO viruses 7 (6, 11, 12,20,21)	Bergelson et at. (1994)
Membrane cofactor protein	Measles virus (Morbilliviridae)	Dorig et at. (1993)
Moesin	Measles virus (Morbilliviridae)	Dunster et at. (1994)
Glycophorin A	EMCV (Picornaviridae) Reovirus (Reoviridae)	Allaway and Barness (1986) Paul and Lee (1987)
Galactosylceramide	HIV-1 (Lentiviridae)	Bhat et al. (1991)
Erythrocyte P antigen	Parvovirus B19 (Parvoviridae)	Brown et al. (1993)
BLV Rep. 1	Bovine leukemia virus (Retroviridae)	Ban et al. (1993)
Sialoglycoprotein GP-2	Sendai virus (Paramyxoviridae)	Suzuki et al. (1985)
Sialic acid	Influenza virus (Orthomysoviridae) Reoviridae (Reoviridae) Group A porcine rotavirus (Rotaviridae) Human coronavirus OC43, bovine coronavirus (Coronaviridae)	Herrler et al. (1985) Fernandes et al. (1994) Roisma et al. (1994) Vlasak et al. (1988)
Heparan sulfate	Human cytomegalovirus (Herpesviridae) HSV	Compton et al. (1993) WuDunn and Spear (1989)

As used herein, the term "co-receptor" means any receptor that is bound after or in conjunction with virus binding to receptor. Thus, co-receptors include any polypeptide or molecular entity present on a cell that facilitates virus entry, directly

or indirectly, by binding to virus polypeptide-receptor complex. In addition to co-receptors that facilitate virus-entry into cells, also included are co-receptors that mediate cell attachment or tropism without directly or indirectly facilitating virus entry. Particular examples of co-receptors are the 7-transmembrane domain (7-TM) containing chemokine receptors, such as CCR5 and CXCR4, which can bind immunodeficiency virus. Additional co-receptors include CCR-2b, CCR3, CCR8, V28/CXCR1, US28, STRL 33/BOB/TYMSTR, GPR15/Bonzo and GPR1.

As used herein, the terms "polypeptide," "protein" and "peptide" are used interchangeably to denote a sequence polymer of at least two amino acids covalently linked by an amide bond, regardless of length or post-translational modification (e.g., glycosylation, phosphorylation, lipidation, myristilation, ubiquitination, etc.). D- and L-amino acids, and mixtures of D- and L-amino acids are also included.

Chimeric polypeptide refers to an amino acid sequence having two or more parts which generally are not found together in an amino acid sequence in nature.

As disclosed herein, a chimeric polypeptide having a CD4 polypeptide sequence and an HIV envelope gp120 polypeptide sequence that binds CD4 can bind to each other in the chimera when separated by an amino acid spacer sequence. The gp120-CD4 chimera is capable of binding a co-receptor, such as CCR5. Thus, in another embodiment, the chimeric polypeptide has a coat polypeptide sequence of a virus that binds a co-receptor.

CD4 appears to be the target for entry of a variety of viruses associated with immunodeficiency. For example, cells of the immune system, such as lymphocytes and macrophages express CD4, and are susceptible to infection by HIV, SIV, herpes virus 7 and many other viruses. As used herein, the term "immunodeficiency," when used in reference to a virus, means that the virus is capable of infecting cells of immune origin or cells that participate in immune responsiveness, and generally such infection can compromise an infected host's immune function. Thus, the invention is applicable to any virus coat polypeptide of any virus or virus strain that can bind CD4.

In accordance with the present invention, there are provided chimeric polypeptides having an immunodeficiency virus envelope polypeptide sequence. In various aspects, the envelope polypeptide sequence is a polypeptide sequence of HIV, HTLV, SIV, FeLV, FPV and Herpes virus. In other aspects, the virus is a macrophage tropic or a lymphocyte tropic HIV. In another aspect, the HIV is HIV-1 or HIV-2. In various other aspects, the envelope polypeptide sequence is gp120, gp160 or gp41.

Receptor and virus coat polypeptide sequences of the present chimeric polypeptide require a spacer region between them, for example, for forming an interacting complex between the two polypeptides. Although not wishing to be bound by theory, it is believed that the spacer allows the movement or flexibility between receptor and virus coat polypeptide sequences to form an interacting complex.

As used herein, the term "spacer" refers to a physical or chemical moiety, or covalent or non-covalent bond of any size or nature that connects the virus coat polypeptide sequence to the receptor polypeptide sequence while affording the needed flexibility or movement for forming an interacting complex. In the present invention, the spacer preferably links the two polypeptide sequences in an "end to end" orientation. "End to end" means that the amino or carboxyl terminal amino acid of the coat polypeptide is connected to the amino or carboxyl terminal amino acid of the receptor polypeptide sequence. Thus, a spacer can connect the carboxyl terminal amino acid of the coat polypeptide sequence to the amino terminal amino acid of the receptor polypeptide sequence, as exemplified herein for HIV gp120 and CD4, for example. Alternatively, the spacer can connect the amino terminal amino acid of the coat polypeptide to the carboxyl terminal amino acid of the receptor polypeptide or the carboxyl terminal amino acids of the polypeptide sequences or the two amino terminal amino acids of the polypeptide sequences.

Particular examples of spacers include one or more amino acids or a peptidomimetic. An amino acid spacer can essentially be any length, for example, as few as 5 or as many as 200 or more amino acids. Thus, an amino acid spacer can have from about 10 to about 100 amino acids, or have from about 15 to about 50 amino acids. Preferably, the spacer has from about 20 to about 40 amino acids. Other examples of

spacers include a disulfide linkage between the termini of the polypeptide sequences. A carbohydrate spacer also is contemplated. Those skilled in the art will know or can readily ascertain other moieties that can function to allow formation of an interacting complex between the virus coat polypeptide sequence and receptor polypeptide sequence.

Receptor and coat polypeptide sequences can be of any amino acid length. Preferably, they have a length that allows the polypeptide sequences to bind to each other when in a chimeric polypeptide. Thus, receptor and coat polypeptide sequences include native full-length receptor and full-length coat polypeptide sequences as well as parts of the polypeptide sequences. For example, amino acid truncations, internal deletions or subunits of receptor, and coat polypeptide sequences are included. Preferably, such modified forms are capable of interacting with each other. For example, it is preferable that a truncated or deleted coat polypeptide sequence is capable of interacting with a receptor polypeptide sequence. An example of a truncated receptor polypeptide sequence is the CD4 DI and D2 domains, which are capable of interacting with HIV envelope polypeptide sequence (FIG. 9). An example of a truncated coat polypeptide sequence is a truncated HIV gp120 lacking the amino terminal 60 amino acids and carboxy terminal 20 amino acids (e.g., in TcSC)

Thus, in accordance with the present invention, chimeric polypeptides, including truncated or internally deleted sequences, are provided. In one embodiment, the virus coat polypeptide sequence or the receptor polypeptide sequence has one or more amino acids removed in comparison to their corresponding full-length polypeptide sequence. In one aspect, the truncated virus coat polypeptide sequence is an HIV envelope polypeptide sequence and, in another aspect, the truncated receptor polypeptide sequence is a CD4 sequence. As exemplified herein, the truncated HIV envelope polypeptide sequence is a gp120 lacking the amino terminal 60 amino acids or the carboxy terminal 20 amino acids, and a truncated CD4 polypeptide comprising the D 1 and D2 domains. In various other aspects, the chimeric polypeptide comprises an internally deleted virus coat polypeptide sequence or an internally deleted CD4 polypeptide sequence.

In addition to the truncated, internally deleted and subunit polypeptide sequences, additional polypeptide sequence modifications are included. Such modifications include minor substitutions, variations, or derivitizations of the amino acid sequence of one or both of the polypeptide sequences that comprise the chimeric polypeptide, so long as the modified chimeric polypeptide has substantially the same activity or function as the unmodified chimeric polypeptide. For example, a virus coat or receptor polypeptide sequence may have carbohydrates, fatty acids (palmitate, myristate), lipids, be phosphorylated or have other post-translational modifications typically associated with polypeptide sequences.

Another example of a modification is the addition of a heterologous domain that imparts a distinct functionality upon either of the two polypeptides or the chimeric polypeptide. A heterologous domain can be any small organic or inorganic molecule or macromolecule, so long as it imparts an additional function. Heterologous domains may or may not affect interaction or affinity between virus coat polypeptide and receptor polypeptide. Particular examples of heterologous domains that impart a distinct function include an amino acid sequence that imparts targeting (e.g., receptor ligand, antibody, etc.), immunopotentiating function (e.g., immunoglobulin, an adjuvant), enable purification, isolation or detection (e.g., myc, T7 tag, polyhistidine, avidin, biotin, lectins, etc.).

Particular heterologous domains may include a c-myc polypeptide sequence and/or an IgG1 heavy chain polypeptide sequence. A heterologous domain can have multiple functions. For example, IgGl can function as an immunopotentiator *in vivo*, as well as function as an adhesive molecule that can be purified, isolated, or detected (e.g., by reaction with a secondary antibody having an enzymatic activity, such as horseradish peroxidase or alkaline phosphatase). The skilled artisan will know of other heterologous domains and can select them as appropriate depending on the application and the function desired.

Thus, in accordance with the present invention, there are provided chimeric polypeptides having one or more heterologous domains. In one embodiment, the heterologous domain is a c-myc polypeptide sequence glu-gln-lys-leu-ile-ser-glu-glu-asp-leu; (SEQ ID NO: 14). In another embodiment, the heterologous domain is an

immunoglobulin polypeptide sequence comprising a heavy chain (SEQ ID NO: 32).

Receptor and coat polypeptide sequences can be of any amino acid length. Preferably, they have a length that allows the polypeptide sequences to bind to each other when in a chimeric polypeptide. Thus, receptor and coat polypeptide sequences include native full-length receptor and full-length coat polypeptide sequences as well as parts of the polypeptide sequences.

In one aspect, the present invention comprises a full-length single chain (FLSC) chimeric polypeptide comprising a HIV gp120 (BaL strain), an amino acid spacer polypeptide, a CD4 polypeptide sequence comprising the D1D2 domain and a myc peptide "tag" (SEQ ID NO.: 2) or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO: 2 that encodes the chimeric polypeptide.

In another aspect, the prevention invention comprises a FLSC polypeptide having single mutation in a furin cleavage site of the FLSC polypeptide, wherein an R is changed to a T, at the c-terminus of gp120 (FLSC-R/T) or at least 95% sequence identity to SEQ ID NO: 2 that encodes the chimeric polypeptide. Specifically, FLSC R/T contains an arginine to a threonine mutation at amino acid 506 (SEQ ID NO.: 4).

As exemplified herein, polypeptide sequence include substitutions, variations, or derivitizations of the amino acid sequence of one or both of the polypeptide sequences that comprise the chimeric polypeptide, so long as the modified chimeric polypeptide has substantially the same activity or function as the unmodified chimeric polypeptide. For example, a virus coat or receptor polypeptide sequence may have carbohydrates, fatty acids (palmitate, myristate), lipids, be phosphorylated or have other post-translational modifications typically associated with polypeptide sequences.

In yet another aspect, the virus coat polypeptide sequence or the receptor polypeptide sequence has one or more amino acid substitutions in comparison to their corresponding unmodified polypeptide sequences. For example, a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 5) is provided that encodes for a polypeptide that includes a CD4 mimicking receptor that shows substantially the same activity or improved

immune response. Specifically, the gene sequence encoding the amino acid sequence of KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHW in CD4 D1D2 domain of the chimeric polypeptide FLSC-R/T (SEQ ID NO: 4) is substituted with a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 19) that encodes an amino acid sequence of CNLARCQLRCKSLGLLGKCAGSFCACGP (amino acids 528-556 (SEQ ID NO: 20)) which is referred to hereinafter as FLSC -R/T CD4M9. (SEQ ID NO.: 6).

As used herein, the term "substantially the same activity or function," when used in reference to a chimeric polypeptide so modified, means that the polypeptide retains most, all or more of the activity associated with the unmodified polypeptide, as described herein or known in the art. Similarly, modifications that do not affect the ability of chimeric polypeptide to interact with co-receptor are included herein. Likewise, chimeric polypeptide modifications that do not affect the ability to induce a more potent immune response than administration of the virus coat protein alone are included.

Modified chimeric polypeptides that are "active" or "functional" included herein can be identified through a routine functional assay. For example, by using antibody binding assays, co-receptor binding assays, or determining induction of epitopes exposed in a transition state complex normally hidden when the two polypeptide sequences do not bind, one can readily determine whether the modified chimeric polypeptide has activity.

Chimeric polypeptides that induce a more potent immune response can be identified by measuring antibody titers following administration of the chimera to a subject, for example. Modifications that destroy the interaction between the virus coat polypeptide sequence and the receptor polypeptide sequence, or the ability of a chimeric polypeptide having a virus coat polypeptide sequence and receptor sequence which do not interact to induce a more potent immune response, do not have substantially the same activity or function as the corresponding, unmodified chimeric polypeptide and, as such, are not included.

As used herein, the terms "homology" or "homologous," used in reference to polypeptides, refers to amino acid sequence similarity between two polypeptides.

When an amino acid position in both of the polypeptides is occupied by identical amino acids, they are homologous at that position. Thus, by "substantially homologous" means an amino acid sequence that is largely, but not entirely, homologous, and which retains most or all of the activity as the sequence to which it is homologous.

As the modified chimeric polypeptides will retain activity or function associated with unmodified chimeric polypeptide, modified chimeric polypeptides will generally have an amino acid sequence "substantially identical" or "substantially homologous" with the amino acid sequence of the unmodified polypeptide. As used herein, the term "substantially identical" or "substantially homologous," when used in reference to a polypeptide sequence, means that a sequence of the polypeptide is at least 50% identical to a reference sequence. Modified polypeptides and substantially identical polypeptides will typically have at least 70%, alternatively 85%, more likely 90%, and most likely 95% homology to a reference polypeptide. For polypeptides, the length of comparison to obtain the above-described percent homologies between sequences will generally be at least 25 amino acids, alternatively at least 50 amino acids, more likely at least 100 amino acids, and most likely 200 amino acids or more.

As set forth herein, substantially identical or homologous polypeptides include additions, truncations, internal deletions or insertions, conservative and non-conservative substitutions, or other modifications located at positions of the amino acid sequence which do not destroy the function of the chimeric polypeptide (as determined by functional assays, e.g., as described herein). A particular example of a substitution is where one or more amino acids is replaced by another, chemically or biologically similar residue. As used herein, the term "conservative substitution" refers to a substitution of one residue with a chemically or biologically similar residue. Examples of conservative substitutions include the replacement of a hydrophobic residue, such as isoleucine, valine, leucine, or methionine for another, the replacement of a polar residue for another, such as the substitution of arginine for lysine, glutamic for aspartic acids, or glutamine for asparagine, and the like. Those of skill in the art will recognize the numerous amino acids that can be modified or substituted with other chemically similar residues without substantially altering activity.

Substantially identical or homologous polypeptides also include those having modifications that improve or confer an additional function or activity. For example, FLSC R/T has a mutated furin site which increases stability of the modified FLSC (see, e.g., FIG. 13).

Modified polypeptides further include "chemical derivatives," in which one or more of the amino acids therein have a side chain chemically altered or derivatized. Such derivatized polypeptides include, for example, amino acids in which free amino groups form amine hydrochlorides, p-toluene sulfonyl groups, carobenzoxy groups; the free carboxy groups form salts, methyl and ethyl esters; free hydroxyl groups that form O-acyl or O-alkyl derivatives, as well as naturally occurring amino acid derivatives, for example, 4-hydroxyproline, for proline, 5-hydroxylysine for lysine, homoserine for serine, ornithine for lysine, and so forth. Also included are D-amino acids and amino acid derivatives that can alter covalent bonding, for example, the disulfide linkage that forms between two cysteine residues that produces a cyclized polypeptide.

As used herein, the terms "isolated" or "substantially pure," when used as a modifier of invention chimeric polypeptides, sequence fragments thereof, and polynucleotides, means that they are produced by human intervention and are separated from their native *in vivo* -cellular environment. Generally, polypeptides and polynucleotides so separated are substantially free of other proteins, nucleic acids, lipids, carbohydrates or other materials with which they are naturally associated.

Typically, a polypeptide is substantially pure when it is at least 60%, by weight, free from the proteins and other molecules with which it is naturally associated. The preparation is likely at least 75%, more likely at least 90%, and most likely at least 95%, by weight pure. Substantially pure chimeric polypeptide can be obtained, for example, by expressing a polynucleotide encoding the polypeptide in cells and isolating the polypeptide produced. For example, as set forth in the examples, expression of a recombinant polynucleotide encoding a gp120-CD4 polypeptide in mammalian cells allows isolating the chimerical polypeptide from the culture media using an immunoaffinity column. Alternatively, the chimeric polypeptide can be

chemically synthesized. Purity can be measured by any appropriate method, e.g., polyacrylamide gel electrophoresis, and subsequent staining of the gel (e.g., silver stain) or by HPLC analysis.

The chimeric polypeptides of the present invention and modifications thereof can be prepared by a variety of methods known in the art. The polypeptide modifications can be introduced by site-directed (e.g., PCR based) or random mutagenesis (e.g., EMS) by exonuclease deletion, by chemical modification, or by fusion of polynucleotide sequences encoding heterologous domain, for example. Chimeric polypeptides can be obtained by expression of a polynucleotide encoding the polypeptide in a host cell, such as a bacteria, yeast or mammalian cell, and purifying the expressed chimeric polypeptide by purification using typical biochemical methods (e.g., immunoaffinity purification, gel purification, expression screening etc). Other well-known methods are described in Deutscher et al., (Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology, Vol. 182, Academic Press (1990), which is incorporated herein by reference).

The present invention further provides polynucleotide sequences encoding chimeric polypeptides, fragments thereof, and complementary sequences. In one embodiment, nucleic acids encode the chimeric gp120-CD4 polypeptide exemplified herein. For example, SEQ ID NO.: 1 defines the sequence encoding FLSC described hereinabove comprising a nucleotide sequence encoding gp120 (SEQ ID 23) and CD4 D1D2 (SEQ ID NO: 25). SEQ. ID NO: 3 defines a sequence encoding FLSC R/T wherein an arginine amino acid is substituted for a threonine at the c-terminal of the gp120, a suspect furin cleavage site in gp120, thereby improving the stability of the FLSC-R/T over FLSC. The nucleotide sequence of FLSC-RT comprises a modified gp120 encoded by SEQ ID NO: 29 and CD4D1D2 (SEQ ID NO: 25). Still further, the present invention provides for polynucleotide sequence SEQ ID NO.: 5 that encodes for a chimeric polypeptide FLSC R/T CD4M9 comprising a substituted furin cleavage site and further provides for replacement of gene sequence encoding the CD4 D1D2 region with a sequence that encodes for an amino acid sequence that mimics a CD4 receptor, thereby providing for an improved immune response and additional stability relative to FLSC or FLSC-R/T. The FLSC R/T CD4M9 is encoded by nucleotide sequences comprising SEQ ID.NO: 29 that encodes for a

modified gp120 and SEQ ID NO: 19 encoding for CD4M9. The FLSC R/T CD4M9 chimeric polypeptide may additionally comprise SEQ ID NOs: 23 and 19.

In yet another embodiment, TsSC (SEQ ID NO: 12) encode a gp120-CD4 polypeptide (SEQ ID NO: 13) in which the gp120 has amino acid sequences truncated from the amino and carboxy terminus. The nucleotide sequence of TsSC comprises a sequence (SEQ ID NO: 27) that encodes for a truncated gp120 and CD4D1D2 (SEQ ID NO: 25). In another embodiment, a chimeric polypeptide gp120-CD4-IgG1 is encoded by nucleotide SEQ ID NO: 1 with an additional tag (SEQ ID NO: 31)

As used herein, the terms "nucleic acid," "polynucleotide," "oligonucleotide," and "primer" are used interchangeably to refer to deoxyribonucleic acid (DNA) or ribonucleic (RNA), either double- or single-stranded, linear or circular. RNA can be unspliced or spliced mRNA, rRNA, tRNA, or antisense RNAi. DNA can be complementary DNA (cDNA), genomic DNA, or an antisense. Specifically included are nucleotide analogues and derivatives, such as those that are resistant to nuclease degradation, which can function to encode an invention chimeric polypeptide. Nuclease resistant oligonucleotides and polynucleotides are particularly useful for the present nucleic acid vaccines described herein.

An "isolated" or "substantially pure" polynucleotide means that the nucleic acid is not immediately contiguous with the coding sequences with either the 5' end or the 3' end with which it is immediately contiguous in the naturally occurring genome of the organism from which it is derived. The term therefore includes, for example, a recombinant DNA (e.g., a cDNA or a genomic DNA fragment produced by PCR or restriction endonuclease treatment produced during cloning), as well as a recombinant DNA incorporated into a vector, an autonomously replicating plasmid or virus, or a genomic DNA of a prokaryote or eukaryote. It also includes a recombinant DNA part of a chimera or fusion, for example. The term therefore does not include nucleic acids present but uncharacterized among millions of sequences in a genomic or cDNA library, or in a restriction digest of a library fractionated on a gel.

The polynucleotides of the invention also include nucleic acids that are degenerate as a result of the genetic code. There are 20 natural amino acids, most of which are specified by more than one codon. All degenerate polynucleotide sequences are included that encode invention chimeric polypeptides.

The polynucleotides sequences of the present invention can be obtained using standard techniques known in the art (e.g., molecular cloning, chemical synthesis) and the purity can be determined by polyacrylamide or agarose gel electrophoresis, sequencing analysis, and the like. Polynucleotides also can be isolated using hybridization or computer-based techniques that are well known in the art. Such techniques include, but are not limited to: (1) hybridization of genomic DNA or cDNA libraries with probes to detect homologous nucleotide sequences; (2) antibody screening of polypeptides expressed by DNA sequences (e.g., using an expression library); (3) polymerase chain reaction (PCR) of genomic DNA or cDNA using primers capable of annealing to a nucleic acid sequence of interest; (4) computer searches of sequence databases for related sequences; and (5) differential screening of a subtracted nucleic acid library. Thus, to obtain other receptor encoding polynucleotides, such as those encoding CD4, for example, libraries can be screened for the presence of homologous sequences.

The invention also includes substantially homologous polynucleotides. As used herein, the term "homologous," when used in reference to nucleic acid molecule, refers to similarity between two nucleotide sequences. When a nucleotide position in both of the molecules is occupied by identical nucleotides, then they are homologous at that position. "Substantially homologous" nucleic acid sequences are at least 50% homologous, more likely at least 75% homologous, and most likely 90% or more homologous. As with substantially homologous invention chimeric polypeptides, polynucleotides substantially homologous to invention polynucleotides encoding chimeric polypeptides encode polypeptides that retain most or all of the activity or function associated with the sequence to which it is homologous. For polynucleotides, the length of comparison between sequences will generally be at least 30 nucleotides, alternatively at least 50 nucleotides, more likely at least 75 nucleotides, and most likely 110 nucleotides or more. Algorithms for identifying homologous sequences that account for polynucleotide sequence gaps and

mismatched oligonucleotides are known in the art, such as BLAST (see, e.g., Altschul *et al., J. Mol. Biol.* 15:403-10 (1990)).

In addition, polynucleotides are useful as hybridization probes in order to identify the presence or amount of a polynucleotide encoding a chimeric polypeptide, for example, mRNA (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)). Typically such probes are designed to be specific for the desired sequence in order to decrease the probability of hybridizing to unrelated sequences. Such probes can be modified so as to be detectable using radionuclides, luminescent moieties, and so forth. Hybridization conditions also can be modified in order to achieve the desired specificity. For example, a moderately stringent hybridization condition may include: 2X SSC/0.l% SDS at about 37°C or 42°C (hybridization conditions); 0.5X SSC/0.l% SDS at about room temperature (low stringency wash); 0.5X SSC/0. 1% SDS at about 42°C (moderate stringency wash). An example of moderately-high stringency hybridization conditions is as follows: 0.1 X SSC/0.l% SDS at about 52°C (moderately-high stringency wash). An example of high stringency hybridization conditions is as follows: 0.1 X SSC/0.1% SDS at about 65°C (high stringency wash).

The polynucleotides of the present invention can, if desired: be naked or be in a carrier suitable for passing through a cell membrane (e.g., polynucleotide-liposome complex or a colloidal dispersion system), contained in a vector (e.g., retrovirus vector, adenoviral vectors, and the like), linked to inert beads or other heterologous domains (e.g., antibodies, ligands, biotin, streptavidin, lectins, and the like), or other appropriate compositions disclosed herein or known in the art. Thus, viral and non-viral means of polynucleotide delivery can be achieved and are contemplated. The polynucleotides of the present invention can also contain additional nucleic acid sequences linked thereto that encode a polypeptide having a distinct functionality, such as the various heterologous domains set forth herein.

The polynucleotides of the present invention can also be modified, for example, to be resistant to nucleases to enhance their stability in a pharmaceutical formulation. The described polynucleotides are useful for encoding chimeric polypeptides of the present invention, especially when such polynucleotides are incorporated into

expression systems disclosed herein or known in the art. Accordingly, polynucleotides including an expression vector are also included.

For propagation or expression in cells, polynucleotides described herein can be inserted into a vector. The term "vector" refers to a plasmid, virus, or other vehicle known in the art that can be manipulated by insertion or incorporation of a nucleic acid. Such vectors can be used for genetic manipulation (i.e., "cloning vectors") or can be used to transcribe or translate the inserted polynucleotide (i.e., "expression vectors"). A vector generally contains at least an origin of replication for propagation in a cell and a promoter. Control elements, including promoters present within an expression vector, are included to facilitate proper transcription and translation (e.g., splicing signal for introns, maintenance of the correct reading frame of the gene to permit in-frame translation of mRNA and stop codons). *In vivo* or *in vitro* expression of the polynucleotides described herein can be conferred by a promoter operably linked to the nucleic acid. "Promoter" refers to a minimal nucleic acid sequence sufficient to direct transcription of the nucleic acid to which the promoter is operably linked (see, e.g., Bitter *et al., Methods in Enzymology,* 153:5 16-544 (1987)). Promoters can constitutively direct transcription, can be tissue-specific, or can render inducible or repressible transcription; such elements are generally located in the 5' or 3' regions of the gene so regulated.

In the present invention, for viruses that bind a co-receptor, it is advantageous to introduce and express a polynucleotide encoding a chimeric polypeptide into the cells that are susceptible to viral infection (e.g., cells that express the co-receptor). In this way, the expressed chimeric polypeptide will be secreted by the transformed susceptible cell in close proximity to the co-receptor, thereby inhibiting or preventing access of the virus to the co-receptor which, in turn, inhibits or prevents viral infection of cells. To this end, a tissue-specific promoter can be operably linked to the polynucleotide sequence to confer expression of the chimeric polypeptide in an appropriate target cell.

As used herein, the phrase "tissue-specific promoter" means a promoter that is active in particular cells or tissues that confers expression of the operably linked polynucleotide in the particular cells, e.g., liver cells, hematopoietic cells, or cells of

a specific tissue within an animal. The term also covers so-called "leaky" promoters, which regulate expression of a selected DNA primarily in one tissue, but cause expression in one or more other tissues as well.

An inducible promoter can also be used to modulate expression in cells. "Inducible promoter" means a promoter whose activity level increases in response to treatment with an external signal or agent (e.g., metallothionein IIA promoter, heat shock promoter). A "repressible promoter" or "conditional promoter" means a promoter whose activity level decreases in response to a repressor or an equivalent compound. When the repressor is no longer present, transcription is activated or derepressed. Such promoters may be used in combination and also may include additional DNA sequences that are necessary for transcription and expression, such as introns and enhancer sequences.

As used herein, the term "operably linked" means that a selected polynucleotide (e.g., encoding a chimeric polypeptide) and regulatory sequence(s) are connected in such a way as to permit transcription when the appropriate molecules (e.g., transcriptional activator proteins) are bound to the regulatory sequence(s). Typically, a promoter is located at the 5' end of the polynucleotide and may be in close proximity of the transcription initiation site to allow the promoter to regulate expression of the polynucleotide. However, indirect operable linkage is also possible when a promoter on a first vector controls expression of a protein that, in turn, regulates a promoter controlling expression of the polynucleotide on a second vector.

When cloning in bacterial systems, constitutive promoters, such as T7 and the like, as well as inducible promoters, such as pL of bacteriophage gamma, plac, ptrp, ptac, may be used. When cloning in mammalian cell systems, constitutive promoters, such as SV40, RSV and the like, or inducible promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., the metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., the mouse mammary tumor virus long terminal repeat, the adenovirus late promoter), may be used. Promoters produced by recombinant DNA or synthetic techniques may also be used to provide for transcription of the nucleic acid sequences of the invention.

Mammalian expression systems that utilize recombinant viruses or viral elements to direct expression may be engineered. For example, when using adenovirus expression vectors, the nucleic acid sequence may be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, e.g., the late promoter and tripartite leader sequence. Alternatively, the vaccinia virus 7.5K promoter may be used (see, e.g., Mackett *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 79:7415-7419 (1982); Mackett *et al., J. Virol.,* 49:857-864 (1984); Panicali *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 79:4927-4931 (1982)).

Mammalian expression systems further include vectors specifically designed for "gene therapy" methods, including adenoviral vectors (U.S. Patent Nos. 5,700,470 and 5,731,172), adeno-associated vectors (U.S. Patent No. 5,604,090), herpes simplex virus vectors (U.S. Patent No. 5,501,979), and retroviral vectors (U.S. Patent Nos. 5,624,820, 5,693,508 and 5,674,703 and WIPO publications WO92/05266 and WO92/14829). The chimeric polypeptide encoding gene can be introduced into vaccine delivery vehicles, such as attenuated vaccinia (M. Girard *et al., C R Acad Sci III.,* 322:959-66 (1999); B. Moss *et al., AIDS, 2* Suppl 1:S103-5 (1988)), Semiliki-forest virus (M. Girard *et al., C R Acad Sci III.,* 322:959-66 (1999); S.P. Mossman *et al., J Virol., 70:* 19.53-60 (1996)), or *Salmonella* (R. Powell *et al.,* In: Molecular Approaches to the control of infectious diseases, pp. 183-l 87, F. Bran, E. Norrby, D. Burton, and J. Meckalanos (eds), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1996); M.T. Shata et *al., Mol Med Today,* 6:66-71 (2000)) to provide an efficient and reliable means for the expression of properly associated and folded virus coat protein and receptor sequences, for example, gp120 and CD4. Vectors based on bovine papilloma virus (BPV) have the ability to replicate as extra-chromosomal elements (Sarver *et al., Mol. Cell. Biol.,* 1:486 (1981)). Shortly after entry of an extra-chromosomal vector into mouse cells, the vector replicates to about 100 to 200 copies per cell. Because transcription of the inserted cDNA does not require integration of the plasmid into the host's chromosome, a high level of expression occurs. Such vectors also have been employed in gene therapy (U.S. Patent No. 5,719,054). CMV-based vectors also are included (U.S. Patent No. 5,561,063).

For yeast expression, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters may be used (see, e.g., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2,

Ch. 13, ed. Ausubel et *al.,* Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience (1988); Grant *et al.,* "Expression and Secretion Vectors for Yeast," in Methods in Enzymology, Vol. 153, pp. 516-544, eds. Wu & Grossman, 3 1987, Acad. Press, N.Y. (1987); Glover, DNA Cloning, Vol. II, Ch. 3, IRL Press, Wash., D.C. (1986); Bitter, "Heterologous Gene Expression in Yeast," Methods in Enzymology, Vol. 152, pp. 673-684, eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y. (1987); and The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, eds. Strathem et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II (1982)). A constitutive yeast promoter, such as ADH or LEU2, or an inducible promoter, such as GAL, may be used ("Cloning in Yeast," R. Rothstein, In: DNA Cloning, A Practical Approach, Vol. 11, Ch. 3, ed. D.M. Glover, IRL Press, Wash., D.C. (1986)). Alternatively, vectors that facilitate integration of foreign nucleic acid sequences into a yeast chromosome, via homologous recombination, for example, are known in the art and can be used. Yeast artificial chromosomes (YAC) are typically used when the inserted polynucleotides are too large for more conventional yeast expression vectors (e.g., greater than about 12 kb). The polynucleotides may be inserted into an expression vector for expression *in vitro (e.g.,* using *in vitro* transcription/translation kits, which are available commercially), or may be inserted into an expression vector that contains a promoter sequence that facilitates expression in either prokaryotes or eukaryotes by transfer of an appropriate nucleic acid into a suitable cell, organ, tissue, or organism *in vivo.*

As used herein, a "transgene" is any piece of a polynucleotide inserted by artifice into a host cell, and becomes part of the organism that develops from that cell. A transgene can include one or more promoters and any other DNA, such as introns, necessary for expression of the selected DNA, all operably linked to the selected DNA, and may include an enhancer sequence. A transgene may include a polynucleotide that is partly or entirely heterologous (i.e., foreign) to the transgenic organism, or may represent a gene homologous to an endogenous gene of the organism. Transgenes may integrate into the host cell's genome or be maintained as a self-replicating plasmid.

As used herein, a "host cell" is a cell into which a polynucleotide is introduced that can be propagated, transcribed, or encoded polypeptide expressed. The term also includes any progeny of the subject host cell. It is understood that all progeny may

not be identical to the parental cell, since there may be mutations that occur during replication. Host cells include but are not limited to bacteria, yeast, insect, and mammalian cells. For example, bacteria transformed with recombinant bacteriophage polynucleotide, plasmid nucleic acid, or cosmid nucleic acid expression vectors; yeast transformed with recombinant yeast expression vectors; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV), or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid), insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus), or animal cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., retroviruses, adenovirus, vaccinia virus), or transformed animal cell systems engineered for stable expression.

For long-term expression of invention polypeptides, stable expression is preferred. Thus, using expression vectors containing viral origins of replication cells can be transformed with a nucleic acid controlled by appropriate control elements (e.g.,promoter/enhancer sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.). Although not wishing to be bound or so limited by any particular theory, stable maintenance of expression vectors in mammalian cells is believed to occur by integration of the vector into a chromosome of the host cell. Optionally, the expression vector also can contain a nucleic acid encoding a selectable marker conferring resistance to a selective pressure or reporter indicating the cells into which the gene has been introduced, thereby allowing cells having the vector to be identified, grown, and expanded. As used herein, "reporter gene" means a gene whose expression may be assayed; such genes include, without limitation, *lacZ*, amino acid biosynthetic genes, e.g. the yeast LEI2 gene, luciferase, or the mammalian chloramphenicol transacetylase (CAT) gene. Reporter genes may be integrated into the chromosome or may be carried on autonomously replicating plasmids (e.g., yeast 2 micron plasmids). Alternatively, the selectable marker can be on a second vector cotransfected into a host cell with a first vector containing an invention polynucleotide.

A number of selection systems may be used, including, but not limited to the *neomycin* gene, which confers resistance to the aminoglycoside G418 (Colberre-

Garapin *et al., J Mol. Biol.,* 150: 1 (1981)) and the *hygromycin* gene, which confers resistance to hygromycin (Santerre *et al, Gene,* 30: 147 (1984)). Recently, additional selectable genes have been described, namely trpB, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan; hisD, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 85:8047 (1988)); and ODC (ornithine decarboxylase), which confers resistance to the ornithine decarboxylase inhibitor, 2-(difluoromethyl)-DL-ornithine, DFMO (McConlogue, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. (1987)).

As used herein, the term "transformation" means a genetic change in a cell following incorporation of a polynucleotide (e.g., a transgene) exogenous to the cell. Thus, a "transformed cell" is a cell into which, or a progeny of which, a polynucleotide has been introduced by means of recombinant techniques. Transformed cells do not include an entire human being. Transformation of a host cell may be carried out by conventional techniques known to those skilled in the art. When the host cell is a eukaryote, methods of DNA transformation include, for example, calcium phosphate, microinjection, electroporation, liposomes, and viral vectors. Eukaryotic cells also can be co-transformed with invention polynucleotide sequences or fragments thereof, and a second DNA molecule encoding a selectable marker, as described herein or otherwise known in the art. Another method is to use a eukaryotic viral vector, such as simian virus 40 (SV40) or bovine papilloma virus, to transiently infect or transform eukaryotic cells, and express the protein (see, e.g., Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed. (1982)). When the host is prokaryotic (e.g., *E. coli),* competent cells that are capable of DNA uptake can be prepared from cells harvested after exponential growth phase and subsequently treated by the $CaCl_2$ method using procedures well-known in the art. Transformation of prokaryotes also can be performed by protoplast fusion of the host cell.

Chimeric polypeptides, polynucleotides, and expression vectors containing same of the present invention can be encapsulated within liposomes using standard techniques and introduced into cells or whole organisms. Cationic liposomes are preferred for delivery of polynucleotides. The use of liposomes for introducing various compositions *in vitro* or *in vivo,* including proteins and polynucleotides, is known to those of skill in the art (see, for example, U.S. Patent Nos. 4,844,904,

5,000,959, 4,863,740 and 4,975,282).

Liposomes can be targeted to a cell type or tissue of interest by the addition to the liposome preparation of a ligand, such as a polypeptide, for which a corresponding cellular receptor has been identified. For example, in the case of a virus that infects a CD4+ cell, CD4+ cells are an appropriate target and HIV gp120 could be an appropriate ligand for intracellular introduction of a liposome containing a chimeric polypeptide or polynucleotide sequence as described herein. Monoclonal antibodies can also be used for targeting; many such antibodies specific for a wide variety of cell surface proteins are known to those skilled in the art and are available. The selected ligand is covalently conjugated to a lipid anchor in either preformed liposomes or are incorporated during liposome preparation (see Lee & Low, *J Biol. Chem.*, 269:3 198 (1994); Lee & Low *Biochem. Biophys. Actu*, 1233: 134 (1995)).

The chimeric polypeptides and polynucleotides encoding same of the present invention can be introduced into a whole organism. In particular, for chimeric polypeptides that contain a virus coat polypeptide that binds to co-receptor, transgenic animals expressing invention chimeric polypeptides would be useful for studying the long-term effects of chimeric expression, as well as determining whether the expressed chimeric polypeptide could protect or inhibit infection by a corresponding virus.

Thus, in another embodiment, the invention provides non-human transgenic animals that express chimeric polypeptides. Preferred animals are susceptible to viral infection for which a corresponding receptor polypeptide sequence is known. Preferred animals are those susceptible to immunodeficiency virus infection, including mammals, such as non-human primates (e.g., macaques, chimpanzees, apes, gibbons, orangutans, etc.), domestic animals, and livestock, as described herein.

The term "transgenic animal" refers to any animal whose somatic or germ line cells bear genetic information received, directly or indirectly, by deliberate genetic manipulation at the subcellular level, such as by microinjection or infection with recombinant virus. The term "transgenic" further includes cells or tissues (i.e., "transgenic cell," "transgenic tissue") obtained from a transgenic animal genetically

manipulated, as described herein. In the present context, a "transgenic animal" does not encompass animals produced by classical crossbreeding or in *vitro* fertilization, but rather denotes animals in which one or more cells receive a recombinant DNA molecule. Transgenic animals can be either heterozygous or homozygous with respect to the transgene. Methods for producing transgenic animals are well known in the art (see, for example, U.S. Patent Nos. 5,721,367, 5,695,977, 5650,298, and 5614,396).

The chimeric polypeptides described herein can be used to generate additional reagents, such as antibodies. Invention antibodies are useful in the various treatment methods set forth herein. For example, the antibody produced in an immunized subject can protect the subject against virus infection or, alternatively, be transferred to a recipient subject, thereby passively protecting the second subject against infection. Antibodies that bind to an epitope exposed upon complex formation between a virus coat polypeptide sequence and a receptor polypeptide sequence also can be generated. In addition, invention antibodies are useful in diagnostic methods, purification methods, and in screening methods (e.g., identifying cryptic epitopes, co-receptors, etc.), as disclosed herein.

Thus, in accordance with the present invention, antibodies that bind to chimeric polypeptides, including antibodies specific for cryptic epitopes exposed upon complex formation as set forth herein, are provided. In one embodiment, the antibody neutralizes multiple viral isolates and viruses from different geographic clades (termed "broadly neutralizing") *in vitro*. In another embodiment, the antibody inhibits, prevents, or blocks virus infection *in vitro* or *in vivo*. In various aspects of these embodiments, the virus neutralized is an immunodeficiency virus, including the HIV-1 and HIV-2 immunodeficiency viruses set forth herein. Antibody comprising polyclonal antibodies, pooled monoclonal antibodies with different epotopic specificities, and distinct monoclonal antibody preparations, also are provided.

Antibodies to chimeric polypeptide are produced by administering a chimeric polypeptide to an animal. The antibodies can be produced, isolated, and purified using methods well-known in the art. Thus, in another embodiment, the invention provides methods for producing an antibody to a chimeric polypeptide. A method of

the invention includes administering a chimeric polypeptide to a subject and isolating the antibodies that bind to the chimeric polypeptide. In one embodiment, the antibody produced binds to a cryptic epitope exposed upon the binding between a virus coat polypeptide sequence and a receptor polypeptide sequence.

Preferably, antibodies bind to cryptic epitopes exposed when the virus coat polypeptide sequence (e.g., envelope polypeptide sequence) and the receptor polypeptide sequence bind to each other. For example, the HIV envelope polypeptide sequence gp120 exposes a cryptic epitope upon binding to CD4 receptor polypeptide sequence, and antibodies to the exposed epitope can lead to broad neutralization of HIV. Such epitopes may be shared among different viral isolates and geographic clades accounting for broad-spectrum neutralizing activity of the antibodies directed to these epitopes.

Although not wishing to be bound by theory, it appears that in the absence of CD4 binding, the cryptic epitope is not exposed or is not antigenic. As used herein, the term "epitope" refers to an antigenic determinant on an antigen to which the paratope of an antibody binds. Epitopic determinants usually consist of chemically active surface groupings of molecules, such as amino acids or carbohydrate side chains, and usually have specific three-dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. As used herein, the term "cryptic" refers to a property or feature that requires a structural or conformational change for the feature or property to become apparent; in the absence of the change, the feature or property is "hidden." Cryptic epitopes may be present on either virus coat proteins or receptor polypeptide sequences.

The term "antibody" includes intact molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, $F(ab')_2$, and Fv, which are capable of binding to an epitopic determinant present in a chimeric polypeptide described herein. Other antibody fragments are included, so long as the fragment retains the ability to selectively bind with its antigen. Antibody fragments (e.g., Fab, $F(ab')_2$, and Fv) of the present invention can be prepared by proteolytic hydrolysis of the antibody, for example, by pepsin digestion of whole antibodies. Antibodies which bind to disclosed chimeric polypeptides can be prepared using intact chimeric polypeptide or fragments thereof as the

immunizing antigen. In the case of chimeric polypeptide fragments, it is preferred that the virus coat polypeptide sequence and the receptor polypeptide sequence maintain the ability to bind each other so that any cryptic epitopes present will be exposed. The chimeric polypeptide used to immunize an animal is derived from translated polynucleotide or is chemically synthesized and, if desired, can be conjugated to a carrier. Such commonly used carriers chemically coupled to the immunizing peptide include, for example, keyhole limpet hemocyanin (KLH), thyroglobulin, bovine serum albumin (BSA), and tetanus toxoid.

Monoclonal antibodies are made by methods well-known to those skilled in the art (Kohler *et al., Nature,* 256:495 (1975); and Harlow *et al.,* Antibodies: A Laboratory Manual, p. 726, eds. Cold Spring Harbor Pub. (1988), which are incorporated herein by reference). Briefly, monoclonal antibodies can be obtained by injecting mice with a composition comprising an antigen, verifying the presence of antibody production by analyzing a serum sample, removing the spleen to obtain B lymphocytes, fusing the B lymphocytes with myeloma cells to produce hybridomas, cloning the hybridomas, selecting positive clones that produce antibodies to the antigen, and isolating the antibodies from the hybridoma cultures. Monoclonal antibodies can be isolated and purified from hybridoma cultures by a variety of well-established techniques, which include, for example, affinity chromatography with Protein-A Sepharose, size-exclusion chromatography, and ion-exchange chromatography (see, e.g., Coligan *et al.,* "Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters," In: Current Protocols in Immunology, §§ 2.7.1-2.7.12 and §§ 2.9.1-2.9.3; and Barnes *et al.,* "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," In: Methods in Molecular Biology, Vol. 10, pp. 79-104, Humana Press (1992)). The preparation of polyclonal antibodies is well-known to those skilled in the art (see, e.g., Green *et al.,* "Production of Polyclonal Antisera," In: Immunochemical Protocols, pp. 1-5, Manson, ed., Humana Press (1992); Harlow *et al.* (1988), *supra;* and Coligan *et al.* (1992), *supra* §2.4.1, which are incorporated herein by reference).

For therapeutic purposes, antibodies to a chimeric polypeptide produced in one species can be humanized so that the antibody does not induce an immune response when administered to the host, for example, for passive immunization. Generally, humanized antibodies are produced by replacing a non-human constant region with a

human constant region. Such antibody humanization methods are known in the art and are particularly useful in the methods of the invention (Morrsion *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 81:685 1 (1984); Takeda et al., *Nature,* 314:452 (1985); Singer *et al., J. Immunol.,* 150:2844 (1993)).

Antibodies that bind a chimeric polypeptide, particularly, antibodies that bind a cryptic epitope, can neutralize the virus *in vitro* or *in vivo* (i.e., in a subject). Such antibodies can therefore prevent or inhibit virus infection *in vitro* or *in vivo,* and may ameliorate some or all of the symptoms associated with the infection. Such antibodies can be produced in one subject and then introduced into another, i.e., for passive immunotherapy. Alternatively, antibodies that bind chimeric polypeptides, when produced in a subject, can protect that subject from infection or ameliorate some or all of the symptoms associated with the infection.

Thus, in accordance with the present invention, there are provided methods for inhibiting, preventing, and ameliorating a viral infection in a subject. In one embodiment, a method of the invention includes administering an effective amount of an antibody that binds to a chimeric polypeptide to a subject, thereby preventing or inhibiting virus infection in the subject. In another embodiment, a method of the invention includes administering an effective amount of a chimeric polypeptide to a subject, thereby producing an immune response sufficient for preventing or inhibiting virus infection in the subject. In yet another embodiment, a method of the invention includes administering to a subject an effective amount of a polynucleotide encoding an invention chimeric polypeptide. In various aspects, the chimeric polypeptide contains an immunodeficiency virus envelope polypeptide, as disclosed herein.

In the methods for inhibiting, preventing, and ameliorating a viral infection in a subject in which a chimeric polypeptide or a polynucleotide encoding a chimeric polypeptide are administered, an immune response also can be produced. The immune response will likely be humoral in nature, although a administering a polynucleotide encoding a chimeric polypeptide may induce a CTL response. It is also understood that the methods of the invention can also be used in combination with other viral therapies, as appropriate.

The "effective amount" will be sufficient to inhibit, prevent, or ameliorate a viral infection in a subject, or will be sufficient to produce an immune response in a subject. Thus, an effective amount of chimeric polypeptide can be that which elicits an immune response to the polypeptide or a virus upon which the coat protein is based. An effective amount administered to a subject already infected with the virus can also be that which decreases viral load, or increases the number of CD4 + cells. An effective amount can be that which inhibits transmission of the virus from an infected subject to another (uninfected or infected).

In the methods of the invention in which a polynucleotide sequence encoding a chimeric polypeptide is administered to a subject, a CTL response to the chimeric polypeptide can be produced against a virus that contains the corresponding coat polypeptide sequence.

As the chimeric polypeptides, polynucleotides, and antibodies of the present invention will be administered to subjects, including humans, the present invention also provides pharmaceutical formulations comprising the disclosed chimeric polypeptides, polynucleotides, and antibodies. The compositions administered to a subject will therefore be in a "pharmaceutically acceptable " or "physiologically acceptable" formulation.

As used herein, the terms "pharmaceutically acceptable" and "physiologically acceptable" refer to carriers, diluents, excipients, and the like that can be administered to a subject, preferably without excessive adverse side effects (e.g., nausea, headaches, etc.). Such preparations for administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils, such as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions, or suspensions, including saline and buffered media. Vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's or fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers (such as those based on Ringer's dextrose), and the like. Preservatives and other additives may also be present, such as, for example, antimicrobial, anti-oxidants, chelating agents, and inert

gases and the like. Various pharmaceutical formulations appropriate for administration to a subject known in the art are applicable in the methods of the invention (e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990); and The Merck Index, 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ (1996)).

Controlling the duration of action or controlled delivery of an administered composition can be achieved by incorporating the composition into particles or a polymeric substance, such as polyesters, polyamine acids, hydrogel, polyvinyl pyrrolidone, ethylene-vinylacetate, methylcellulose, carboxymethylcellulose, protamine sulfate or lactide/glycolide copolymers, polylactide/glycolide copolymers, or ethylenevinylacetate copolymers. The rate of release of the composition may be controlled by altering the concentration or composition of such macromolecules. Colloidal dispersion systems include macromolecule complexes, nano-capsules, microspheres, beads, and lipid-based systems, including oil-in-water emulsions, micelles, mixed micelles, and liposomes.

The compositions administered by a method of the present invention can be administered parenterally by injection, by gradual perfusion over time, or by bolus administration (for example, in the case of passive protection against HIV infection resulting from a needlestick injury) or by a microfabricated implantable device. The composition can be administered via inhalation, intravenously, intraperitoneally, intramuscularly, subcutaneously, intracavity (e.g., vaginal or anal), transdermally, topically, or intravascularly. The compositions can be administered in multiple doses. The doses or "effective amount" needed for treating, inhibiting, or preventing viral infection or transmission, or for inducing an immune response, preferably will be sufficient to ameliorate some or all of the symptoms of the infection, although preventing progression or worsening of the infection also is a satisfactory outcome for many viral infections, including HIV. An effective amount can readily be determined by those skilled in the art (see, for example, Ansel et al., Pharmaceutical Drug Delivery Systems, 5th ed. (Lea and Febiger (1990), Gennaro ed.)).

The chimeric polypeptides, polynucleotides, and antibodies of the invention are also useful for diagnostic purposes. For example, a chimeric polypeptide having a virus

coat polypeptide sequence derived from a virus that utilizes co-receptor for infection can be used to identify subjects that express co-receptors having decreased binding affinity for the chimeric polypeptide. Subjects which have a decreased binding affinity will likely have a decreased risk of infection by the virus. Alternatively, subjects expressing co-receptors having an increased binding affinity for the chimeric polypeptide will likely be at increased risk of virus infection. In this way, subjects having decreased or increased risk to virus infection can be identified. For example, subjects expressing a CCR5 or CXCR4 co-receptor having increased or decreased affinity for a chimeric polypeptide comprised of HIV gp120-CD4 will be at increased or decreased risk of HIV infection, respectively. Accordingly, such methods also are useful for assessing prognosis; subjects expressing a high affinity binding co-receptor likely having a poorer prognosis.

In the case of the chimeric polypeptides disclosed herein that have a virus coat polypeptide sequence of a virus that utilizes a co-receptor, such chimeric polypeptides are useful for identifying agents that modulate binding of the virus to the co-receptor. Such chimeric polypeptides also are useful for identifying agents that modulate the intramolecular interaction/binding of the virus coat polypeptide sequence to the receptor sequence within the chimeric polypeptide. Thus, described chimeric polypeptides that contain coat polypeptide of virus that may not utilize co-receptor can be used to identify agents that modulate binding of the coat sequence to the receptor sequence within the chimeric molecule.

Thus, in accordance with the present invention, there are provided methods for identifying an agent that modulates binding between a virus and a virus co-receptor, and methods for identifying an agent that modulates binding between a virus and a virus receptor.

In one embodiment, a method of the invention includes contacting a chimeric polypeptide with a co-receptor polypeptide under conditions allowing the chimeric polypeptide and the co-receptor polypeptide to bind, in the presence and absence of a test agent, and detecting binding in the presence and absence of the test agent. In another embodiment, a method of the invention includes contacting a chimeric polypeptide that forms an intramolecular complex with a test agent, and detecting

binding between the virus coat polypeptide sequence and the receptor polypeptide sequence within the chimera. A decreased amount of binding in the presence of the test agent thereby identifies an agent that inhibits interaction/binding between the virus and the virus co-receptor or receptor. Increased binding in the presence of the test agent thereby identifies an agent that stimulates interaction/binding between the virus and the virus co-receptor or receptor.

The contacting can occur in solution, solid phase, on intact cells, or in an organism, such as a non-human primate. In various embodiments, the virus is an immunodeficiency virus, such as HIV and the co-receptor is a chemokine, such as CCR5 or CXCR4. The binding of viruses that utilize co-receptors for cell penetration is a critical step for subsequent infection, viral proliferation, and the ultimate pathological symptoms resulting therefrom. Thus, in another embodiment, methods for identifying agents that inhibit virus cell penetration, infection, and proliferation, as well as agents that ameliorate the symptoms associated with the virus infection, are provided. In a method of the present invention for identifying such agents, the test agent can be added after contacting the chimeric polypeptide with the co-receptor polypeptide or, alternatively, before contacting the chimeric polypeptide with the co-receptor polypeptide.

Candidate agents include antibodies, antivirals, a co-receptor polypeptide sequence (e.g., from CCR5 or CXCR4), peptidomimeties or active fragments thereof. Candidate agents also encompass numerous chemical classes, including organic molecules, like small organic compounds having a molecular weight of more than 50 and less than about 2,500 daltons. Candidate agents comprise functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl, or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures, and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups. Candidate agents are also found among biomolecules, including, but not limited to, peptides, saccharides, fatty acids steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs, or combinations thereof.

Candidate agents are obtained from a wide variety of sources, including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides and oligopeptides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant, and animal extracts are available or readily produced. Additionally, natural or synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical, and biochemical means, and may be used to produce combinatorial libraries. Known pharmacological agents may be subjected to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification, etc., to produce structural analogs. Where the method detects binding, one or more of the molecules may be joined to a label, where the label can directly or indirectly provide a detectable signal. Various labels include radioisotopes, fluorescers, chemiluminescers, enzymes, specific binding molecules, particles, e.g. magnetic particles, and the like. Specific binding molecules include pairs, such as biotin and streptavidin, digoxin and antidigoxin, etc. For the specific binding members, the complementary member would normally be labeled with a molecule that provides for detection, in accordance with known procedures.

A variety of other reagents may be included in the assay. These include reagents, like salts, neutral proteins, e.g. albumin, detergents, etc., that are used to facilitate optimal protein-protein binding and/or reduce non-specific or background interactions. Reagents that improve the efficiency of the assay, such as protease inhibitors, nuclease inhibitors, anti-microbial agents, etc., may be used. The mixture of components are added in any order that provides for the requisite binding. Incubations are performed at any suitable temperature, typically between 4°C and 40°C. Incubation periods are selected for optimum activity, but may also be optimized to facilitate rapid high-throughput screening. Typically, between 0.1 and 1 hour will be sufficient.

In various embodiments, the virus is an immunodeficiency virus, as described herein, such as HIV, HTLV, SIV, FeLV, FPV, or herpes virus. In additional embodiments, the co-receptor is a CCR5, CXCR4, CCR-2b, CCR3, CCR8, V28/CX3CR1, US28 (herpes virus encoded chemokine like receptor), STRL33/BOB/TYMSTR, GPR1

5/Bonzo, or GPR1 polypeptide sequence.

An agent identified by a method of the invention described herein can be further tested for its ability to inhibit virus binding or infection of a cell *in vitro* or *in vivo*. Thus, in accordance with the present invention, there are provided methods for identifying an agent that inhibits virus infection of a cell. A method of the invention includes contacting a cell susceptible to virus infection with an infectious virus particle in the presence and absence of a test agent, and determining whether the test agent inhibits virus binding or infection of the cell, thereby identifying an agent that inhibits virus infection. In various embodiments, the test agent is added before or after contacting the cell with the infectious virus particle. The method also can be performed in any suitable animal, such as a non-human primate.

The chimeric polypeptides described herein are also useful for identifying novel co-receptors or characterizing proteins as co-receptors. In this way, viral infection and subsequent pathogenesis for any virus can be better understood, thereby enabling improved treatment of the infection. For example, one method for identifying a novel co-receptor or characterizing co-receptor function is the two-hybrid system, which can detect protein-protein interactions through the activation of a reporter whose expression is induced by interacting polypeptides. Thus, an appropriate chimeric polypeptide can be used as a bait sequence in a yeast or mammalian two-hybrid system to screen a library for the purpose of identifying interacting proteins, including novel co-receptors. Well established biochemical methods of detecting protein-protein interactions (e.g., column chromatography, gradient centrifugation, co-immunoprecipitation analysis, etc.) also are applicable in identifying co-receptors or in characterizing proteins as having potential co-receptor function.

The chimeric polypeptides that bind co-receptors also are useful for identifying a co-receptor binding site. For example, by producing co-receptor polypeptide fragments and contacting the fragments with an appropriate chimeric polypeptide. The contacting can be done in solution, (e.g., co-precipitation), solid phase (e.g., affinity column), or on an intact cell (e.g., contacting co-receptor fragments on a cell surface and detecting whether the co-receptor fragment inhibits chimeric polypeptide binding to the cell). A co-receptor binding site, once identified, can be used as an antiviral

agent to treat infection, for example.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and are not intended to be limiting. Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, and from the claims. The invention is further described in the following examples, which do not limit the scope of the invention(s) described in the claims.

EXAMPLE I

This Example describes the construction of polynucleotides encoding a single chain gp120-CD4 chimeric polypeptide FLSC, TsSC, FLSC-R/T and RLSC-R/T CD4M9. The strategy for building a single chain complex is based on the placement of a 20 to 30 amino acid linker sequence between the C terminus of gp120 and the N terminus of CD4. Analyses of the crystal structure of modified gpl20 bound to soluble CD4 and 17b Fab (Dwong, P.D. *et al., Nature,* 393:648-59 (1998)) using Swiss PDB Viewer suggested that a chimeric molecule should be capable of intramolecular interactions leading to formation of a gp120-CD4 complex. A single chain nucleic acid encoding a gp120-CD4 chimeric polypeptide (SEQ ID NO: 1) was constructed by arranging the respective coding sequences in the following order: (1) at the 5' end, a synthetic, codon encoding gp120 of the macrophage-tropic HIVs, BaL; (2) a sequence encoding a 20 amino acid linker consisting of glycines, alanine, and serines; (3) sequences for soluble CD4 domains 1 and 2 (DlD2); and (4) at the 3' end, sequences encoding a short polypeptide derived from the c-myc oncogene for FLSC. The FLSC-R/T nucleotide sequence (SEQ ID NO: 3) encodes for a protein having a mutation at the c-terminal end of gp120 wherein the arginine is replaced with a threonine (SEQ ID NO: 4). FLSC-R/T CD4M9 (SEQ ID NO: 5) includes further

changes in the nucleotide sequence of a chimera polypeptide (SEQ ID NO: 6) of the present invention wherein the CD4 D1D2 region is replaced with a sequence coding for CD4M9 that encodes for a peptide that mimics the functional activity of the CD4 D1D2 region. The codon optimized gp120 sequence was used as it permits high-level expression in a rev-independent manner (Haas, J., *et al., Curr. Biol.,* 6:3 15-24 (1996)). The human CD4 sequence used was derived from T4-pMV7 (Maddon, P. J., et *al., Cell,* 47:333-48 (1986); NIH AIDS Reagent Repository, Bethesda, MD). The myc polypeptide sequence allows convenient analyses, purification, and other manipulation of the chimeric polypeptide.

Complete polynucleotides comprising these different sequences were generated by PCR and inserted into pEF6 (Invitrogen) using the strong elongation factor promoter (EF 1) to drive expression. Restriction enzyme sites were introduced into this construct (designated pEF6-SCBal) to permit convenient exchange with other envelope genes of other immunodeficiency viruses.

Briefly, FLSC molecule was constructed via PCR using the plasmids pMR1Wl-9 and T4-pMV7 as templates. The gp120 forward primer was GGG-GGT-ACC-ATG-CCC-ATG-GGG-TCT-CTG-CAA-CCG-CTG-GCC (SEQ ID NO:7) and the reverse primer was GGG-TCC-GGA-GCC-CGA-GCC-ACC-GCC-ACC-AGA-GGA-TCC-ACG-CTT-CTC-GCG-CTG-CAC-CAC-GCG-GCG-CTT (SEQ ID NO:8). The CD4 forward primer was GGG-TCC-GGA-GGA-GGT-GGG-TCG-GGT-GGC-GGC-GCG-GCC-GCT-AAG-AAA-GTG-GTG-CTG-GGC-AAA-AAA-GGG-GAT (SEQ ID NO:9) and the reverse primer was GGG-GTT-TAA-ACT-TAT-TAC-AGA-TCC-TCT-TCT-GAG-ATG-AGT-TTT-GTT-CAG-CTA-GCA-CCA-CGA-TGT-CTA-TTT-TGA-ACT-C (SEQ ID NO:10). The PCR product was subcloned into pEF6 (Invitrogen, Carlsbad, CA) using *Kpn*l and *Pme*1 restriction sites.

To construct the pEF6-TcSC plasmid, the full-length gp120 expressing sequence in pEF6-FLSC was exchanged for a truncated version of the gp 120 sequence (DC1DC5DVlV2). The truncated gp120 was generated using GGG-GGT-ACC-ATG-CCC-ATG-GGG-TCT-CTG-CAA-CCG-CTG-GCC-ACC-TTG-TAC-CTG-CTG-GGG-ATG-CTG-GTC-GCT-TCC-TGC-CTC-GGA-AAG-AAC-GTG-ACC-GAG-AAC-TTC-AAC-ATG-TGG (SEQ ID NO:15) as a forward primer and GGG-

GGA-TCC-GAT-CTT-CAC-CAC-CTT-GAT-CTT-GTA-CAG-CTC (SEQ ID NO:16) as a reverse primer. The Vl and V2 regions were deleted using CTG-TGC-GTG-ACC-CTG-GGC-GCG-GCC-GAG-ATG-AAG-AAC-TGC-AGC-TTC-AAC-ATC-GGC-GCG-GGC-CGC-CTG-ATC-AGC-TGC (SEQ ID NO:17) as a forward primer and GCA-GCT-GAT-CAG-GCG-GCC-CGC-GCC-GAT-GTT-GAA-GCT-GCA-GTT-CTT-CAT-CTC-GCC-CGC-GCC-CAG-GGT-CAC-GCA-CAG (SEQ ID NO:18) as a reverse primer.

The CD4M9 sequence (SEQ ID NO: 19) used to clone into FLSC R/T CD4M9 was generated by using the 5' to 3' primers GCG-GCC-GCT-TGC-AAC-CTG-GCC-CGC-TGC-CAG-CTG-CGC-TGC-AAG-AGC-CTG-GGC-CTG-CTG-GGC-AAG-TGC-GCC-GGC-AGC-TTC-TGC-GCC-TGC-GGC-CCC-TAA-GAA-TTC (SEQ ID NO: 21) as a forward primer and GAA-TTC-TTA-GGG-GCC-GCA-GGC-GCA-GAA-GCT-GCC-GGC-GCA-CTT-GCC-CAG-CAG-GCC-CAG-GCT-CTT-GCA-GCG-CAG-CTG-GCA-GCG-GGC-CAG-GTT-GCA-AGC-GGC-CGC (SEQ ID NO: 22) as a reverse primer and annealing together. Fragments were cut with Not1 & BamH1, then subcloned into pEF6-FLSC R/T that had been prepared by cutting with Not1 & BamH1 and gel purified to remove the relieved hD1D2 from the FLSC R/T sequence. Clones were confirmed by sequencing.

The recombinant constructs are shown in FIG. 1. The chimeric recombinant which contained the BaL gp120 (SEQ ID NO: 24) sequence with a spacer region (SEQ ID NO: 11) and CD4D1D2 region (SEQ ID NO: 26) was designated full-length single chain (FLSC). A second construct was designed to produce complexes more closely resembling the molecules used to solve the gp120 crystal structure. This construct was designated truncated single chain (TcSC) and constructed as with FLSC except that a sequence encoding ΔC1ΔC5ΔVlV2 gpl20 was used in place of the full length coding sequence (SEQ ID NO: 28). Also shown are constructs designated FLSC-R/T wherein the BaL gp120 is mutated at amino acid 506 (SEQ ID NO: 30) and FLSC-R/T CD4M9 comprising sequences SEQ ID NO: 30 and 20. The amino acid sequence of the spacer region shown in this example is GSSGGGGSGSGGGGSGGGAAA (SEQ ID NO: 11)

EXAMPLE II

This Example describes the transfection of cells with the polynucleotide encoding the gp 120-CD4 chimeric polypeptide and the characterization of the expressed soluble polypeptide. Recombinant pEF6-FLSC or pEF6-TcSC was transfected into 293 cells using Fugene, according to the manufacturer's protocol (Boehringer-Manheim). Stable transfectants were obtained by selection with 5ug/ml blasticidin. A stable cell line (293-SC) was cultured under different conditions, and the production of chimeric polypeptide evaluated by immunoblot analysis using a mixture of anti-gp120 monoclonal antibodies (Y.H. Abacioglu *et al.,AIDS Res. Hum. Retroviruses,* 10:371-81 (1994)) or anti- human CD4 polyclonal sera (T4-4) (K. C. Deen *et al., Nature,* 331:82-4 (1998); R. L. Willey *et al., J Viral.,* 66:226-34 (1992); NIH AIDS Reagent Repository).

Briefly, cell culture supernatants containing the chimeric polypeptide were collected and boiled in SDS-PAGE loading buffer (75 mM Tris, 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromphenol blue, pH 8.3). The samples were then electrophoresed in a 4-20% SDS-polyacrylamide gradient gel. The gel-fractionated proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane. Non-specific binding sites on the membrane were then blocked for 30 minutes with 2% non-fat dry milk in tris-buffered saline, pH 7. The membrane was then probed with either anti-CD4 polyclonal rabbit sera (T4-4; NIH AIDS Reagent Repository, Bethesda, MD) or a mixture of murine monoclonal antibody against HIV gp120. As shown in FIG. 2, the transfected cells expressed a soluble protein of the expected size (150kD). This polypeptide was reactive with both anti-gpl20 and anti-CD4 antibodies and, thus, represented intact chimeric polypeptide.

In other studies, reactivity with anti-myc antibody was detected further confirming the identity of the 150 kD species as the chimeric polypeptide. In addition to this polypeptide, bands matching the expected sizes for gp120 and CD4 DID2/myc tag were observed indicating that a portion of the chimeric polypeptide had been cleaved at the spacer. Addition of a biologically compatible protease inhibitor (Pefabloc; Boerhinger-Mannhiem) yielded essentially uncleaved chimeric polypeptide molecules. This suggests that cleavage of gp120-CD4 occurs by a serine protease. The amount of gp120-CD4 chimeric polypeptide produced by the 293-SC cell line

was determined using an anti-gpl20 capture ELISA with sheep anti-gp120 antibody D7324 (International Enzymes), a sheep polyclonal IgG against a highly conserved epitope in the gp120 C5 region (J.P. Moore, *AIDS*, 4:297-305 (1990); J.P. Moore *et ul., J Virol.*, 67:863-75 (1992); J. P. Moore *et al., AIDS*, 4:307-15 (1990)), and a gp120 standard curve.

Briefly, 2 *ug*/ml of D7324 in phosphate-buffered saline was absorbed onto a plastic plate. Non-specific binding sites were blocked with 2% non-fat dry milk in buffered saline. Saturating concentrations of cell culture supernatant from the 293-SC line were then added to the plate. Captured chimeric polypeptides were detected using inactivated human sera from HIV-infected patients and anti-human IgG conjugated to horse-radish peroxidase. The 293-SC cell line is estimated to secrete approximately 3 *ug*/ml of gp120-CD4 chimeric polypeptide. The 293-SC cell line has been adapted to grow in serum-free conditions. Because the immunoblotting studies indicated that there was some cleavage of the gp120-CD4 chimeric polypeptide a sample of purified single chain was crosslinked and the crosslinked sample analyzed to determine if the gp120 and CD4 molecules remained associated. Briefly, single chain gp120-CD4 from supernatants produced by 293-SC cell line was purified using an immunoaffinity column. The column was constructed by linking anti-gp120 human monoclonal antibody A32 to CNBr-activated sepharose 4B (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). A32 is specific for a highly discontinuous epitope on gp120, and preferentially recognizes envelope bound to CD4. Bound gpl20-CD4 was eluted with 0.lM acetic acid pH 2.5, lyophilized, and dialyzed against PBS. Protein concentration was determined by a BCA assay (Bio-Rad, Hercules, CA) using the manufacturer's protocol. A 20 *ul* aliquot of purified gp 120-CD4 was then crosslinked with 1 mM solution of the homo-bifunctional crosslinker, BS3, and electrophoresed along with uncrosslinked gp 120-CD4 on a 4-20% polyacrylamide gel. The fractionated proteins were transferred to nitrocellulose, immunoblotted with a mixture of anti-gp120 monoclonal antibodies followed by an alkaline-phosphatase labeled anti-mouse IgG, and visualized with a commercial mixture of BCIP/NBT (KPL).

FIG. 3 shows the results of these studies; uncrosslinked gp120-CD4 is in lane 1, and the crosslinked gp120-CD4 is in lane 2. Lane 1 shows that the immunoaffinity

column purifies both cleaved and uncleaved single-chain gp120-CD4. Crosslinking, as shown in lane 2, generates two broad bands at 150 kDa and 300 kDa, a pattern suggesting that the single chain gp120-CD4 in solution exists as an associated 150 kDa molecule. The gp120 and CD4 subunits remain associated, even after the cleavage event. The 300 kDa band indicates that a portion of gp120-CD4 is dimeric in solution and may represent single chain molecules that associate through intermolecular interactions between the envelope and CD4 domains on separate molecules. The apparent cleavage of the single-chain molecules into gp120 and CD4 moieties under certain conditions (FIG. 2) might be a concern for DNA vaccines, since such processing could potentially occur *in vivo*. However, these studies show that despite cleavage the single-chain molecules remained associated as gp120-CD4 complexes (FIG. 3). To examine the structural properties of the native FLSC in greater detail, different concentrations (1 uM-.03 uM) of the same protein preparation examined above were covalently crosslinked in PBS in order to fix any multimeric structures existing in solution. Crosslinked material was then analyzed by immunoblot assay with anti-CD4 antibody. As shown in FIG. 4, a major protein band (inset; band A) of 172 kD was consistently visible along with two minor bands of higher molecular weight. One of the minor bands (inset; band B) had an apparent size of approximately 302 kD, while the other (inset; band C) failed to migrate far enough into the gel to allow an accurate assessment of size by SDS-PAGE. The appearance and proportions of the different protein bands were not dependent on the FLSC concentration prior to crosslinking. Thus, densitometric analyses indicated that bands A, B and C consistently represented approximately 65%, 25% and 10% of the total protein, respectively.

In comparison to the FLSC, the chromatographic profile of the crosslinked TcSC was more complex. Under non-denaturing conditions TcSC eluted as a broad series of peaks ranging from 166 kD to 353 kD. Such a profile indicated that the shorter TcSC polypeptide forms multiple higher order structures upon expression and/or purification. This behavior indicates that the TcSC exists primarily as variably sized chains of polypeptides joined by interactions between gp 120 sequences and CD4 sequences in separate molecules. Since the TcSC was created by deleting 20 C-terminal amino acids from gp120, the distance between the CD4 core structure and the CD4bd of gp120 was shortened which may hinder the ability of the TcSC to

achieve an intramolecular gp120-CD4 interaction thereby favoring formation of interchain complexes. Nevertheless, TcSC also exhibited the antigenic and functional features of a gp120-CD4 complex. It is possible that because of intermolecular interactions involving multiple TcSC molecules, a smaller proportion of the total protein expressed a co-receptor binding site capable of interacting with surface co-receptors. Alternatively, deletion of the V1/V2 regions in the TcSC may decrease the relative affinity of the BaL envelope for CCR5. Further modification of the TcSC to elongate the linker between the gp120 and CD4 moieties might allow formation of a higher proportion of intrachain complexes. Whether the multimeric nature of the TcSC puts this molecule at a disadvantage to FLSC remains an open question, since studies with other multimeric molecules suggest they are more potent immunogens than their monomeric counterparts (A.L. DeVico et al., *AIDS Rev.*, 1:4-14 (1999); S.A. Jeffs *et al., J. Gen Virol,* 77:1403-1410 (1996); R.A. LaCasse *et al., Science,* 283:357-62 (1999)).

EXAMPLE III

This Example describes data demonstrating the binding of gp120-CD4 chimeric polypeptide to several different antibodies reactive with gp120 and CD4. The binding of gp120 to CD4 causes conformational changes in the molecule leading to the exposure of the co-receptor-binding domain. Therefore, antibodies directed against epitopes in this domain should react strongly with properly folded single-chain molecules. In order to determine exposed epitopes in chimeric molecules, antigenic properties of FLSC and TcSC molecules were compared. Purified FLSC and TcSC were subjected to immunochemical analyses by antigen capture ELISA. In brief, BaLgp120, gpl20-rsCD4 complexes or single chain chimeric molecules were captured using a purified polyclonal sheep antibody (International Enzymes, Fallbrook, CA) raised against a peptide derived from the C-terminal 15 amino acids of gp120, D7324 (J. P. Moore *et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses,* 4:369-79 (198X)), adsorbed to the matrix. The D7324 was diluted in PBS to 2*ug*/ml and adsorbed to 96-well plates (Maxisorb plates, VWR Scientific, St. Louis, MO) by incubating overnight at room temperature. Plates were treated BLOTTO (5% non-fat dried milk in tris-buffered saline) in order to prevent nonspecific binding to the wells. After washing the plates with TBS samples were diluted in BLOTTO and 200*u*l

aliquots incubated in duplicate D7324-coated wells for 1 hour at room temperature. Bound antigen was detected using a pool of inactivated HIV- I+ sera diluted 1: 1000 in BLOTTO followed by goat anti-human IgG labeled with horseradish peroxidase (KPL, Gaithersburg, MD).

Detection was also accomplished using monoclonal antibodies (MAbs A32, 17b and 48d) previously shown to preferentially bind gpl20 after engagement of CD4 (M. Thali *et al., J. Virol.*, 67:3978-86 (1993)), followed by the appropriate-labeled second antibody. Two of the antibodies, 17b and 48d, bind within the co-receptor attachment site that is induced by CD4 binding (N. Sullivan et al., *J Virol.,* 72:4694-703 (1998); A. Trkola *et al, Nature,* 384: 184-6 (1996); L. Wu *et al., Nature,* 384: 179-l 83 (1996)). Antibody C 11, which recognizes a conserved epitope in the Cl - C5 region of free gp120, was also tested. Antibodies were diluted in BLOTTO and incubated for 1 hour at room temperature. Plate were washed three times with TBS between each incubation step. The amounts of gp120 sequences present in samples were determined based on a standard curve generated with commercial recombinant HIV IIIB gp120 (Bartels, Issaquah, WA). In comparative studies involving BaLgp120-rsCD4 complexes, D7324-coated plates were treated with saturating concentrations of gp120. After washing the wells, an excess concentration of rsCD4 (1 *ug*/ml) was then added to the wells and incubated for 1 hour to form the complexes. In order to evaluate the TcSC antigen which lacks the D7324 epitope, an alternate ELISA format using anti-CD4 MAb 45 (Bartels, Issaquah, WA) for capture was developed. The antibody was adsorbed to plastic at 1 ug/ml and wells blocked with BLOTTO. Assays were then carried out as above using the indicated human sera or human monoclonal antibodies.

As shown in FIG. 5A, all of the antibodies reacted strongly with the FLSC. However, the half-maximal binding concentrations of antibodies 17b, 48d, and A32 were consistently higher with FLSC versus gpl20 alone, and equivalent to what was observed with soluble, non-covalent BaLgp120-rsCD4 complexes. The higher immunoreactivity of FLSC was specific to the antibodies directed against the CD4-induced epitopes, as there was no significant difference in the half-maximal binding concentrations of antibody C11 with FLSC versus free gp120.

As shown in FIG. 5B, the level of 17b and 48d reactivity with TcSC was equivalent to what was observed with FLSC analyzed in parallel. As expected, antibodies C11 and A32 did not react with TcSC as the bulk of their respective epitopes were deleted from the TcSC construct.

The binding of gp120 and CD4 sequences in the single-chain molecules should also block exposure of epitopes in the CD4 binding site on gp120. To confirm that such binding had occurred, that the CD4 binding site of gp120 was no longer available for binding, FLSC and TcSC were evaluated using the Mab45 capture format and a series of monoclonal antibodies (IgGlb12, F91, and 205-469) directed against the CD4 binding domain (CD4bd) on gp120.

As shown in FIG. 5C, none of these antibodies reacted with either FLSC or TcSC, although positive reactivity was observed with pooled HIV+ sera tested in parallel. This data indicates an interaction between CD4 sequences and the gp120 CD4 binding domain present within FLSC and TcSC molecules.

In sum, these results demonstrate that gp120-CD4 chimeric polypeptide reactivity was comparable to that observed with complexes made by combining soluble gp120 and CD4 (uncrosslinked), and higher than with gp120 alone. These data indicate that the single-chain gp120-CD4 molecules formed interacting complexes similar to the transition state HIV envelope-CD4 complex. The captured gp120-CD4 was also reactive with anti-CD4 antiserum and anti-myc antibody in other ELISA studies, consistent with the western blot analyses. Taken together, these data indicate that a majority of the single-chain gp120-CD4 molecules represent properly folded gp120-CD4 complexes.

EXAMPLE IV

This Example describes data demonstrating the binding of gp120-CD4 chimeric molecules, containing a CCR5-specific HIV envelope sequence, to CCR5 expressing cells.

The formation of the gp120-CD4 complex normally exposes the envelope domains

that interact with an appropriate co-receptor (M. Thali *et al., J Virol.,* 67:3978-86 (1993); M.A. Vodicka *et al., Virol.,* 233: 193-8 (1997)). Therefore, another measure of properly folded gp120-CD4 complexes and its ability to inhibit virus infection of a cell is the ability to bind to a CCR5 co-receptor.

To evaluate the ability of the single-chain complexes to bind co-receptor, purified single-chain gp120-CD4 molecules were allowed to interact with cells that express either CCR5 or CXCR4. Briefly, supernatants containing gp120-CD4 single-chain were generated by transient transfection of 293 cells with pEF6-SC. Supernatants were then added to an immunoaffinity column of A32 and the purified single-chain eluted with 0.2 M Acetic Acid pH 2.5, and analyzed by D7324-capture ELISA and by immunoblot, as described. Fractions containing single chain were collected, equilibrated to pH 7, and concentrated.

For the binding, the purified single-chain preparation was allowed to interact with L1.2 cells that express CCR5 (L. Wu et ul., *Nature,* 384: 179-l 83 (1996); L. Wu *et al., J. Exp. Med.,* 186: 1373-8 1 (1997)). L1.2, L1.2/X4, and L 1.2/R5 cells, murine B-cells lines that express no co-receptor, CXCR4, or CCR5 were mixed with decreasing concentrations of purified single-chain protein. After incubation at 37°C for 1 hour, the cells were washed. Bound single-chain molecules were detected with 1 ug/ml of MAb Cl1 (J.E. Robinson et *al., J Cell. Biochem. Suppl.,* 16E:71 (1992); M. Thali *et al., J Virol.,* 67:3978-86 (1993), an anti-gp 120 MAb, followed by an anti-human IgG that was labeled with a fluorescent molecule, phycoerythrin. C11 recognizes a conformational determinant formed by the C 1 -C4 regions. The level of bound fluorescence was determined by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis with a FACS Calibur instrument (Becton Dickinson). The mean fluorescence intensity for each sample was calculated using the Cell Quest 3.1.3 program (Becton Dickinson).

As shown in FIG. 6, both single chain gp120-CD4 complexes (FLSC and TcSC) bound to the CCR5-expressing, but not CXCR4-expressing, L1.2 cells. Maximal binding was observed with FLSC at concentrations (10 *ug*/ml) equivalent to what was observed with soluble BaL gp120-rsCD4 complexes tested as controls. In comparison, approximately 10-fold higher concentrations of the TcSC were required

to approach saturation binding. Thus, gp120-CD4 chimeric polypeptide presents functional co-receptor binding site(s) for CCR5, as expected for a molecule containing a macrophage tropic gp120.

The absence of binding to CXCR4 in these studies was not entirely unexpected in view of the apparent specificity of the HIV envelope polypeptide in the gpl20-CD4 chimera for CD4. Thus, by constructing polypeptide chimeras that bind to CXCR4 or other co-receptors, or by modifying a virus coat polypeptide, as described herein, to obtain a chimeric polypeptide that binds to another co-receptor, other virus coat polypeptide-receptor polypeptide chimeras can be obtained that bind to other co-receptors.

To demonstrate that single-chain gpl20-CD4 is binding to CCR5 through its co-receptor binding site, competition binding studies with 17b and 48d antibodies, which have been shown to interact with the co-receptor binding site of gp120 and prevent gp120/sCD4 complexes from interacting with co-receptor expressing cells, were performed. For controls, another gp120 antibody, Cl1, and a gp41 antibody F240, was used. All of these antibodies are derived from HIV-l infected patients . Each antibody was used at 10 μg/ml and added together with 3 μg/ml of purified single-chain molecule to L1.2 cells that express either CCR5 or CXCR4. Bound gp120-CD4 was detected with Cl1, followed by anti-human IgG labeled with PE. The amount of gp120-CD4 was determined by FACS and expressed as a percentage of the total bound in control wells without competing antibody.

As shown in FIG. 7, 17b and 48d strongly inhibited the binding of both single-chain complexes to the cells. In the presence of these antibodies, the binding signal on CCR5-expressing cells was the same as the background binding seen with L 1.2/CXCR4 and L1.2 parental cells: Interestingly, 2G12, a potent neutralizing antibody, also reduced the interaction of all complex forms with CCR5. In comparison, anti-gp120 antibodies recognizing epitopes outside the co-receptor binding domain, C 11, A32, and an anti-gp41 antibody, F240, all failed to reduce the binding of FLSC or TcSC to the CCRS-expressing Ll.2 cells.

These results indicate that the gp120 co-receptor binding site is important for binding

to co-receptor. These results also indicate that agents that inhibit binding/interaction between gp 120-CD4 and co-receptor can be identified using such an assay. Such agents may have potential value as therapeutics.

In sum, the data demonstrate the successful expression of a soluble, chimeric polypeptide which duplicates the transition state conformation of a virus coat-receptor complex. Given this accomplishment, it is now possible to employ the chimeric polypeptide or polynucleotides encoding the polypeptide for immunization of a subject to produce an immune response to virus or virus having similar coat polypeptide epitopes. The immune response produced can be an antibody (humoral) or CTL response. In addition, given the fact that the chimeric polypeptide binds to an appropriate co-receptor on the surface of living cells, the polypeptide can be administered to subjects acutely exposed to an immunodeficiency virus in order to passively protect cells expressing the co-receptor from virus infection.

EXAMPLE V

This example describes data demonstrating that a gp 120-CD4 chimeric molecule can neutralize infection by HIV strains using the same co-receptor. The single-chain molecules were further examined for their ability to neutralize R5 and X4 viruses. A total of 10^4 U373/CD4/MAGI cells (M.A. Vodicka *et al., Virology*, 233: 193-8 (1997)) expressing either CCR5 or CXCR4 were allowed to attach overnight to flat-bottom tissue culture wells. Culture medium was then removed and replaced with 100 *u*l of fresh media containing various concentrations of chimeric protein. An additional 100 *u*1 of media containing 50 $TCID_{50}$ of virus was then added to the culture. The entire mixture was then incubated at 37°C until syncytia were visible, typically within 3-5 days. Culture wells were then treated with a P-galactosidase chemiluminescent reagent, Galatostar (Tropix, Bedford, MA), according to the manufacturer's protocol. Virus infection was determined as a function of chemiluminescence, quantified using a Victor^2 fluorescence plate reader (EG&G Wallac, Gaithersburg, MD). Background signal was determined in assays carried out in the absence of virus. Signals obtained for the test assays were then corrected by subtracting the background value. Percent infection was calculated by dividing the corrected relative light units for each experimental well by the corrected light units

for control wells containing only cells and virus. The 90% inhibitory dose (ID_{90}) values were determined from plots of test protein concentration versus percent inhibition of infection. All test conditions were carried out in triplicate.

As shown in FIG. 8, both FLSC and TcSC potently and selectively neutralized the R5 HIV-l BaL isolate, while there was only a slight inhibition (ID_{90} > 10 ug/ml) of 2044 isolate. In comparison, uncomplexed BaLgp120 inhibited entry of both HIV-1BaL and X4 (HIV-12044) viruses as expected due to its direct interactions with CD4. Thus, the data demonstrate that a virus coat polypeptide-receptor chimeric molecule can bind to a cellular co-receptor thereby blocking binding or infection of the cells by virus that utilize the co-receptor for binding or infection.

EXAMPLE VI

This Example describes the construction and expression of a modified gp120-CD4 chimeric polypeptide having an immunoglobulin polypeptide sequence, gp120-CD4-IgGl. This exemplary heterologous domain adds functionality to the gpl20-CD4 chimeric polypeptide, including adhesin and immunopotentiating functions, prolonging stability, increasing circulating half-life and ability to cross the placental barrier. This example also shows that the gp120-CD4-IgG1 chimera binds to co-receptor expressed on the surface of intact cells and neutralizes HIV virus. Gp120, a subunit of the envelope protein of HIV-I binds to CD4 and undergoes a conformational change that permits the complex to interact with a co-receptor, such as CCR5. This interaction permits the infection of HIV-1 into target CD4+ cells. Antibodies or other agents that interfere with the interaction of HIV-l with the co-receptor can prevent infection.

To identify such agents, single-chain gp120-CD4 was modified by fusion to the constant regions that form the IgGl heavy chain, hinge CH2 and CH3 (FIG. 9). Gp120-CD4-IgGl can be used to identify agents that block, inhibit, or disrupt HIV-1 interaction with the co-receptor, thereby identifying agents that inhibit HIV infection. The gp120-CD4-IgGl polypeptide comprising SEQ ID NOs: 24, 11, 26 and 32 could also be used as a passive immunotherapeutic to prevent HIV infection after an acute exposure, such as a needlestick injury.

Two hundred ninety-three cells were transiently transfected with the plasmid containing gpl20-CD4-IgGl comprising at least SEQ ID NOs: 23, 25 and 31, and the expressed protein was characterized by immunoblotting of the culture supernatants. Briefly, collected supernatant samples were electrophoresed onto a 4-20% gradient PAGE gel. Fractionated proteins were transferred to nitrocellulose and detected with a mixture of anti-gp120 monoclonal antibodies. As shown in FIG. 10, the transiently transfected cells expressed gp 120-CD4-IgGl (lane 1). Supernatant from cells expressing purified gp120 derived from HIV- 1 BaL (lane 2) was electrophoresed for relative size comparison. The gp120-CD4-IgGl polynucleotide encodes a protein having the predicted size for a gp120-CD4-IgGl heavy-chain chimera. Like the original gp120-CD4, a portion of gpl20-CD4-IgG1 is cleaved producing a 120 kDa protein fragment that is most likely gp120 ("Cleaved gpl20"). The size of this fragment suggests that gpl20-CD4-IgGl is being cleaved within the spacer. To assure that the gpl20-CD4-IgG1 is folded into a conformation permissive for binding co-receptor, dilutions of the supernatant were added to L 1.2 cells that express either CCR5 or CXCR4 co-receptors. Bound gp120-CD4-IgGl was detected with anti-human IgG that was labeled with Europium, a fluorescent reagent. The amount of fluorescence is directly related to the amount of bound material.

As shown in FIG. 11, gp120-CD4-IgGl binds specifically to L 1.2 cells that express CCR5. Again, little binding to CXCR4 was detected using this assay, which is consistent with the results for gp120-CD4. These studies indicate that heterologous domains conferring additional or enhanced functionality can be added to chimeric molecules without affecting their ability to form a complex that binds to cell co-receptor. To confirm that binding of chimeric gpl20-CD4-IgGl heavy chain to CCR5 expressing cells was mediated by co-receptor binding site of gp120, binding was studied in the presence of blocking antibody 17b. Briefly, for the MAb/FLSC-IgGl competition studies, sodium butyrate activated L1.2 cells expressing co-receptor were added to V-bottom plates at 10^5/well. 10 *u*g/ml FLSC-IgGl and 1 *u*g/ml MAbs were added to the cells. Cells and protein were incubated together for 1 hour at 37°C. Cells were pelleted and washed with TBS three times. Bound material was detected with phytoerytherin-labeled anti-human IgG at 5 ug/ml for 1 hour at 4°C. The cells were washed three times with TBS then analyzed by fluorescence-activated

cell sorting (FACS).

As shown in FIG. 12, 17b, an antibody that recognizes the CCR5-binding domain on gp120, blocks FLSC-IgG1 interaction with L1.2R.5 cells while control antibody, F240, does not. These data demonstrate that the FLSC-IgG1 interacts with the R5 co-receptor via the R5-binding domain on gp120. To confirm that chimeric gp120-CD4-IgGl heavy chain could block virus entry into cells, neutralization assays were then performed. In brief, U373/CD4/MAGI cells that express either CCR5 or CXCR4 were allowed to attach to flat-bottom tissue culture trays overnight at 10^4 cells/well. The medium was removed and varying concentrations of MAbs and immunoadhesins were then added to cells in 100 *u*l of media. Virus (50 $TCID_{50}$/well of in 100 *u*l of media) was then added and the mixture incubated at 37°C until syncytia were visible, typically 3-5 days. Plates were read using a P-galactosidase chemiluminescent reagent, Galatostar, according to the manufacturer's protocol and the chemiluminescence produced was quantified using a Victor^2 as previously described. Percent virus growth was calculated by using the relative light units for (experimental well)--background wells with no virus)/(wells with virus but no protein)--(background wells) (Table 2). ID_{50} and ID_{90} were determined graphically.

TABLE 2

Neutralization of X4, R5, and X4/R5 HIV by FLSC-IgGl

U373/CD4/CCR5					
	FLSC-IgGl	2G12	2F5	1 lgGlbl2	Control 1gG
ID90 (*u*g/mL)					
BaL	3.1	>10	>10	1.57	>10
ADA	4.58	>10	>10	>10	>10
89.6	3.56	8.07	>10	3.39	>10

U373/CD4/CXCR4					
	SClg	2G12	2F5	lgGlbl2	Control 1gG
ID90 (*u*g/mL)					

2044	>10	>10	>10	1.57	>10
2005	>10	>10	>10	>10	>10
89.6	>10	>10	>10	5.34	>10

The data in Table 2 indicate that FLSC-IgG blocks viruses that use R5 for cell entry.

FLSC-IgG neutralizes virus as effective as 2G12, 2F5, and IgGlb12, antibodies that are currently being evaluated in passive immunotherapy trials. These data therefore further affirm the usefulness of gp120-CD4 chimeras to inhibit HIV infection in particular, and the applicability of virus coat protein-receptor chimeras as inhibitors of other viruses that utilize co-receptor for binding or cell penetration in general.

EXAMPLE VII

This Example describes data demonstrating that mutation of the furin cleavage site improves the stability of the FLSC complex. The position of the cleavage site that separates the FLSC fragments is probably located within the C terminal gp 120 sequences present only in FLSC, since the shorter TcSC did not exhibit degradation. Notably, these sequences encompass the gp120 gp41 junction normally cleaved by the furin protease (M. Girard et al., *C R Acad Sci III.*, 322:959-66) (1999)). Cleavage of the FLSC at the natural furin site would be consistent with the behavior of the FLSC fragments, as it would have minimal impact on the structures of the gp120 and CD4 moieties and their capacity to interact.

In order to determine if this putative furin site accounts for cleavage, BaLgpl20, BaLgp120 complexed with an sCD4 molecule consisting of the first two domains (VlV2) of CD4, FLSC, and FLSC R/T were captured onto plastic via an antibody specific for the C-terminus of gpl20 (antibody binding was unaffected by the R/T mutation). Four domain Vl-V4 sCD4 were titrated onto the captured complexes starting at 30 ug/ml. Four domain sCD4 has a higher affinity for gp120 than the two domain VIV2 and, therefore, would compete off the smaller unit from complexes. Bound four domain CD4 was detected with antibody OKT4, which only binds the four domain CD4. The results in FIG. 13 show that mutation of the furin cleavage site prevents the Vl V2 found on the FLSC R/T from dissociating as readily as the

cleaved FLSC, thus improving its stability of the FLSC R/T complex. Introduction of the RT mutation into the BaLgp 120 c-terminus eliminates the furin mediated cleavage observed with the FLSC. Reducing this cleavage improves the continuity of the linker sequence and improves the stability of the FLSC construct (see Figure 13) by increasing the local concentration of the gp120 and CD4 moieties. The experimental result of this increase is the reduction in the ability of the soluble four domain CD4 to compete with the two domain CD4 found on the FLSC R/T.

EXAMPLE VIII

This Example describes the transfection of cells with the polynucleotide encoding the gp120-CD4 modified chimeric polypeptide and the characterization of the expressed soluble polypeptide. Recombinant pEF6-FLSC, pEF6-RLSC-R/T, pEF6-FLSC-R/T CD4M9 and pEF6-BaLgp120 were transfected into 293 cells using Fugene, according to the manufacturer's protocol (Boehringer-Manheim). Stable transfectants were obtained by selection with 5μg/ml blasticidin. Briefly, cell culture supernatants containing the chimeric polypeptides were collected and boiled in SDS-PAGE loading buffer (75 mM Tris, 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromphenol blue, pH 8.3). The samples were then electrophoresed in a 4-20% SDS-polyacrylamide gradient gel. The gel-fractionated proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane. Non-specific binding sites on the membrane were then blocked for 30 minutes with 2% non-fat dry milk in tris-buffered saline, pH 7. The membrane was then probed with a mixture of murine monoclonal antibody against HIV gp120 and bound antibodies were detected with alkaline phosphatase labeled goat anti-mouse IgG.

As shown in FIG. 14, the BaLgp120 (Lane 1) and the FLSC-R/T CD4M9 (Lane 4) migrated with an approximate molecular weight of 120 kDa. While the FLSC R/T CD4M9 is predicted to be approximately 130 kDa, the difference of 10 kDa is difficult to see on this blot. The FLSC (lane 2) is a 150 kDa protein that is cleaved at the furin site at the c-terminus of the protein. This cleavage separates the gp120 and CD4 components of the FLSC. The lower 120 kDa band is the result of this cleavage. The released CD4 component is not visible on this blot because the antibodies used to detect the proteins were specific for gp120. The apparent cleavage

of the single-chain molecules into gp120 and CD4 moieties under certain conditions might be a concern for DNA vaccines, since such processing could potentially occur *in vivo*.

This Example describes data demonstrating that mutation of the furin cleavage site improves the stability of the FLSC complex. The position of the cleavage site that separates the FLSC fragments is probably located within the C terminal gp120 sequences present only in FLSC. Notably, these sequences encompass the gp120/gp41 junction normally cleaved by the furin protease (M. Girard *et al., C R Acad Sci III.*, 322:959-66 (1999)). Cleavage of the FLSC at the natural furin site would be consistent with the behavior of the FLSC fragments, as it would have minimal impact on the structures of the gp120 and CD4 moieties and their capacity to interact. The results show that mutation of the furin cleavage site prevents the V1 V2 found on the FLSC R/T from dissociating as readily as the cleaved FLSC, thus improving the stability of the FLSC R/T complex. As a result, the R/T mutation used to create FLSC R/T minimizes this cleavage and stabilizes the protein.

EXAMPLE IX

This Example describes data demonstrating the binding of gp120-CD4 chimeric polypeptide to an antibodies reactive with gp120 and CD4. The binding of gp120 to CD4 causes conformational changes in the molecule leading to the exposure of the co-receptor-binding domain. Therefore, antibodies directed against epitopes in this domain should react strongly with properly folded single-chain molecules. In order to determine exposed epitopes in chimeric molecules, antigenic properties of BaLgp120, FLSC, FLSC-R/T and FLSC-R/T CDM9 molecules were compared. Detection was accomplished using monoclonal antibodies 17b previously shown to preferentially bind gpl20 after engagement of CD4 (M. Thali *et al., J. Virol.*, 67:3978-86 (1993)), followed by the appropriate-labeled second antibody. The antibody 17b, a human monoclonal antibody that recognizes an epitope that becomes increasingly exposed when gp120 interacts with CD4 and binds within the co-receptor attachment site (CCR5). (N. Sullivan et al., *J Virol.*, 72:4694-703 (1998); A. Trkola *et al, Nature,* 384: 184-6 (1996); L. Wu *et al., Nature,* 384: 179-1 83 (1996)). Antibodies were diluted in BLOTTO and incubated for 1 hour at room

temperature. Plate were washed three times with TBS between each incubation step. The amounts of gp120 sequences present in samples were determined based on a standard curve generated with commercial recombinant HIV IIIB gp120 (Bartels, Issaquah, WA). The antibody was adsorbed to plastic at 1 ug/ml and wells blocked with BLOTTO. Assays were then carried out as above using the indicated human monoclonal antibodies.

As shown in Figure 16, the binding curves of 17b with BaLgp120, FLSC, FLSC-R/T and FLSC-R/T CDM9 molecules were enhanced by binding of 17b to FLSC-R/T or FLSC chimeric proteins both of which contain both gp120 and CD4. 17b also binds to FLSC-R/T CD4M9 with the efficiency equivalent to that of FLSC-R/T indicating that the 17b epitope is exposed in the FLSC-R/T CD4M9 protein. Taken together, these data indicate that the single chain gp120-CD4 molecules FLSC, FLSC-R/T and FLSC-R/T CDM9 represent properly folded gp120-CD4 complexes.

EXAMPLE X

This Example describes data demonstrating the binding of gpl20-CD4 chimeric molecules, containing a CCR5-specific HIV envelope sequence, to CCR5 expressing cells. The formation of the gp120-CD4 complex normally exposes the envelope domains that interact with an appropriate co-receptor (M. Thali *et al., J Virol.,* 67:3978-86 (1993); M.A. Vodicka *et al., Virol.,* 233: 193-8 (1997)). Therefore, another measure of properly folded gp120-CD4 complexes and its ability to inhibit virus infection of a cell is the ability to bind to a CCR5 co-receptor.

To evaluate the ability of the single-chain complexes to bind co-receptor, purified single-chain gp120-CD4 molecules were allowed to interact with canine thymocytes, Cf2Th, that either express CCR5 or have no co-receptor. Briefly, supernatants containing gp120-CD4 single-chains chimeric polypeptides FLSC-R/T and FLSC-R/T CDM9 molecules were generated by transient transfection of 293 cells with pEF6.

For the binding, the purified single-chain preparation was allowed to interact with canine thymocytes that express CCR5 or have no co-receptor. Bound single-chain

molecules were detected with anti-gp120 MAb, A32, followed by PE-labeled goat anti-human IgG that was labeled with a fluorescent molecule, phycoerythrin. The level of bound fluorescence was determined by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis with a FACS Calibur Instrument (Becton Dickinson). The amount of fluorescence is directly related to the amount of bound material. The mean fluorescence intensity for each sample was calculated using the Cell Quest 3.1.3 program (Becton Dickinson). The results shown in Figure 15 show that the FLSC-R/T CD4M9 bind to the CCR5 expressing cells but not to cells without a co-receptor with the efficiency equivalent to that of FLSC-R/T.

EXAMPLE XI

This example describes neutralization of primary R5 HIV-1 (92BR020) by sera from FLSC-inoculated mice. C587B1/6 mice were inoculated four times with 25 *u*g of FLSC per mouse mixed with 10 *u*g cholera toxin (CT). Inoculation occurred at two week intervals. 14 days after the last inoculation, sera from the individual mice were collected and assayed for neutralizing activity against primary R5 HIV-1 isolate 92BR020. Serial dilutions of sera starting at 1:2 were mixed with 50 $TCID_{50}$ infection doses of virus/well and 10^5 U373/CD4/R5/MaGI cells/well. After 24 hours, the sera, virus and media were replaced with 200 *u*l of fresh media. The assay was allowed to incubate for 5 days until syncytia were visible. Growth of HIV-1 was indicated by production of b-galactosidase in cell lysates as measured using a chemiluminescent reagent, Galactostar (Tropix) according to manufacture's protocol. Virus infection was determined as a function of chemiluminescence, quantified using a Victor^2 (EG&G Wallac, Gaithersburg, MD) fluorescence plate reader. Background signal was determined with assays carried out in the absence of virus and sera. Signal obtained for the test assays were then corrected by subtracting the background value. The percent invention was calculated by dividing the corrected relative light units for each experimental well by the corrected light units for control wells containing only cells and virus. Sera from the FLSC inoculated mice are labeled #0, #1, #2, #3, #4, and naïve mouse is labeled "C".

As shown in Figure 17, as the dilution factor is increased there is also an increase in virus infection. Additionally, the sera isolated from control mouse showed no effect

on virus infection, while high concentrations of sera from mouse #2 showed a minimal amount of virus infection.

In sum, the data demonstrate the successful expression of a soluble, chimeric polypeptide which duplicates the transition state conformation of a virus coat-receptor complex. Given this accomplishment, it is now possible to employ the chimeric polypeptide or polynucleotides encoding the polypeptide for immunization of a subject to produce an immune response to virus or virus having similar coat polypeptide epitopes. The immune response produced can be an antibody (humoral) or CTL response. In addition, given the fact that the chimeric polypeptide binds to an appropriate co-receptor on the surface of living cells, the polypeptide can be administered to subjects acutely exposed to an immunodeficiency virus in order to passively protect cells expressing the co-receptor from virus infection.

EXAMPLE XII

FLSC and complexes of BaLgp120 and sCD4 were captured onto D7324-coated ELISA plates. D7324 is a sheep polyclonal IgG that is reactive to the C-terminal region of gp120 and is an antibody that is commonly used to examine the antigenicity of HIV-1 envelope proteins by capture-ELISA. BaLgp120/sCD4 complexes were then crosslinked for 30 mins with 0.5 mM Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (Pierce), then treated with 10 mM Tris-HCL to stop the reaction. BaLgp120/sCD4 & FLSC plates were then washed with TBS. Monoclonal antibodies against the V3 loop (39F), C1-C5 (C11), C1-C4 (A32), coreceptor binding domain (17b), and C3-V4 (2G12) regions of BaLgp120 were titrated onto the captured antigens. Bound antibodies were detected with goat-anti-human IgG labeled with horse-radish peroxidase.

Figure 18 shows that the crosslinking reaction alters the structure of the BaLgp120/sCD4 complex and reduces the antigenicity of the 39F, C11, A32 and 17b epitopes. In contrast, these epitopes are not occluded on the FLSC. This antigenic alteration would impact the function of these epitopes. For instance, the epitope recognized by 17b interacts with the R5 coreceptor. Occlusion of this epitope by the crosslinker would reduce the ability of the crosslinked complex to interact with the coreceptor. This observation would also suggest that that crosslinked complex could

not be used to screen for reagents that may potentially block HIV-1 via its coreceptor.

EXAMPLE XIII

Purified R/T FLSC-IgG1 was crosslinked for 30 mins with 0.5 mM Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (Pierce), then treated with 10 mM Tris-HCL to stop the reaction. Crosslinked material was then compared to uncrosslinked material run in reducing and non-reducing SDS-PAGE conditions. As shown in Figure 19, the uncrosslinked material on the reducing gel (middle lane) runs at 180 kDa, the expected size of the BaLgp120-CD4-IgG1 chimera. The smaller band is the appropriate size of CD4-IgG indicating that the chimera is cleaved between the BaLgp120 and the CD4-IgG portion of the molecule. This observation suggests that although the R/T mutation eliminates the cleavage due to furin-protease, another protease can act on the c-terminus of gp120. The uncrosslinked material in non-reducing conditions (right lane) runs at 360 kDa, the predicted size of the fully assembled immunoadhesin. This observation indicates that while a portion of the material is cleaved (see middle lane) immunoadhesin remains associated. Crosslinking of the material, which stabilizes the assemble structure, confirms this observation (left lane). Here the material runs approximately 360 kDa as expected. A higher molecular weight form is also visible suggesting that a portion of purified preparation is aggregated.

EXAMPLE XIV

293 cells were transiently transfected either pcDNA-human CCR5 or pcDNA-rhesus CCR5 or no plasmid 24 hrs prior to use. Transfected cells (10^5/well) were incubated at 37° C for 1 hr with the indicated concentration of R/T FLSC-IgG1. Bound R/T FLSC-IgG1 was detected with phycoerythrin conjugated Goat anti-human IgG and analyzed by FACS. Figure 20 shows that R/T FLSC-IgG1 binds to both human and rhesus CCR5.

Canine thymocytes expressing CCR5 (CF2Th-R5) (10^5) were incubated with 3 ug/mL R/T FLSC-IgG1 and the indicated concentration of chemokine for 1 hr at 37° C. Bound R/T FLSC-IgG1 was detected using phycoerythrin conjugated goat anti-human IgG and analyzed by FACS. RANTES is a CCR5-specific chemokine and as

expected competes with R/T FLSC-IgG1 for the receptor. SDF, a CXCR4-specific chemokine, was used a control. Figure 21 provides further proof that the R/T FLSC-IgG1 may be used as a screening tool to define reagents that may block HIV-1 infection via its coreceptor, CCR5.

All references cited herein are incorporated by reference herein for all that they teach and for all purposes. It is to be understood that, while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

CLAIMS

That which is claimed is:

1. A chimeric polypeptide comprising:
a virus coat polypeptide sequence and a viral receptor polypeptide sequence, wherein the coat polypeptide sequence and the receptor polypeptide sequence are linked by an amino acid spacer of sufficient length to allow the coat polypeptide sequence and the viral receptor polypeptide sequence to bind to each other.

2. The chimeric polypeptide according to claim 1, wherein the chimeric polypeptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 and SEQ ID NO: 6.

3. The chimeric polypeptide according to claim 1, wherein the virus coat polypeptide sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 30 and SEQ ID NO: 28.

4. The chimeric polypeptide according to claim 3, where the receptor polypeptide sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26 and SEQ ID NO: 20.

5. The chimeric polypeptide of claim 1, wherein the virus is an immunodeficiency virus selected from the group consisting of HIV. SIV, FIV, FeLV, FPV, and herpes virus.

6. The chimeric polypeptide of claim 1, wherein the virus coat polypeptide comprises a gp120 polypeptide sequence.

7. The chimeric polypeptide of claim 6, wherein the gp120 polypeptide sequence lacks 60 amino acids from the amino terminus and 20 amino acids from the carboxyl terminus.

8. The chimeric polypeptide of claim 1, wherein the receptor is a CD4 polypeptide sequence.

9. The chimeric polypeptide of claim 18, wherein the CD4 polypeptide sequence comprises the Dl and D2 domains.

10. The chimeric polypeptide of claim 1, wherein the spacer has from about 5 to about 200 amino acids.

11. The chimeric polypeptide of claim 1, wherein the spacer comprises a peptidomimetic sequence.

12. The chimeric polypeptide of claim 1, further comprising a heterologous domain.

13. The chimeric polypeptide of claim 12, wherein the heterologous domain is selected from the group consisting of: a tag, an adhesin, and an immunopotentiating agent.

14. The chimeric polypeptide of claim 12, wherein the heterologous domain is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11 and SEQ ID NO: 32.

15. The chimeric polypeptide of claim 2, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

16. The chimeric polypeptide of claim 4, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

17. A polynucleotide sequence comprising a nucleic acid sequence encoding the chimeric polypeptide of claim 1.

18. The polynucleotide sequence according to claim 17, wherein the nucleic acid sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO: 12.

19. The polynucleotide sequence according to claim 17, wherein a nucleic acid

sequence for the virus coat polypeptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 29 and SEQ ID NO: 27.

20. The polynucleotide sequence according to claim 19, wherein a nucleic acid sequence for the receptor polypeptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 25 and SEQ ID NO: 19.

21. A host cell containing the expression vector of claim 18.

22. A host cell containing the expression vector of claim 20.

23. An antibody or functional fragment thereof that binds to the chimeric polypeptide of claim 1.

24. An antibody or functional fragment thereof that binds to the chimeric polypeptide of claim 2.

25. An antibody or function fragment thereof that binds to the chimeric polypeptide of claim 4.

26. The antibody of claim 23, wherein the antibody neutralizes the virus in vitro.

27. The antibody of claim 24, wherein the antibody neutralizes the virus in vitro.

28. The antibody of claim 25, wherein the antibody neutralizes the virus in vitro.

29. The antibody of claim 24, wherein the antibody inhibits virus infection.

30. The antibody of claim 25, wherein the antibody inhibits virus infection.

31. The antibody of claim 24, wherein the antibody binds to an epitope produced by the binding of the virus coat polypeptide sequence and the receptor polypeptide sequence.

32. The antibody of claim 25, wherein the antibody binds to an epitope produced by the binding of the virus coat polypeptide sequence and the receptor polypeptide sequence.

33. The antibody of claim 31, wherein the epitope is present on an envelope polypeptide sequence.

34. A method for producing an antibody that binds to the chimeric polypeptide of claim 1, comprising administering the chimeric polypeptide of claim 1 to a subject, or a polynucleotide that encodes the chimeric polypeptide of claim 1, in an amount sufficient for the subject to produce antibody to the chimeric polypeptide of claim 1.

35. A method for producing an antibody that binds to the chimeric polypeptide of claim 2, comprising administering the chimeric polypeptide of claim 2 to a subject, or a polynucleotide that encodes the chimeric polypeptide of claim 2, in an amount sufficient for the subject to produce antibody to the chimeric polypeptide of claim 2.

36. A method for inhibiting virus infection in a subject comprising administering to the subject an effective amount of the chimeric polypeptide of claim 4, or a polynucleotide encoding the chimeric polypeptide of claim 4, to inhibit virus infection of a cell expressing a virus co-receptor polypeptide, thereby inhibiting virus infection.

37. The method of claim 35, wherein the virus is an immunodeficiency virus.

38. The method of claim 35, wherein the subject is a human.

39. A method for producing an immune response to a virus in a subject comprising administering to the subject an effective amount of the chimeric polypeptide of claim 2, or a polynucleotide that encodes the chimeric polypeptide of claim 2, to produce an immune response to the virus.

40. The method of claim 39, wherein the virus is an immunodeficiency virus.

41. The method of claim 39, wherein the subject is a human.

42. The method of claim 39, wherein the immune response comprises an antibody.

43. The method of claim 42, wherein the antibody binds to an epitope produced by the binding of the virus coat polypeptide sequence and the receptor polypeptide sequence.

44. The method of claim 42, wherein the antibody neutralizes the virus *in vitro*.

45. A method for identifying an agent that inhibits an interaction between a virus and a virus co-receptor comprising the steps of: (a) contacting the chimeric polypeptide of claim 2 with a virus co-receptor under conditions allowing the chimeric polypeptide and the co-receptor to bind, in the presence and absence of a test agent; and (b) detecting binding in the presence and absence of the test agent, wherein decreased binding in the presence of the test agent thereby identifies an agent that inhibits binding between the virus and the virus co-receptor.

46. The method of claim 45, wherein the virus is an immunodeficiency virus.

47. The method of claim 45, wherein the immunodeficiency virus co-receptor is a CCR5 or CXCR4 polypeptide sequence.

48. The method of claim 45, wherein the virus co-receptor is present on the surface of an intact cell.

49. A method for identifying an agent that inhibits an interaction between a virus and a virus receptor comprising the steps of: (a) contacting the chimeric polypeptide of claim 2 with a test agent; and (b) detecting binding between the virus coat polypeptide sequence and the viral receptor polypeptide sequence, wherein a decreased amount of binding in the presence of the test agent identifies an agent that inhibits binding between the virus and the virus receptor.

50. The method of claim 49, wherein the test agent is selected from the group consisting of a peptide, an organic molecule, an antibody, an antiviral, an immunodeficiency virus receptor or functional fragment thereof.

51. The method of claim 50, wherein the immunodeficiency virus receptor polypeptide is a CD4 polypeptide sequence.

52. A method for identifying a chimeric polypeptide sequence that inhibits virus infection of a cell comprising the steps of:
(a) contacting a cell susceptible to virus infection with an infectious virus particle in the presence and absence of the chimeric polypeptide sequence of claim 2; and
(b) determining whether the chimeric polypeptide inhibits virus infection of the cell, thereby identifying a chimeric polypeptide sequence that inhibits virus infection.

53. The method of claim 52, wherein the virus is an immunodeficiency virus.

54. The method of claim 53, wherein the immunodeficiency virus is HIV.

FIGURE 1

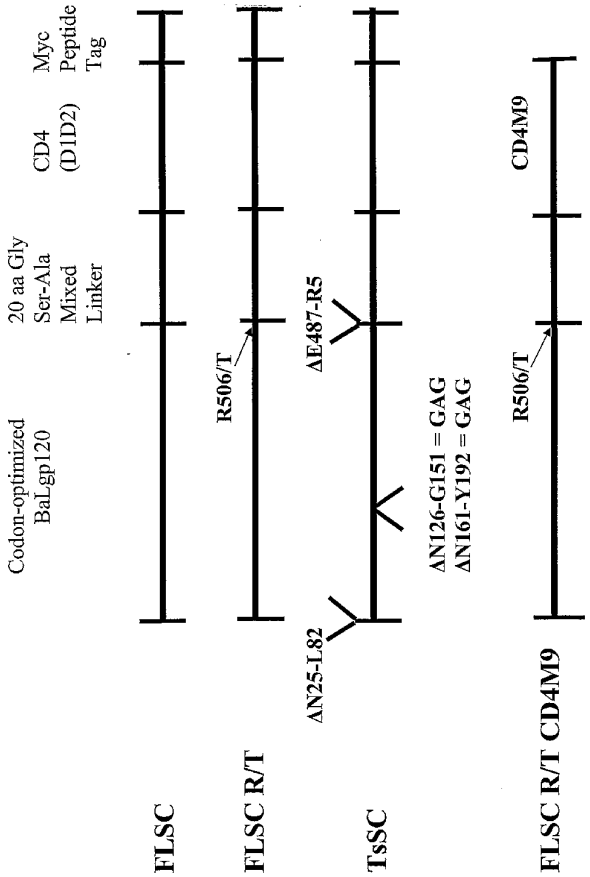

Codon-optimized BaL.gp120
20 aa Gly Ser-Ala Mixed Linker
CD4 (D1D2)
Myc Peptide Tag
R506/T
ΔE487-R5
ΔN25-L82
ΔN126-G151 = GAG
ΔN161-Y192 = GAG
CD4M9
FLSC
FLSC R/T
TsSC
FLSC R/T CD4M9

FIGURE 2

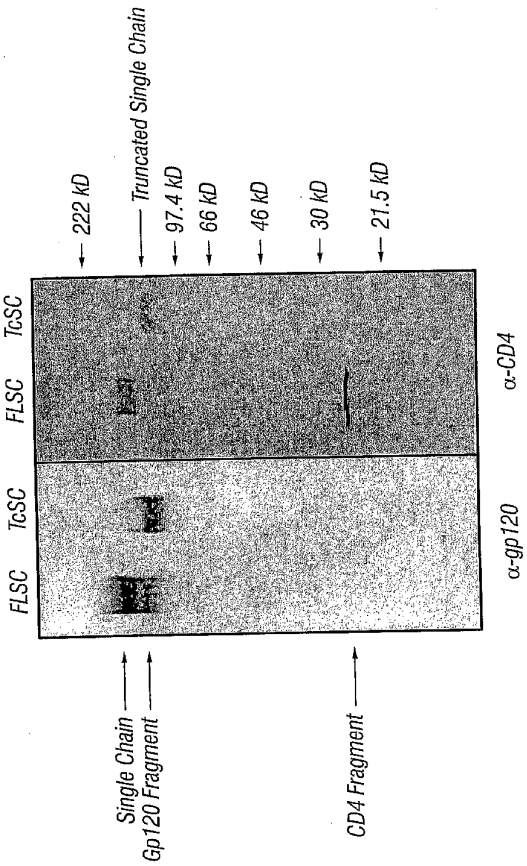

222 kD
Truncated Single Chain
97.4 kD
66 kD
46 kD
30 kD
21.5 kD
FLSC
TcSC
FLSC
TcSC
α-CD4
α-gp120
Single Chain
Gp120 Fragment
CD4 Fragment

FIGURE 3

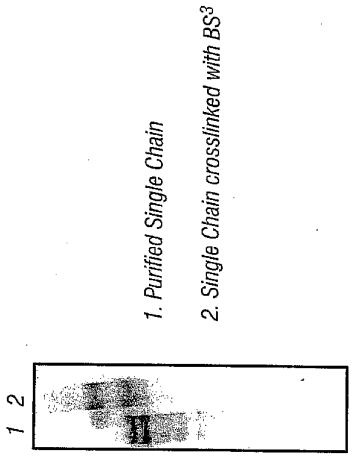
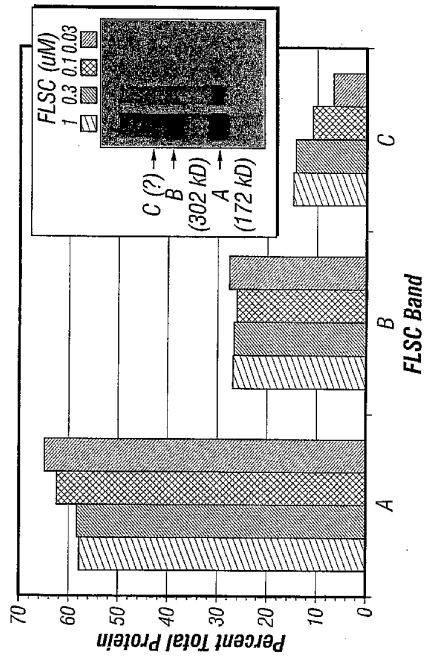

1. Purified Single Chain
2. Single Chain crosslinked with BS3
1 2

FIGURE 4


FLSC (uM)
1 0.3 0.1 0.03
C (?)
B
(302 kD)
A
(172 kD)
C
B
A
FLSC Band
Percent Total Protein
70
60
50
40
30
20
10
0

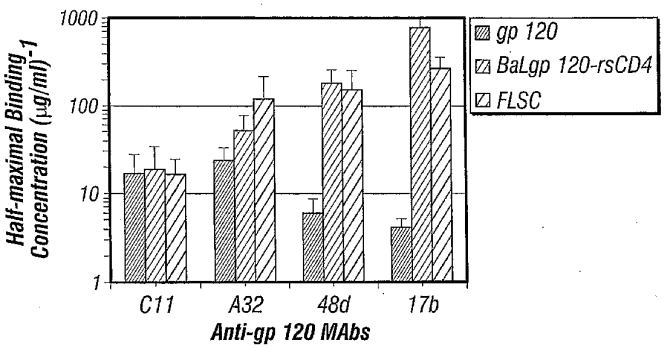


FIGURE 5A

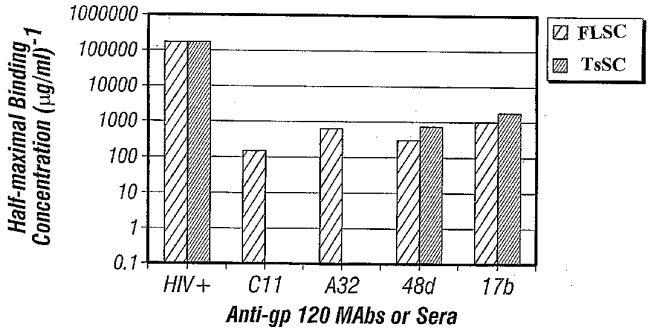


FIGURE 5B

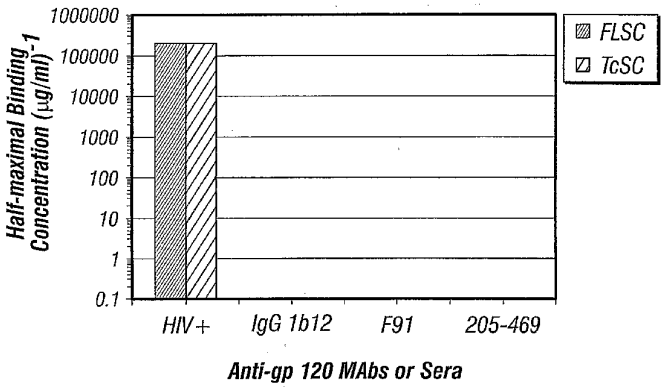


FIGURE 5C

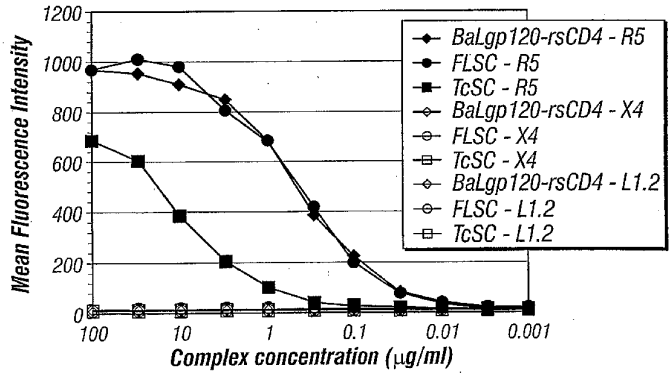


FIGURE 6

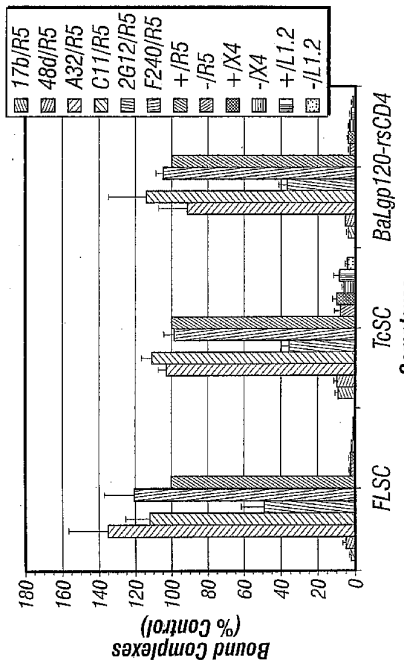

17b/R5
48d/R5
A32/R5
C11/R5
2G12/R5
F240/R5
+/R5
-/R5
+/X4
-/X4
+/L1.2
-/L1.2
Bound Complexes (% Control)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
FLSC
TcSC
BaLgp120-rsCD4
Complexes

FIGURE 7

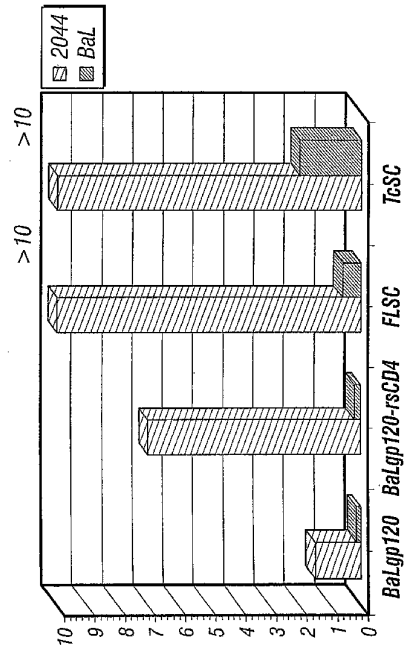

2044
BaL
>10
>10
TcSC
FLSC
BaLgp120-rsCD4
BaLgp120
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0

FIGURE 8

Genetic structure of FLSC R/T-IgG1

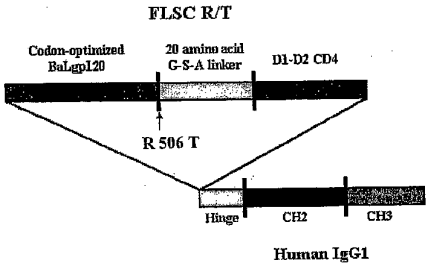


FIGURE 9

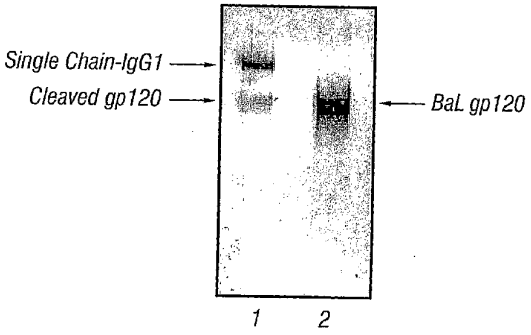


FIGURE 10

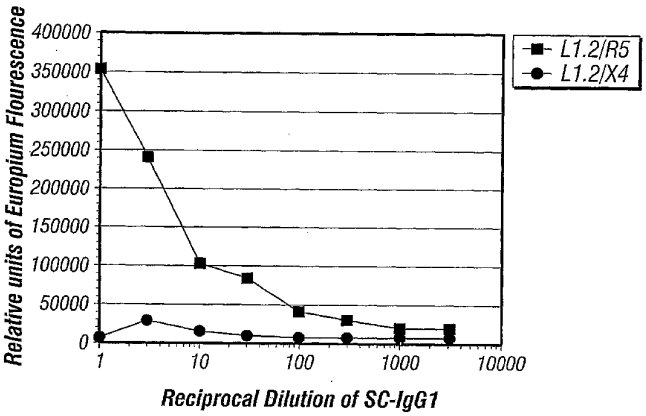

Relative units of Europium Flourescence
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
1
10
100
1000
10000
Reciprocal Dilution of SC-IgG1
L1.2/R5
L1.2/X4

FIGURE 11

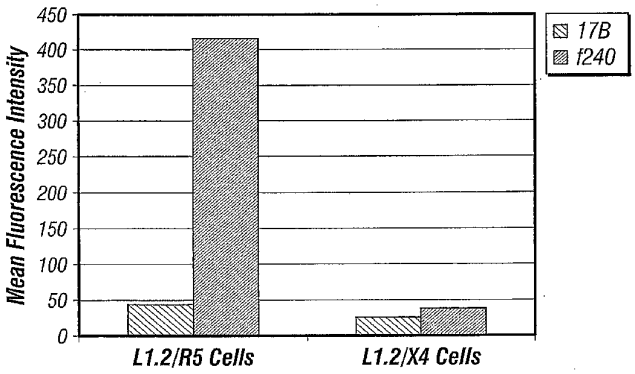

450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Mean Fluorescence Intensity
17B
f240
L1.2/R5 Cells
L1.2/X4 Cells

FIGURE 12

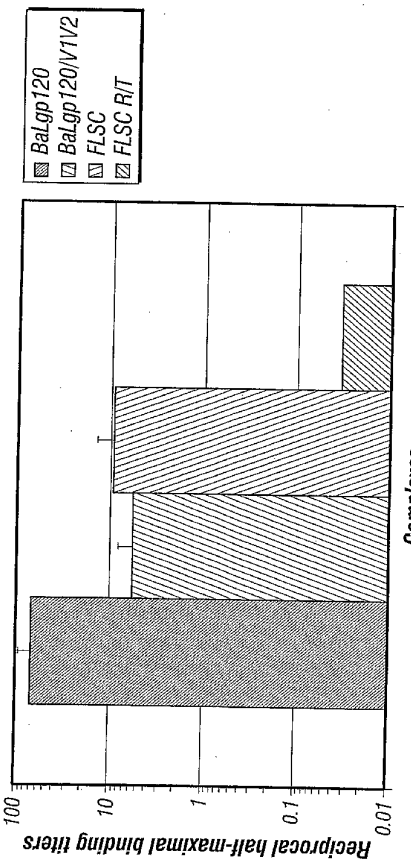
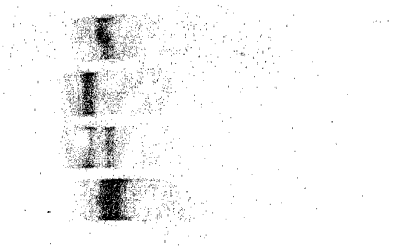

BaLgp120
BaLgp120/V1V2
FLSC
FLSC R/T
Complexes
Reciprocal half-maximal binding titers
100
10
1
0.1
0.01

FIGURE 13

Immunoblot of FLSC moieties

1 2 3 4



1. BaLgp120 (1)
2. FLSC (2)
3. FLSC R/T (3)
4. FLSC R/T CD4M9 (4)

FIGURE 14

FIGURE 15

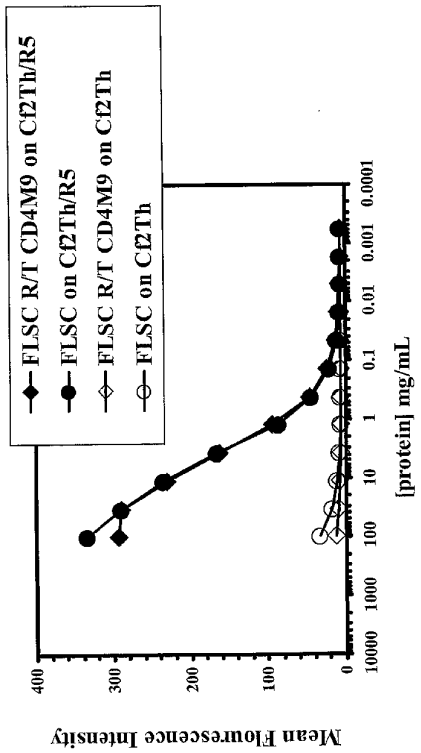

FLSC R/T CD4M9 on Cf2Th/R5
FLSC on Cf2Th/R5
FLSC R/T CD4M9 on Cf2Th
FLSC on Cf2Th
Mean Flourescence Intensity
400
300
200
100
0
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
[protein] mg/mL

FIGURE 16

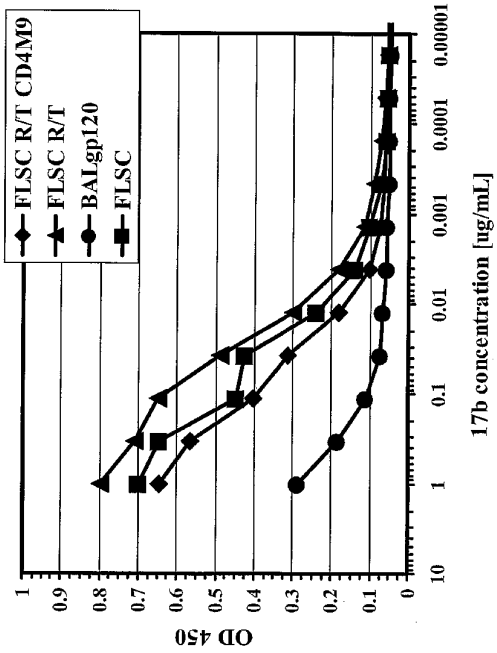

FLSC R/T CD4M9
FLSC R/T
BALgp120
FLSC
OD 450
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
17b concentration [ug/mL]

FIGURE 17

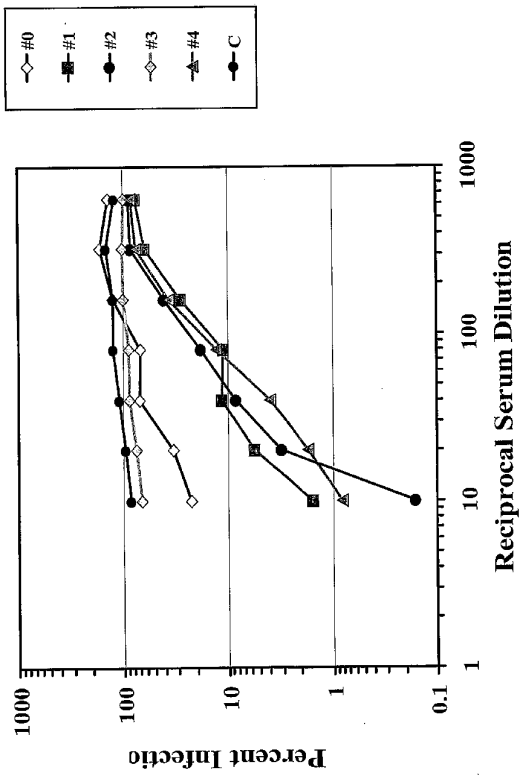

#0
#1
#2
#3
#4
C
Percent Infectio
1000
100
10
1
0.1
Reciprocal Serum Dilution
1000
100
10
1

FIGURE 18

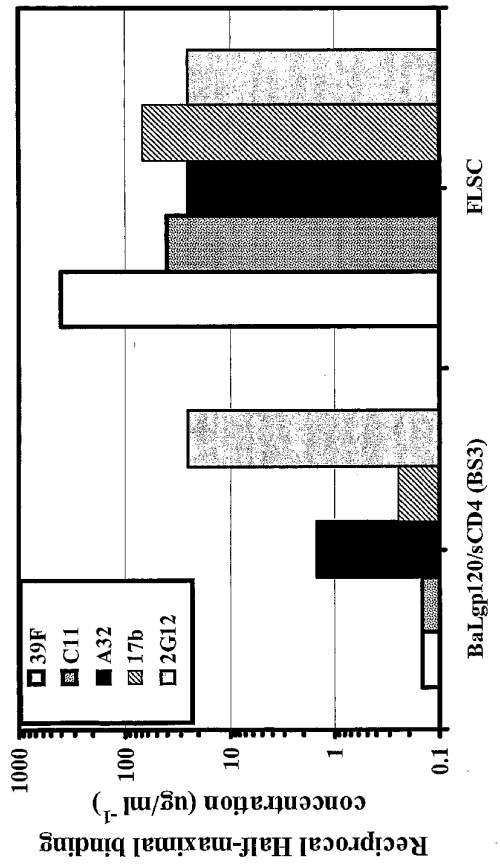

Reciprocal Half-maximal binding concentration (ug/ml -1)
1000
100
10
1
0.1
39F
C11
A32
17b
2G12
BaL-gp120/sCD4 (BS3)
FLSC

FIGURE 19

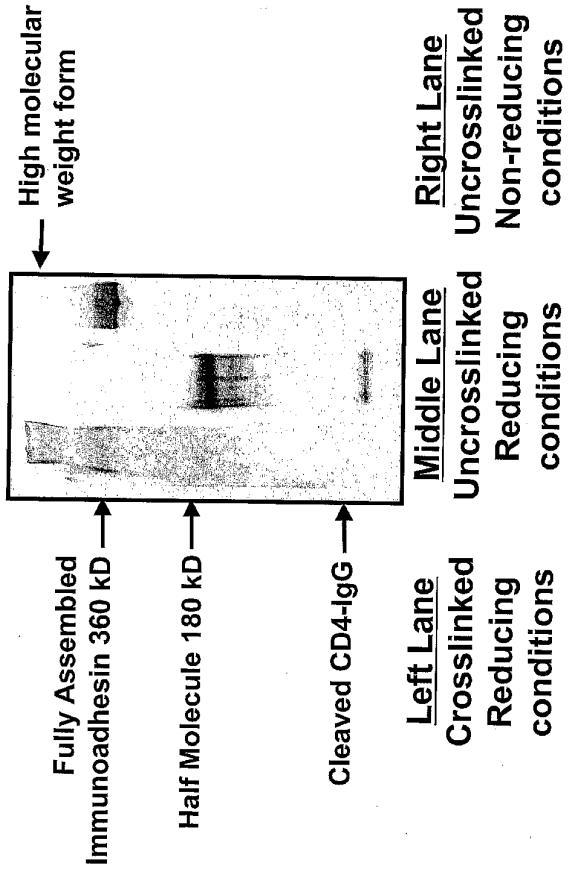

High molecular weight form
Fully Assembled Immunoadhesin 360 kD
Half Molecule 180 kD
Cleaved CD4-IgG
Left Lane Crosslinked Reducing conditions
Middle Lane Uncrosslinked Reducing conditions
Right Lane Uncrosslinked Non-reducing conditions

FIGURE 20

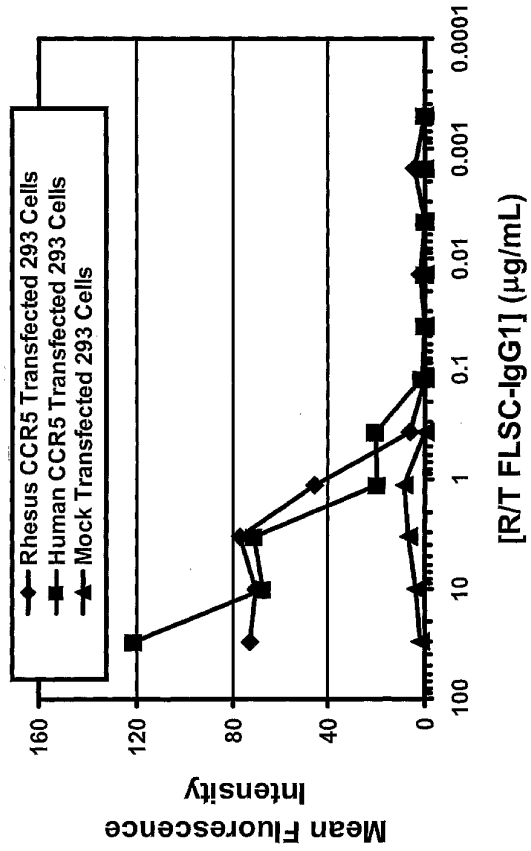
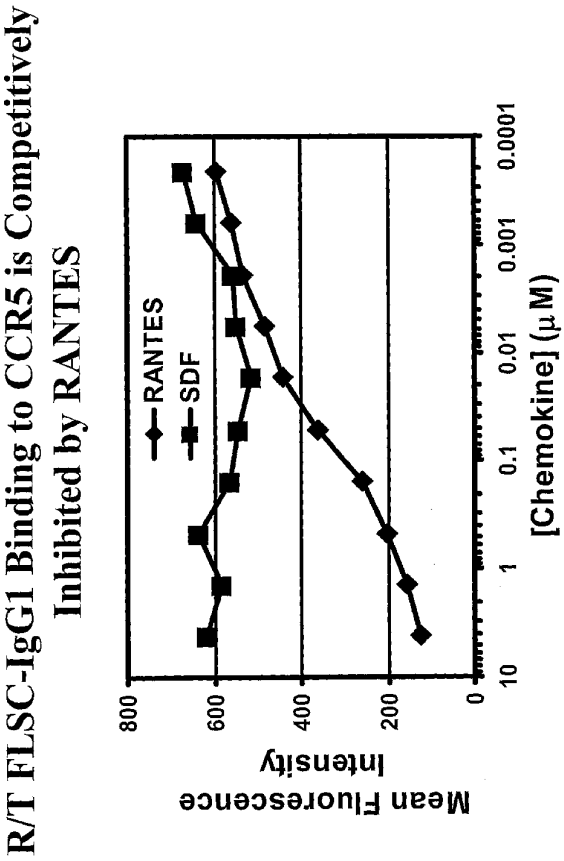

Rhesus CCR5 Transfected 293 Cells
Human CCR5 Transfected 293 Cells
Mock Transfected 293 Cells
Mean Fluorescence Intensity
0
40
80
120
160
[R/T FLSC-IgG1] (µg/mL)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001

FIGURE 21


R/T FLSC-IgG1 Binding to CCR5 is Competitively Inhibited by RANTES
Mean Fluorescence Intensity
800
600
400
200
0
RANTES
SDF
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
[Chemokine] (μM)

SEQUENCE LISTING

<110> DeVico, Anthony L.
Fouts, Timothy R.
Tuskan, Robert G.

<120> VIRUS COAT PROTEIN/RECEPTOR CHIMERAS AND METHODS OF USE

<130> 4115-144 CIP

<140> US 09/934,060
<141> 2001-08-21

<150> US 09/684,026
<151> 2000-10-06

<150> US 60/158,321
<151> 1999-10-08

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 2159
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized construct
<400> 1

atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgctggggat gctggtcgct 60

tcctgcctcg gaaacgccga ggagaagctg tgggtgaccg tgtactacgg cgtgcccgtg 120

tggaaggagg ccaccaccac cctgttctgc gccagcgacc gcaaggccta cgacaccgag 180

gtgcacaacg tgtgggccac ccacgcctgc gtgcccaccg accccaaccc ccaggaggtg 240

gagctgaaga acgtgaccga gaacttcaac atgtggaaga acaacatggt ggagcagatg 300

caegaggaca tcatcagcct gtgggaccag agcctgaagc cctgcgtgaa gctgacccca 360

ctgtgcgtga ccctgaactg caccgacctg cgcaacgcca ccaacggcaa cgacaccaac 420

accactagta gcagccgcgg catggtgggc ggcggcgaga tgaagaactg cagcttcaac 480

atcaccacca acatccgcgg caaggtgcag aaggagtacg ccctgttcta caagctggac 540

atcgccccca tcgacaacaa cagcaacaac cgctaccgcc tgatcagctg caacaccagc 600

gtgatcaccc aggcctgccc caaggtgagc ttcgagccca tccccatcca ctactgcgcc 660

cccgccggct tcgccatcct gaagtgcaag gacaagaagt tcaacggcaa gggccctgc 720

accaacgtga gcaccgtgca gtgcacccac ggcatccgcc ccgtggtgag cacccagctg 780

ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag gtggtgatcc gcagcgccaa cttcgccgac 840

aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac gagagcgtgg agatcaactg cacccgcccc 900

aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc ggccccggcc gcgccttcta caccaccggc 960

gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac tgcaacctga gccgcgccaa gtggaacgac 1020

accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc 1080

aagcacagca gcggcggcga ccccgagatc gtgacccaca gcttcaattg cggcggcgag 1140

ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc 1200

aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc ctgccctgcc gcatcaagca gatcatcaac 1260

atgtggcagg aggtgggccg cgccatgtac gccccccccа tccgcggcca gatccgctgc 1320

agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc 1380

gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag 1440

tacaaggtgg tgaagatcga gccctgggc gtggcccca ccaaggccaa gcgccgcgtg 1500

gtgcagcgcg agaagcgtgg atcctctggt ggcggtggct cgggctccgg aggaggtggg 1560

tcgggtggcg gcgcggccgc taagaaagtg gtgctgggca aaaaaggga tacagtggaa 1620

ctgacctgta cagcttccca gaagaagagc atacaattcc actggaaaaa ctccaaccag 1680

ataaagattc tgggaaatca gggctccttc ttaactaaag gtccatccaa gctgaatgat 1740

cgcgctgact caagaagaag cctttgggac caaggaaact tcccctgat catcaagaat 1800

cttaagatag aagactcaga tacttacatc tgtgaagtgg aggaccagaa ggaggaggtg 1860

caattgctag tgttcggatt gactgccaac tctgacaccc acctgcttca ggggcagagc 1920

ctgaccctga ccttggagag ccccctggt agtagcccct cagtgcaatg taggagtcca 1980

aggggtaaaa acatacaggg ggggaagacc ctctccgtgt ctcagctgga gctccaggat 2040

agtggcacct ggacatgcac tgtcttgcag aaccagaaga aggtggagtt caaaatagac 2100

atcgtggtgc tagctgaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgtaata tgtttaaac 2159

<210> 2

<211> 720

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (716)..(716)

<223> Xaa can be any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (719)..(719)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 2

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Ala Glu Glu Lys Leu Trp Val
20 25 30

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

Phe Cys Ala Ser Asp Arg Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val

```
    50                  55                  60

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

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

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

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

Asp Leu Arg Asn Ala Thr Asn Gly Asn Asp Thr Asn Thr Thr Ser Ser
    130                 135                 140

Ser Arg Gly Met Val Gly Gly Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn
145                 150                 155                 160

Ile Thr Thr Asn Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu Phe
                165                 170                 175

Tyr Lys Leu Asp Ile Ala Pro Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Arg Tyr
            180                 185                 190

Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys
        195                 200                 205

Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe
    210                 215                 220

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

Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val
                245                 250                 255

Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val
            260                 265                 270

Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile Val Gln
        275                 280                 285

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

Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
305 310 315 320

Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala
325 330 335

Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln
340 345 350

Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro
355 360 365

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
370 375 380

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

Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys
405 410 415

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

Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
435 440 445

Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg
450 455 460

Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys
465 470 475 480

Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala
485 490 495

Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Gly Ser Ser Gly Gly Gly
500 505 510

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Lys
515 520 525

Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr
530 535 540

Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln
545 550 555 560

Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
565 570 575

Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly
580 585 590

Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr
595 600 605

Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val
610 615 620

Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser
625 630 635 640

Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln
645 650 655

Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser
660 665 670

Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val
675 680 685

Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu
690 695 700

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Xaa Tyr Val Xaa Thr
705 710 715 720

<210> 3

<211> 2159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 3
atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgctggggat gctggtcgct 60

tcctgcctcg gaaacgccga ggagaagctg tgggtgaccg tgtactacgg cgtgcccgtg 120
tggaaggagg ccaccaccac cctgttctgc gccagcgacc gcaaggccta cgacaccgag 180
gtgcacaacg tgtgggccac ccacgcctgc gtgcccaccg accccaaccc ccaggaggtg 240
gagctgaaga acgtgaccga gaacttcaac atgtggaaga acaacatggt ggagcagatg 300
cacgaggaca tcatcagcct gtgggaccag agcctgaagc cctgcgtgaa gctgacccca 360
ctgtgcgtga ccctgaactg caccgacctg cgcaacgcca ccaacggcaa cgacaccaac 420
accactagta gcagccgcgg catggtgggc ggcggcgaga tgaagaactg cagcttcaac 480
atcaccacca acatccgcgg caaggtgcag aaggagtacg ccctgttcta caagctggac 540
atcgccccca tcgacaacaa cagcaacaac cgctaccgcc tgatcagctg caacaccagc 600
gtgatcaccc aggcctgccc caaggtgagc ttcgagccca tccccatcca ctactgcgcc 660
cccgccggct tcgccatcct gaagtgcaag gacaagaagt tcaacggcaa gggcccctgc 720
accaacgtga gcaccgtgca gtgcacccac ggcatccgcc ccgtggtgag cacccagctg 780
ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag gtggtgatcc gcagcgccaa cttcgccgac 840
aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac gagagcgtgg agatcaactg cacccgcccc 900
aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc ggccccggcc gcgccttcta caccaccggc 960
gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac tgcaacctga gccgcgccaa gtggaacgac 1020
accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc 1080
aagcacagca gcggcggcga ccccgagatc gtgacccaca gcttcaattg cggcggcgag 1140
ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc 1200
aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc ctgccctgcc gcatcaagca gatcatcaac 1260
atgtggcagg aggtgggccg cgccatgtac gccccccca tccgcggcca gatccgctgc 1320
agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc 1380
gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag 1440
tacaaggtgg tgaagatcga gcccctgggc gtggcccca ccaaggccaa gcgccgcgtg 1500
gtgcagcgcg agaagaccgg atcctctggt ggcggtggct cgggctccgg aggaggtggg 1560
tcgggtggcg gcgcggccgc taagaaagtg gtgctgggca aaaaagggga tacagtggaa 1620
ctgacctgta cagcttccca gaagaagagc atacaattcc actggaaaaa ctccaaccag 1680
ataaagattc tgggaaatca gggctccttc ttaactaaag gtccatccaa gctgaatgat 1740
cgcgctgact caagaagaag cctttgggac caaggaaact tcccctgat catcaagaat 1800
cttaagatag aagactcaga tacttacatc tgtgaagtgg aggaccagaa ggaggaggtg 1860

caattgctag tgttcggatt gactgccaac tctgacaccc acctgcttca ggggcagagc 1920

ctgaccctga ccttggagag ccccccctggt agtagcccct cagtgcaatg taggagtcca 1980

aggggtaaaa acatacaggg ggggaagacc ctctccgtgt ctcagctgga gctccaggat 2040

agtggcacct ggacatgcac tgtcttgcag aaccagaaga aggtggagtt caaaatagac 2100

atcgtggtgc tagctgaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgtaata tgtttaaac 2159

<210> 4

<211> 720

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (716)..(716)

<223> Xaa can be any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (719)..(719)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 4

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Ala Glu Glu Lys Leu Trp Val
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asp Leu Arg Asn Ala Thr Asn Gly Asn Asp Thr Asn Thr Thr Ser Ser
    130                 135                 140

Ser Arg Gly Met Val Gly Gly Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn
145                 150                 155                 160

Ile Thr Thr Asn Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu Phe
                165                 170                 175

Tyr Lys Leu Asp Ile Ala Pro Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Arg Tyr
            180                 185                 190

Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys
        195                 200                 205

Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe
    210                 215                 220

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

Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val
                245                 250                 255

Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val
            260                 265                 270

Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile Val Gln
        275                 280                 285

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

```
Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
305                 310                 315                 320

Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala
                325                 330                 335

Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln
            340                 345                 350

Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro
        355                 360                 365

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
    370                 375                 380

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

Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys
                405                 410                 415

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

Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
        435                 440                 445

Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg
    450                 455                 460

Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys
465                 470                 475                 480

Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala
                485                 490                 495

Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Thr Gly Ser Ser Gly Gly Gly
            500                 505                 510

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Lys
        515                 520                 525

Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr
    530                 535                 540
```

Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln
545 550 555 560

Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
565 570 575

Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly
580 585 590

Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr
595 600 605

Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val
610 615 620

Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser
625 630 635 640

Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln
645 650 655

Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser
660 665 670

Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val
675 680 685

Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu
690 695 700

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Xaa Tyr Val Xaa Thr
705 710 715 720

<210> 5

<211> 1668

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 5
atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgctggggat gctggtcgct 60

tcctgcctcg gaaacgccga ggagaagctg tgggtgaccg tgtactacgg cgtgcccgtg 120
tggaaggagg ccaccaccac cctgttctgc gccagcgacc gcaaggccta cgacaccgag 180
gtgcacaacg tgtgggccac ccacgcctgc gtgcccaccg accccaaccc ccaggaggtg 240
gagctgaaga acgtgaccga gaacttcaac atgtggaaga acaacatggt ggagcagatg 300
cacgaggaca tcatcagcct gtgggaccag agcctgaagc cctgcgtgaa gctgacccca 360
ctgtgcgtga ccctgaactg caccgacctg cgcaacgcca ccaacggcaa cgacaccaac 420
accactagta gcagccgcgg catggtgggc ggcggcgaga tgaagaactg cagcttcaac 480
atcaccacca acatccgcgg caaggtgcag aaggagtacg ccctgttcta caagctggac 540
atcgccccca tcgacaacaa cagcaacaac cgctacgcc tgatcagctg caacaccagc 600
gtgatcaccc aggcctgccc caaggtgagc ttcgagccca tccccatcca ctactgcgcc 660
cccgccggct tcgccatcct gaagtgcaag gacaagaagt tcaacggcaa gggccctgc 720
accaacgtga gcaccgtgca gtgcacccac ggcatccgcc ccgtggtgag cacccagctg 780
ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag gtggtgatcc gcagcgccaa cttcgccgac 840
aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac gagagcgtgg agatcaactg cacccgcccc 900
aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc ggccccggcc gcgccttcta caccaccggc 960
gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac tgcaacctga gccgcgccaa gtggaacgac 1020
accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc 1080
aagcacagca gcggcggcga ccccgagatc gtgacccaca gcttcaattg cggcggcgag 1140
ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc 1200
aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc ctgccctgcc gcatcaagca gatcatcaac 1260
atgtggcagg aggtgggccg cgccatgtac gccccccca tccgcggcca gatccgctgc 1320
agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc 1380
gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag 1440
tacaaggtgg tgaagatcga gcccctgggc gtggcccca ccaaggccaa gcgccgcgtg 1500
gtgcagcgcg agaagaccgg atcctctggt ggcggtggct cgggctccgg aggaggtggg 1560
tcgggtggcg gcgcggccgc ttgcaacctg gcccgctgcc agctgcgctg caagagcctg 1620
ggcctgctgg gcaagtgcgc cggcagcttc tgcgcctgcg gcccctaa 1668

<210> 6
<211> 556
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (556)..(556)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 6

```
Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1               5                   10                  15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Ala Glu Glu Lys Leu Trp Val
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

Asp Leu Arg Asn Ala Thr Asn Gly Asn Asp Thr Asn Thr Thr Ser Ser
    130                 135                 140

Ser Arg Gly Met Val Gly Gly Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn
145                 150                 155                 160

Ile Thr Thr Asn Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu Phe
```

```
                165                 170                 175

Tyr Lys Leu Asp Ile Ala Pro Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Arg Tyr
            180                 185                 190

Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys
        195                 200                 205

Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe
    210                 215                 220

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

Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val
                245                 250                 255

Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val
            260                 265                 270

Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile Val Gln
        275                 280                 285

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

Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
305                 310                 315                 320

Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala
                325                 330                 335

Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln
            340                 345                 350

Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro
        355                 360                 365

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
    370                 375                 380

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

Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys
                405                 410                 415
```

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

Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
435 440 445

Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg
450 455 460

Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys
465 470 475 480

Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala
485 490 495

Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Thr Gly Ser Ser Gly Gly Gly
500 505 510

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Cys
515 520 525

Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu Gly
530 535 540

Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Gly Pro Xaa
545 550 555

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthesized construct

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(39)

<223>

<400> 7
ggggtacca tgcccatggg gtctctgcaa ccgctggcc 39

<210> 8

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthesized construct

<400> 8
gggtccggag cccgagccac cgccaccaga ggatccacgc ttctcgcgct gcaccacgcg 60

gcgctt 66

<210> 9

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(69)

<223>

<400> 9
gggtccggag gaggtgggtc gggtggcggc gcggccgcta agaaagtggt gctgggcaaa 60

aaaggggat 69

<210> 10

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(76)

<223>

<400> 10
ggggtttaaa cttattacag atcctcttct gagatgagtt ttgttcagct agcaccacga 60

tgtctatttt gaactc 76

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> Spacer

<400> 11
gssgggggsgs ggggsgggaa a 21

<210> 12

<211> 1769

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 12

atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgctggggat gctggtcgct 60

tcctgcctcg gaaagaacgt gaccgagaac ttcaacatgt ggaagaacaa catggtggag 120

cagatgcacg aggacatcat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg 180

accccctgt gcgtgaccct gggcgcgggc gagatgaaga actgcagctt caacatcggc 240

gcgggccgcc tgatcagctg caacaccagc gtgatcaccc aggcctgccc caaggtgagc 300

ttcgagccca tccccatcca ctactgcgcc cccgccggct tcgccatcct gaagtgcaag 360

gacaagaagt tcaacggcaa gggccctgc accaacgtga gcaccgtgca gtgcacccac 420

ggcatccgcc ccgtggtgag cacccagctg ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag 480

gtggtgatcc gcagcgccaa cttcgccgac aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac 540

gagagcgtgg agatcaactg cacccgcccc aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc 600

ggccccggcc gcgccttcta caccaccggc gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac 660

tgcaacctga gccgcgccaa gtggaacgac accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc 720

gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc aagcacagca gcggcggcga ccccgagatc 780

gtgacccaca gcttcaattg cggcggcgag ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc 840

aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc 900

ctgccctgcc gcatcaagca gatcatcaac atgtggcagg aggtgggccg cgccatgtac 960

gccccccca tccgcggcca gatccgctgc agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc 1020

cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg 1080

cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag tacaaggtgg tgaagatcgg atcctctggt 1140

ggcggtggct cgggctccgg aggaggtggg tcgggtggcg gcgcggccgc taagaaagtg 1200

gtgctgggca aaaaagggga tacagtggaa ctgacctgta cagcttccca gaagaagagc 1260

atacaattcc actggaaaaa ctccaaccag ataaagattc tgggaaatca gggctccttc 1320

ttaactaaag gtccatccaa gctgaatgat cgcgctgact caagaagaag cctttgggac 1380

caaggaaact tcccctgat catcaagaat cttaagatag aagactcaga tacttacatc 1440

tgtgaagtgg aggaccagaa ggaggaggtg caattgctag tgttcggatt gactgccaac 1500

tctgacaccc acctgcttca ggggcagagc ctgaccctga ccttggagag ccccctggt 1560

agtagccccc cagtgcaatg taggagtcca aggggtaaaa acatacaggg ggggaagacc 1620

ctctccgtgt ctcagctgga gctccaggat agtggcacct ggacatgcac tgtcttgcag 1680

aaccagaaga aggtggagtt caaaatagac atcgtggtgc tagctgaaca aaaactcatc 1740

tcagaagagg atctgtaata tgtttaaac 1769

<210> 13

<211> 590

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (586)..(586)

<223> Xaa can be any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (589)..(589)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 13

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Lys Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn
20 25 30

Met Trp Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser
35 40 45

Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys
50 55 60

val Thr Leu Gly Ala Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Gly
65 70 75 80

Ala Gly Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys
85 90 95

Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala
100 105 110

Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Lys Gly
115 120 125

Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro
130 135 140

Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu
145 150 155 160

Val Val Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile
165 170 175

Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
180 185 190

Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr
195 200 205

Thr Gly Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser
210 215 220

Arg Ala Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg
225 230 235 240

Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly
245 250 255

Asp Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe
260 265 270

Tyr Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Thr Glu
275 280 285

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

Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met Tyr

305 310 315 320

Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly
325 330 335

Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val
340 345 350

Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu
355 360 365

Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Lys Lys Val
385 390 395 400

Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser
405 410 415

Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys
420 425 430

Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu
435 440 445

Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe
450 455 460

Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile
465 470 475 480

Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly
485 490 495

Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr
500 505 510

Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg
515 520 525

Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser
530 535 540

Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln
545 550 555 560

Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Glu
565 570 575

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Xaa Tyr Val Xaa Thr
580 585 590

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa can be any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 14

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Xaa Tyr Val Xaa Thr
1 5 10 15

<210> 15

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 15
ggggtacca tgcccatggg gtctctgcaa ccgctggcca ccttgtacct gctggggatg 60

ctggtcgctt cctgcctcgg aaagaacgtg accgagaact tcaacatgtg g 111

<210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 16
ggggatccg atcttcacca ccttgatctt gtacagctc 39

<210> 17

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 17
ctgtgcgtga ccctgggcgc ggccgagatg aagaactgca gcttcaacat cggcgcgggc 60

cgcctgatca gctgc 75

<210> 18

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 18
gcagctgatc aggcggcccg cgccgatgtt gaagctgcag ttcttcatct cgcccgcgcc 60

cagggtcacg cacag 75

<210> 19

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 19
tgcaacctgg cccgctgcca gctgcgctgc aagagcctgg gcctgctggg caagtgcgcc 60

ggcagcttct gcgcctgcgg ccctaa 87

<210> 20

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 20

Cys Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Gly Pro
20 25

<210> 21

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 21
gcggccgctt gcaacctggc ccgctgccag ctgcgctgca agagcctggg cctgctgggc 60

aagtgcgccg gcagcttctg cgcctgcggc ccctaagaat tc 102

<210> 22

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 22
gaattcttag gggccgcagg cgcagaagct gccggcgcac ttgcccagca ggcccaggct 60

cttgcagcgc agctggcagc gggccaggtt gcaagcggcc gc 102

<210> 23

<211> 1518

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 23
atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgctggggat gctggtcgct 60

tcctgcctcg gaaacgccga ggagaagctg tgggtgaccg tgtactacgg cgtgcccgtg 120

tggaaggagg ccaccaccac cctgttctgc gccagcgacc gcaaggccta cgacaccgag 180

gtgcacaacg tgtgggccac ccacgcctgc gtgcccaccg accccaaccc ccaggaggtg 240

gagctgaaga acgtgaccga gaacttcaac atgtggaaga acaacatggt ggagcagatg 300

cacgaggaca tcatcagcct gtgggaccag agcctgaagc cctgcgtgaa gctgaccccc 360

ctgtgcgtga ccctgaactg caccgacctg cgcaacgcca ccaacggcaa cgacaccaac 420

accactagta gcagccgcgg catggtgggc ggcggcgaga tgaagaactg cagcttcaac 480

atcaccacca acatccgcgg caaggtgcag aaggagtacg ccctgttcta caagctggac 540

atcgccccca tcgacaacaa cagcaacaac cgctaccgcc tgatcagctg caacaccagc 600

gtgatcaccc aggcctgccc caaggtgagc ttcgagccca tccccatcca ctactgcgcc 660

cccgccggct tcgccatcct gaagtgcaag gacaagaagt tcaacggcaa gggccctgc 720

accaacgtga gcaccgtgca gtgcacccac ggcatccgcc ccgtggtgag cacccagctg 780

ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag gtggtgatcc gcagcgccaa cttcgccgac 840

aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac gagagcgtgg agatcaactg cacccgcccc 900

aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc ggccccggcc gcgccttcta caccaccggc 960

gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac tgcaacctga gccgcgccaa gtggaacgac 1020

accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc 1080

aagcacagca gcggcggcga ccccgagatc gtgacccaca gcttcaattg cggcggcgag 1140

ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc 1200

aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc ctgccctgcc gcatcaagca gatcatcaac 1260

atgtggcagg aggtgggccg cgccatgtac gccccccca tccgcggcca gatccgctgc 1320

agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc 1380

gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag 1440

tacaaggtgg tgaagatcga gcccctgggc gtggcccca ccaaggccaa gcgccgcgtg 1500

gtgcagcgcg agaagcgt 1518

<210> 24

<211> 506

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 24

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Ala Glu Glu Lys Leu Trp Val
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asp Leu Arg Asn Ala Thr Asn Gly Asn Asp Thr Asn Thr Thr Ser Ser
    130                 135                 140

Ser Arg Gly Met Val Gly Gly Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn
145                 150                 155                 160

Ile Thr Thr Asn Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu Phe
                165                 170                 175

Tyr Lys Leu Asp Ile Ala Pro Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Arg Tyr
            180                 185                 190

Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys
        195                 200                 205

Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe
    210                 215                 220

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

Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val
                245                 250                 255

Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val
            260                 265                 270

Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile Val Gln
```

275 280 285

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

Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
305 310 315 320

Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala
325 330 335

Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln
340 345 350

Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro
355 360 365

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
370 375 380

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

Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys
405 410 415

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

Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
435 440 445

Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg
450 455 460

Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys
465 470 475 480

Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala
485 490 495

Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg
500 505

<210> 25

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 25
aagaaagtgg tgctgggcaa aaaaggggat acagtggaac tgacctgtac agcttcccag 60

aagaagagca tacaattcca ctggaaaaac tccaaccaga taaagattct gggaaatcag 120

ggctccttct taactaaagg tccatccaag ctgaatgatc gcgctgactc aagaagaagc 180

ctttgggacc aaggaaactt ccccctgatc atcaagaatc ttaagataga agactcagat 240

acttacatct gtgaagtgga ggaccagaag gaggaggtgc aattgctagt gttcggattg 300

actgccaact ctgacaccca cctgcttcag gggcagagcc tgaccctgac cttggagagc 360

ccccctggta gtagcccctc agtgcaatgt aggagtccaa ggggtaaaaa catacagggg 420

gggaagaccc tctccgtgtc tcagctggag ctccaggata gtggcacctg gacatgcact 480

gtcttgcaga accagaagaa ggtggagttc aaaatagaca tcgtggtgct agct 534

<210> 26

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 26

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln

50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp
65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu
85 90 95

Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln
100 105 110

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val
115 120 125

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
130 135 140

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr
145 150 155 160

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val
165 170 175

Leu Ala

<210> 27

<211> 1128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 27
atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc actttgtacc tgctggggat gctggtcgct 60

tcctgcctcg gaaagaacgt gaccgagaac ttcaacatgt ggaagaacaa catggtggag 120

cagatgcacg aggacatcat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg 180

accccctgt gcgtgaccct gggcgcgggc gagatgaaga actgcagctt caacatcggc 240

gcgggccgcc tgatcagctg caacaccagc gtgatcaccc aggcctgccc caaggtgagc 300

ttcgagccca tccccatcca ctactgcgcc cccgccggct tcgccatcct gaagtgcaag 360

gacaagaagt tcaacggcaa gggcccctgc accaacgtga gcaccgtgca gtgcacccac 420

ggcatccgcc ccgtggtgag cacccagctg ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag 480

gtggtgatcc gcagcgccaa cttcgccgac aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac 540

gagagcgtgg agatcaactg cacccgcccc aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc 600

ggccccggcc gcgccttcta caccaccggc gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac 660

tgcaacctga gccgcgccaa gtggaacgac accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc 720

gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc aagcacagca gcggcggcga ccccgagatc 780

gtgacccaca gcttcaattg cggcggcgag ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc 840

aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc 900

ctgccctgcc gcatcaagca gatcatcaac atgtggcagg aggtgggccg cgccatgtac 960

gccccccca tccgcggcca gatccgctgc agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc 1020

cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg 1080

cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag tacaaggtgg tgaagatc 1128

<210> 28

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 28

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Lys Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn
20 25 30

Met Trp Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser
35 40 45

Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys
50 55 60

Val Thr Leu Gly Ala Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Gly

65 70 75 80

Ala Gly Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys
85 90 95

Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala
100 105 110

Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Lys Gly
115 120 125

Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro
130 135 140

Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu
145 150 155 160

Val Val Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile
165 170 175

Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
180 185 190

Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr
195 200 205

Thr Gly Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser
210 215 220

Arg Ala Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg
225 230 235 240

Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly
245 250 255

Asp Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe
260 265 270

Tyr Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Thr Glu
275 280 285

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

Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met Tyr
305 310 315 320

Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly
325 330 335

Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val
340 345 350

Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu
355 360 365

Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile
370 375

<210> 29

<211> 1518

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 29
atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgctggggat gctggtcgct 60

tcctgcctcg gaaacgccga ggagaagctg tgggtgaccg tgtactacgg cgtgcccgtg 120

tggaaggagg ccaccaccac cctgttctgc gccagcgacc gcaaggccta cgacaccgag 180

gtgcacaacg tgtgggccac ccacgcctgc gtgcccaccg accccaaccc ccaggaggtg 240

gagctgaaga acgtgaccga gaacttcaac atgtggaaga acaacatggt ggagcagatg 300

cacgaggaca tcatcagcct gtgggaccag agcctgaagc cctgcgtgaa gctgaccccc 360

ctgtgcgtga ccctgaactg caccgacctg cgcaacgcca ccaacggcaa cgacaccaac 420

accactagta gcagccgcgg catggtgggc ggcggcgaga tgaagaactg cagcttcaac 480

atcaccacca acatccgcgg caaggtgcag aaggagtacg ccctgttcta caagctggac 540

atcgccccca tcgacaacaa cagcaacaac cgctaccgcc tgatcagctg caacaccagc 600

gtgatcaccc aggcctgccc caaggtgagc ttcgagccca tccccatcca ctactgcgcc 660

cccgccggct tcgccatcct gaagtgcaag gacaagaagt tcaacggcaa gggcccctgc 720

accaacgtga gcaccgtgca gtgcacccac ggcatccgcc ccgtggtgag cacccagctg 780

ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag gtggtgatcc gcagcgccaa cttcgccgac 840

aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac gagagcgtgg agatcaactg cacccgcccc 900

aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc ggccccggcc gcgccttcta caccaccggc 960

gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac tgcaacctga gccgcgccaa gtggaacgac 1020

accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc 1080

aagcacagca gcggcggcga ccccgagatc gtgacccaca gcttcaattg cggcggcgag 1140

ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc 1200

aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc ctgccctgcc gcatcaagca gatcatcaac 1260

atgtggcagg aggtgggccg cgccatgtac gcccccccca tccgcggcca gatccgctgc 1320

agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc 1380

gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag 1440

tacaaggtgg tgaagatcga gcccctgggc gtggcccccа ccaaggccaa gcgccgcgtg 1500

gtgcagcgcg agaagacc 1518

<210> 30

<211> 506

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 30

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Ala Glu Glu Lys Leu Trp Val
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Asp Leu Arg Asn Ala Thr Asn Gly Asn Asp Thr Asn Thr Thr Ser Ser
    130                 135                 140

Ser Arg Gly Met Val Gly Gly Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn
145                 150                 155                 160

Ile Thr Thr Asn Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu Phe
                165                 170                 175

Tyr Lys Leu Asp Ile Ala Pro Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Arg Tyr
            180                 185                 190

Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys
        195                 200                 205

Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe
    210                 215                 220

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

Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val
                245                 250                 255

Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val
            260                 265                 270

Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile Val Gln
        275                 280                 285

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

Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
305                 310                 315                 320

Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala
```

325 330 335

Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln
340 345 350

Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro
355 360 365

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
370 375 380

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

Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys
405 410 415

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

Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
435 440 445

Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg
450 455 460

Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys
465 470 475 480

Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala
485 490 495

Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Thr
500 505

<210> 31

<211> 776

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 31
atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgctggggat gctggtcgct 60

tccgtgctag cggatcccga ggagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg 120

tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 180

gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac 240

gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 300

acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc 360

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 420

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 480

tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 540

gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 600

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 660

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 720

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaa 776

<210> 32

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (259)..(259)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 32

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Val Leu Ala Asp Pro Glu Glu Pro Lys Ser Cys
20 25 30

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
        35                  40                  45

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
    50                  55                  60

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
65                  70                  75                  80

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
                85                  90                  95

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
            100                 105                 110

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
        115                 120                 125

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
    130                 135                 140

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
145                 150                 155                 160

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
                165                 170                 175

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
            180                 185                 190

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
        195                 200                 205

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
    210                 215                 220

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
225                 230                 235                 240

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                245                 250                 255

Pro Gly Xaa
```

<210> 33

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 33
ggatcctctg gtggcggtgg ctcgggctcc ggaggaggtg ggtcgggtgg cggcgcggcc 60

gct 63

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016333 A3

(51) International Patent Classification[7]: A61K 39/00

(21) International Application Number: PCT/US02/26543

(22) International Filing Date: 21 August 2002 (21.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/934,060 21 August 2001 (21.08.2001) US

(71) Applicant: UNIVERSITY OF MARYLAND BIOTECHNOLOGY INSTITUTE [US/US]; Office of Research Admin./Tech. Dev., Suite 200, 701 E. Pratt Street, Baltimore, MD 21202 (US).

(72) Inventors: DEVICO, Anthony, L.; 4533 Peacock Avenue, Alexandria, VA 22304 (US). FOUTS, Timothy, R.; 7523 Swan Point Way, Columbia, MD 21405 (US). TUSKAN, Robert, G.; 1104 Roland Heights Avenue, Baltimore, MD 21211 (US).

(74) Agents: FUIERER, Marianne et al.; Intellectual Property/Technology Law, P.O. Box 14329, Research Triangle Park, NC 27709 (US).

(81) Designated States *(national)*: 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, KR, 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, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
31 July 2003

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.

WO 03/016333 A3

(54) Title: VIRUS COAT PROTEIN/RECEPTOR CHIMERAS AND METHODS OF USE

(57) Abstract: The invention relates to chimeric molecules comprising a virus coat sequence and a receptor sequence that can inter-act with each other to form a complex that is capable of binding a co-receptor. Such chimeric molecules therefore exhibit functional properties characteristic of a receptor-coat protein complex and are useful as agents that inhibit virus infection of cells due to occupancy of a co-receptor present on the cell. In particular aspects, the chimeric polypeptide includes an immunodeficiency virus envelope polypeptide, such as that of HIN , SN, FIV, FeL V, FPV and herpes virus. Receptor sequences suitable for use in a chimeric polypeptide include, for example, CD4 DID2 and CD4M9 sequences.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/26543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 39/00
US CL : 424/185.1
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)
U.S. : 424/185.1; 192.1, 199.1, 207.1, 208.1; 435/ 69.7; 536/23.4, 23.5, 23.72

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)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POUTS et al. Expression and characterization of a single-chain polypeptide analogue of the human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 receptor complex. Journal of Virology. December 2000, Vol. 74, No. 24, pages 11427-11436, see entire document.	1-11
X	US 5,518,723 A (DEVICO et al.) 21 May, 1996 (21.05.1996), see claims.	1, 5, 6, 8, 9
---		---
Y		3, 4, 7, 10, 11
X	US 5,843,454 A (DEVICO et al.) 01 December 1998(01.12.1998), see claims.	1, 5, 6, 8, 9
---		---
Y		3, 4, 7, 10, 11
Y	GERSHONI et al. HIV binding to its receptor creates specific epitopes for the CD4/lgp120 complex. FASEB Journal. September 1993, Vol. 7, pages 1185-1187. see	1, 5, 6, 8
Y	US 5,925,741 A (GERSHONI et al.) 20 July 1999 (20.07.1999), see example 1.	1, 5, 6, 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 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	Date of mailing of the international search report
18 November 2002 (18.11.2002)	08 JAN 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231	Authorized officer Ulrike Winkler, Ph.D. for
Facsimile No. (703)305-3230	Telephone No. 703-308-0196

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/26543

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts 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. ☐ Claim 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 Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ 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.: 1-11 as they read on SEQ ID NO: 2, 4, 6 and 13

4. ☐ 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
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/26543

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1-16 (partial), drawn to a chimeric polypeptide comprising a truncated viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on the amino acid sequence as set out in SEQ ID NO: 13, which comprises SEQ ID 28, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 2, claim(s) 1-6, 8-16 (partial), drawn to a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on the amino acid sequence as set out in SEQ ID NO: 2, which comprises SEQ ID 24, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 3 claim(s) 1-6, 8-16 (partial), drawn to a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on the amino acid sequence as set out in SEQ ID NO: 4, which comprises SEQ ID 30, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 4, claim(s) 1-6, 8-16 (partial), drawn to a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on the amino acid sequence as set out in SEQ ID NO: 6, which comprises SEQ ID 30, 20 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 5, claim(s) 1, 5, 10-16 (partial), drawn to a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on SIV.

Group 6, claim(s) 1, 5, 10-16 (partial), drawn to a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on FIV.

Group 7, claim(s) 1, 5, 10-16 (partial), drawn to a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on FeLV.

Group 8, claim(s) 1, 5, 10-16 (partial), drawn to a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on FPV.

Group 9, claim(s) 17-22 (partial), drawn to a polynucleotide encoding a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on the nucleic acid sequence as set out in SEQ ID NO: 1, which comprises SEQ ID 23, 25 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 10, claim(s) 17-22 (partial), drawn to a polynucleotide encoding a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on the nucleic acid sequence as set out in SEQ ID NO: 3, which comprises SEQ ID 29, 25 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 11, claim(s) 17-22 (partial), drawn to a polynucleotide encoding a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on the nucleic acid sequence as set out in SEQ ID NO: 5, which comprises SEQ ID 29, 19 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 12, claim(s) 17-22 (partial), drawn to a polynucleotide encoding a chimeric polypeptide comprising a truncated viral coat protein and a viral receptor, as the claims read on the nucleic acid sequence as set out in SEQ ID NO: 12, which comprises SEQ ID 28, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 13, claim(s) 23-33 (partial), drawn to an antibody recognizing the polypeptide set out in SEQ ID NO: 13, which comprises SEQ ID 28, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/26543

Group 14, claim(s) 23-33 (partial), drawn to an antibody recognizing the polypeptide set out in SEQ ID NO: 2, which comprises SEQ ID 24, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 15, claim(s) 23-33 (partial), drawn to an antibody recognizing the polypeptide set out in SEQ ID NO: 4, which comprises SEQ ID 30, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 16, claim(s) 23-33 (partial), drawn to an antibody recognizing the polypeptide set out in SEQ ID NO: 6, which comprises SEQ ID 30, 20 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 17, claim(s) 34-44 (partial), drawn to a method of producing an antibody against the polypeptide set out in SEQ ID NO: 13, which comprises SEQ ID 28, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 18, claim(s) 34-44 (partial), drawn to a method of producing an antibody against the polypeptide set out in SEQ ID NO: 2, which comprises SEQ ID 24, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 19, claim(s) 34-44 (partial), drawn to a method of producing an antibody against the polypeptide set out in SEQ ID NO: 4, which comprises SEQ ID 30, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 20, claim(s) 34-44 (partial), drawn to a method of producing an antibody against the polypeptide set out in SEQ ID NO: 6, which comprises SEQ ID 30, 20 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 21, claim(s) 45-54 (partial), drawn to a method of identifying an agent that inhibit the interaction between a virus and a receptor or a coreceptor using the chimeric polypeptide set out in in SEQ ID NO: 13, which comprises SEQ ID 28, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 22, claim(s) 45-54 (partial), drawn to a method of identifying an agent that inhibit the interaction between a virus and a receptor or a coreceptor using the chimeric polypeptide set out in SEQ ID NO: 2, which comprises SEQ ID 24, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 23, claim(s) 45-54 (partial), drawn to a method of identifying an agent that inhibit the interaction between a virus and a receptor or a coreceptor using the chimeric polypeptide set out in SEQ ID NO: 4, which comprises SEQ ID 30, 26 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

Group 24, claim(s) 45-54 (partial), drawn to a method of identifying an agent that inhibit the interaction between a virus and a receptor or a coreceptor using the chimeric polypeptide set out in SEQ ID NO: 6, which comprises SEQ ID 30, 20 and the spacer of SEQ ID NO: 11.

The inventions listed as Groups 1-24 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The technical feature linking groups 1-24 appears to be a chimeric polypeptide comprising a viral coat protein and a viral receptor. The reference of Fouts et al. (Journal of Virology, Dec 2000, Vol. 74, No. 24, pages 11427-11436) discloses a chimeric polypeptide of SEQ ID NO: 13. Therefore, the technical feature linking the inventions of groups 1-24 does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art.

The special technical feature of groups 1-8 are polypeptide chimeras which lack a common core structure, one from another.

The special technical feature of groups 9-12 are the nucleic acid sequences of SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 12 which lack a common core structure, one from another.

The special technical feature of groups 13-17 are the antibodies that recognize the structures set out in SEQ ID NO: 13, 2, 4 and 6 which lack a common a common core structure, lack a common property or a common activity.

The polypeptide of groups 1-8, the polynucleotides of groups 9-12 and the antibodies of groups 13-17 lack a common core structure, common properties or a common activity, one from another.

The special technical feature of groups 18-21 are methods of raising antibodies that recognize the distinct structures set out in SEQ ID NOs: 13, 2, 4 and 6.

The special technical feature of groups 22-24 are methods of identifying agents that disrupt the interaction of the virus and the receptor or coreceptor using the chimeras set out in SEQ ID NOs: 13, 2, 4 and 6.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/26543

Accordingly, groups 1-24 are not so linked by the same or corresponding technical feature as to form a single general inventive concept.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, STN BIOSIS MEDLINE EMBASE, STIC sequence search.
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 13, chimera, CD4, HIV, gp120, virus coat, virus receptor, fusion protein.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｐ 31/12		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ 31/12	Ａ６１Ｐ 31/18		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ 31/18	Ｃ０７Ｋ 14/005		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ 14/005	Ｃ０７Ｋ 14/705		
Ｃ０７Ｋ 14/705	Ｃ０７Ｋ 16/08		
Ｃ０７Ｋ 16/08	Ｃ０７Ｋ 16/28		
Ｃ０７Ｋ 16/28	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｑ 1/02		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｑ 1/70		
Ｃ１２Ｑ 1/02	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ 1/70	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｂ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,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,KR,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,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 デビコ，アンソニー，エル.
アメリカ合衆国，バージニア州 ２２３０４，アレクサンドリア，ピーコック アベニュー ４５３３
(72)発明者 フォウツ，ティモシー，アール.
アメリカ合衆国，メリーランド州 ２１４０５，コロンビア，スワン ポイント ウェイ ７５２３
(72)発明者 トゥスカン，ロバート，ジー.
アメリカ合衆国，メリーランド州 ２１２１１，バルチモア，ローランド ハイツ アベニュー １１０４

Ｆターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 AA20 BA32 BA63 CA02 CA07 CA20 DA03 EA04 GA13 GA27 HA01 HA17 HA20
4B063 QA05 QA13 QQ21 QQ41 QQ61 QQ79 QQ89 QQ91 QR48 QR77 QR79 QS36
4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA93X AA93Y AA97Y AB01 AC14 AC20 BA02 BA05 BA24 BA30 CA24 CA43 CA44 CA45 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 NA14 ZB33 ZC55
4C085 AA03 AA14 CC21 CC23 EE01
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB33 ZC55
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 CA05 CA40 DA50 DA75 DA86 EA22 EA29 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	病毒外壳蛋白/受体嵌合体和使用方法		
公开(公告)号	JP2005503147A	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2003521255	申请日	2002-08-21
申请(专利权)人(译)	马里兰生物技术研究所的大学		
[标]发明人	デビコアンソニーエル フォウツティモシーアール トゥスカンロバートジー		
发明人	デビコ,アンソニー,エル. フォウツ,ティモシー,アール. トゥスカン,ロバート,ジー.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/12 A61P31/18 C07K14/005 C07K14/155 C07K14/16 C07K14/705 C07K14/73 C07K16/08 C07K16/10 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/62 C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/005 A61K38/00 A61K39/00 C07K14/70514 C07K16/1063 C07K16/2812 C07K2317/34 C07K2319/00 C07K2319/30 C07K2319/32 C07K2319/40 C07K2319/41 C07K2319/735 C12N15/62 C12N2740/15022 C12N2740/16122 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/00.H A61K39/395.N A61K48/00 A61P31/12 A61P31/18 C07K14/005 C07K14/705 C07K16/08 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA32 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/GA27 4B024/HA01 4B024/HA17 4B024/HA20 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QS36 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA97Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BA24 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/NA14 4C084/ZB33 4C084/ZC55 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB33 4C086/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/CA05 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	田中 克郎		
优先权	09/934060 2001-08-21 US		
其他公开文献	JP4500541B2 JP2005503147A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及包含病毒外壳序列和能够彼此相互作用并形成能够结合共同受体的复合物的受体序列的嵌合分子。因此，这种嵌合分子显示出受体外壳蛋白复合物特有的功能特性，并且可用作抑制由于细胞上存在的共同受体的占据而导致的细胞病毒感染的物质。在特定实施方案中，嵌合多肽包括免疫缺陷病毒包膜多肽，例如HN，SN，FIV，FeL，V，FPV和疱疹病毒病毒。适用于嵌合多肽的受体序列包括例如CD4 DID2序列和CD4 M9序列。

受容体 （結合サブユニット）	ウイルス（科）	文献
免疫グロブリン様分子		
VCAM−1	EMC−D（ピコルナウイルス科）	フーバー（Huber）（1994年）
［CAM−1］（第1ドメイン）	大群 HRV、CAV 13、18、および 21 （ピコルナウイルス科）	コロノ（Colonno）ら（1986 年） グリーブ（Greve）ら（1989 年） スタウトン（Stauton）ら（1989 年） トマシーニ（Tomassini）ら（1989 年）
PVR（第1ドメイン）	ポリオウイルス （ピコルナウイルス科） （1989 年）	コイケ（Koike）ら（1990 年） メンデルスオトム（Mendelsotm）ら （1989 年）
CD4（第1ドメイン）	HIV−1、2；SIV （レンチウイルス科） ヒトヘルペスウイルス 7	ダイグレイシュ（Daigleish）ら（1984 年）； クラッツマイム（Klatzmaim）ら（1984 年） ルッソ（Lusso）ら（1994 年）
CEA、数種の構成メンバー （第1ドメイン）	マウス肝炎ウイルス （コロナウイルス科）	ウイリアムズ（Williams）ら（1978 年）
MHCI	セムリキ森林ウイルス （トガウイルス科） 乳酸脱水素酵素ウイルス マウスサイトメガトウイルス （ヘルペスウイルス科） SV−40	ヘテニウス（Hetenius）ら（1978 年） オトドストーン（Otdstone）（1980 年） イナダ（Inada）とミムス（Mims）（1984 年） ワイクス（Wykes）ら（1993 年） ブリュー（Breau）ら（1992 年）
MHCII	ビスナウイルス （レンチウイルス科）	ダルツィール（Dalziel）ら（1991 年）
インテグリン		
VLA−2（α鎖）	エコー（ECHO）ウイルス 1、8 （ピコルナウイルス科）	ベルゲルソン（Bergelson）ら （1992 年、1993 年）
（RGD結合タンパク質）	FMDV （ピコルナウイルス科）	フォックス（Fox）ら（1989 年） メイスン（Mason）ら（1994 年）
αvβ3（ビブロネクチン）	CAV9、エコーウイルス 1、8 （ピコルナウイルス科）	ロイバイネン（Roivainen）ら（1994 年）
輸送タンパク質		
リン酸輸送 類似体	テナガザル白血病ウイルス （レトロウイルス科） 両種性マウス （レトロウイルス科）	ヨハン（Johann）ら（1992 年） ミラー（Milelr）ら（1994 年）
陽イオン性アミノ酸 輸送体	エコトロピックマウス 白血病ウイルス （レトロウイルス科）	アルブリットン（Albritton）ら（1989 年）