

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-284442

(P2007-284442A)

(43) 公開日 平成19年11月1日(2007.11.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/295 (2006.01)	A 6 1 K 39/295	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12 1 7 1	
審査請求 有 請求項の数 66 O L (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-121532 (P2007-121532)	(71) 出願人	500228159
(22) 出願日	平成19年5月2日(2007.5.2)		ユニバーシティ・オブ・フロリダ・リサーチ・ファンデーション・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願平9-510430の分割		アメリカ合衆国、フロリダ州 3 2 6 1 1
原出願日	平成8年8月23日(1996.8.23)		、ゲインズビル、グリンター・ホール 2 2 3
(31) 優先権主張番号	08/519,386	(71) 出願人	502045699
(32) 優先日	平成7年8月25日(1995.8.25)		リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フランク リンストリート 1 1 1 1, トゥエルフス フロア
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 多種サブタイプFIVワクチン

(57) 【要約】

【課題】多種サブタイプFIVワクチンを用いて、広範囲のFIV株による感染からネコを守るための新規の方法および組成物に関する。

【解決手段】無細胞ウイルス全体またはウイルス感染細胞株のいずれかを含む多種サブタイプFIVワクチンについて記述する。本ワクチン組成物によるネコのワクチン接種法についても記述する。本発明の方法および組成物に従ってワクチン接種したネコは、同種または異種FIV株でチャレンジした場合、FIVに対して防御的液性および細胞性免疫反応を示す。本発明はまた、FIV易感染性である新規のネコ科細胞株およびその利用法にも関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

FIV感受性動物において複数のFIVサブタイプに対して免疫反応を誘発することが可能なFIV免疫源を含むワクチン組成物。

【請求項2】

組換えウイルスベクターFIV構築物、多種FIVサブタイプに由来するFIVポリペプチド、多種の無細胞FIVウイルス全体、およびそれぞれが異なるFIVサブタイプ由来のFIV株に感染している多種の細胞株からなる群より選択される、請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項3】

ワクチンを宿主動物に投与する前に、FIVウイルスまたはFIV感染細胞株を、該ウイルスまたは該細胞株が不活化されるよう処置する、請求項2記載のワクチン組成物。 10

【請求項4】

ワクチンを宿主動物に投与する前に、FIVウイルスまたはFIV感染細胞株を、該ウイルスまたは該細胞株が弱毒化されるよう処置する、請求項2記載のワクチン組成物。

【請求項5】

複数のFIVサブタイプに対して免疫反応を誘発することが可能なワクチン組成物の有効量を宿主に投与することを含む、感受性宿主動物においてFIV感染に対する防御的免疫反応を誘導する方法。

【請求項6】

ワクチン組成物が、組換えウイルスベクターFIV構築物、多種FIVサブタイプに由来するFIVポリペプチド、多種の無細胞FIVウイルス全体、およびそれぞれが異なるFIVサブタイプのFIV株に感染している多種の細胞株からなる群より選択される、請求項5記載の方法。 20

【請求項7】

FIVウイルスまたはFIV感染細胞株が、ワクチンを宿主動物へ投与する前に、不活化されるよう処置される、請求項6記載の方法。

【請求項8】

FIVウイルスまたはFIV感染細胞株が、ワクチンを宿主動物へ投与する前に、弱毒化されるよう処置される、請求項6記載の方法。

【請求項9】

FIVサブタイプが、サブタイプA、B、CおよびDからなる群より選択される、請求項5記載の方法。 30

【請求項10】

少なくとも一次免疫が組換えウイルスベクターFIV構築物を投与することを含み、その後、組換えウイルスベクターFIV構築物、FIVポリペプチド、無細胞FIVウイルス全体、およびFIV感染細胞株からなる群より選択されるワクチン組成物で追加免疫が行われる、請求項5記載の方法。

【請求項11】

細胞株が、少なくとも1つのFIVサブタイプによる注射に感受性であり、該FIVサブタイプが、サブタイプA、B、CおよびDからなる群より選択される、ネコ科由来T細胞株。

【請求項12】

FeT-1Cと称される、請求項11記載の細胞株。 40

【請求項13】

細胞株が、FIV_{Dix}、FIV_{UK8}、FIV_{Bang}、FIV_{Aom1}、FIV_{Aom2}、FIV_{Pet}、およびFIV_{Shi}からなる群より選択されるFIVウイルス株の少なくとも1つに感染する、請求項11記載の細胞株。

【請求項14】

IL-2非依存的である、請求項11記載の細胞株。

【請求項15】

FIV_{Dix}、FIV_{UK8}、FIV_{Bang}、FIV_{Aom1}、FIV_{Aom2}、FIV_{Pet}、およびFIV_{Shi}からなる群より選択されるFIVウイルス株の少なくとも1つに感染する、請求項14 50

記載の細胞株。

【請求項16】

FeT-Jと称される、請求項14記載の細胞株。

【請求項17】

試料をFIVに接触させ、次に請求項10記載の細胞株を該試料中で有効な時間培養し、該細胞を新鮮な培養培地で培養し、次に該培養培地中の逆転写酵素活性量を定量することを含む、試料中のFIVウイルス中和抗体の検出または定量法。

【請求項18】

細胞株が、FeT-1CおよびFeT-Jと称される細胞株からなる群より選択される、請求項17記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は米国国立衛生研究所助成金番号NIH AI30904による助成を受けた研究プロジェクトの下で政府の支援を受けて行われた。米国政府は本発明に一定の権利を保有する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

飼いネコは、ネコ白血病ウイルス (FeLV)、ネコ肉腫ウイルス (FeSV)、内因型C型オンコウイルス (RD-114)、およびネコ合胞体形成ウイルス (FeSFV) を含むいくつかのレトロウイルスによる感染症にかかりやすい。これらの中で、FeLVは最も重要な病原体で、リンパ網内系および骨髄新生物、貧血、免疫媒介疾患、ならびにヒト後天性免疫不全症候群 (AIDS) と同様の免疫不全症候群を含む多様な症状を引き起こす。最近では、FeLV-AIDSと呼ばれる特定の複製欠損FeLV変異株が免疫抑制特性により一層関連している。

20

【0003】

ネコTリンパ球親和性レンチウイルス (現在では、ネコ免疫不全ウイルス、FIVと呼ばれる) の発見は、ペダーセンら (非特許文献1) によって最初に報告された。FIVの特徴は、ヤマモトら (非特許文献2) ; ヤマモトら (非特許文献3) ; およびアックリーら (非特許文献4) において報告されている。血清疫学的データにより、FIV感染が世界中の飼いネコおよび野生のネコに固有であることが示された。流産、脱毛、貧血、結膜炎、慢性鼻炎、腸炎、歯肉炎、血便排泄、神経異常、歯周炎、および脂漏性皮膚炎を含む広く多様な症状は、FIVによる感染症に関連する。FIVに感染した飼いネコの顕著な免疫学的特徴は、ネコのCD4⁺末梢血リンパ球の慢性的および進行性枯渇、CD4:CD8細胞比の低下、およびいくつかの症例ではCD8保有リンパ球の増加である。分子、生化学、および免疫病理学的特徴に基づき、ネコのFIV感染症は今や、FeLV-FAIDSより良いネコのAIDSモデルであると思われる。

30

【0004】

FIVのクローニングおよび配列分析は、オルムステッドら (非特許文献5) ; オルムステッドら (非特許文献6) ; およびタルポットら (非特許文献7) において報告されている。ホージー & ジャレット (非特許文献8) は、FIVに感染したネコの血清学的反応について記述している。FIVウイルスサブタイプは、それぞれの株によって誘発された交叉中和抗体の濃度に基づく免疫型に従って分類することができる (マーフィー & キングスバリー (非特許文献9))。近年、ヌクレオチド配列の相同性に基づく遺伝子型に従って、ウイルスがサブタイプに分類された。HIVおよびFIVサブタイプ分類は遺伝子型に基づくが (ソドラら (非特許文献10) ; リグビーら (非特許文献11) ; およびルワジーら (非特許文献12))、サブタイプの遺伝子型と免疫型の間の相関に関してはほとんどわかっていない。FIVウイルス単離体は現在、4つのFIVサブタイプに分類されている: A、B、CおよびD (カキヌマら (非特許文献13))。感染性単離体および感染性分子クローンは、サブタイプCを除く全てのFIVサブタイプについて記述されている (ソドラら (非特許文献10))。サブタイプCのFIVは、カナダのネコの細胞DNAから唯一同定されている (ソド

40

50

ラら（非特許文献10）；リグビーら（非特許文献11）；カキヌマら（非特許文献13））。

【0005】

FIVワクチンを開発する上で主に難しい点は、異なるサブタイプまたはクレードからのフィールド単離体を含む広範囲のFIV株に対して有効なワクチンアプローチを特定することであった。FIVに対するワクチン予防は、単一株のワクチンを用いた場合、同種およびわずかに異種の株に対しては予防できたが、中程度から大きく異なる種の株によるチャレンジでは予防できない（ジョンソンら（非特許文献14）；ヤマモトら（非特許文献15））。したがって、依然として多数のFIVサブタイプから防御することのできるワクチンが必要とされている。

10

【0006】

【非特許文献1】Pedersen, N.C., E.W. Ho, M.L. Brown, J.K. Yamaoto (1987) "Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome," *Science* 235:790-793

【非特許文献2】Yamamoto, J.K., N.C. Pedersen, E.W. Ho, T. Okuda, G.H. Theilen (1988a) "Feline immunodeficiency syndrome - a comparison between feline T-lymphotropic lentivirus and feline leukemia virus," *Leukemia*, December Supplement 2: 204S-215S.

【非特許文献3】Yamamoto, J.K., E. Sparger, E.W. Ho, P.H. Andersen, T.P. O'Connor, C.P. Mandell, L. Lowenstine, N.C. Pedersen (1988) "Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats," *Am. J. Vet. Res.* 49:1246-1258.

20

【非特許文献4】Ackley, C.D., J.K. Yamamoto, N.B. Levy, N.C. Pedersen, M.D. Cooper (1990) "Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus," *J. Virol.* 64:5652-5655.

【非特許文献5】Olmsted, R.A., A.K. Barnes, J.K. Yamamoto, V.M. Hirsch, R.H. Purcell, P.R. Johnson (1989) "Molecular cloning of feline immunodeficiency virus," *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86:2448-2452

【非特許文献6】Olmsted, R.A., V.M. Hirsch, R.H. Purcell, P.R. Johnson (1989) "Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: Genome organization and relationship to other lentivirus," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8088-8092.

30

【非特許文献7】Talbot, R.L., E.E. Sparger, K.M. Lovelace, W.M. Fitch, N.C. Pedersen, P.A. Luciw, J.H. Elder (1989) "Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5743-5747.

【非特許文献8】Hosie, M.J., O. Jarrett (1990) "Serological responses of cats to feline immunodeficiency virus," *AIDS* 4:215-220.

【非特許文献9】Murphy, F., D.W. Kingsbury (1990) "Virus Taxonomy," In *Fields Virology*, 2nd Ed., B.N. Fields, D.M. Knipe et al., eds, Raven Press, New York, Chapter 2, pp. 9-36.

40

【非特許文献10】Sodora, D.L., E.G. Shpaer, B.E. Kitchell, S.W. Dow, E.A. Hoover, J.I. Mullins (1994) "Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtype and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns," *J Virol.* 68:2230-2238.

【非特許文献11】Rigby, M.A., E.C. Holmes, M. Pistello, A. Mackay, A.J. Leigh-Brown, J.C. Neil (1993) "Evolution of structural proteins of feline immunodeficiency virus: molecular epidemiology and evidence of selection for change," *J. Gen. Virol.* 74:425-436.

【非特許文献12】Louwagie, J., F.E. McCutchan, M. Peeters, T.P. Brennan, E. Sanders-Buell, G.A. Eddy, G. van den Groen, K. Fransen, G.M. Gershy-Damet, R. Dele

50

ys, D.S. Burke (1993) "Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes," AIDS 7:769-780.

【非特許文献 1 3】Kakinuma, S., K. Motokawa, T. Hohdatsu, J.K. Yamamoto, H. Koyama, H. Hashimoto (1995) "Nucleotide Sequence of Feline Immunodeficiency Virus: Classification of Japanese Isolates into Two Subtypes Which Are Distinct from Non-Japanese Subtypes," Journal of Virology 69(6):3639-3646.

【非特許文献 1 4】Johnson, C.M., B.A. Torres, H. Koyama, J.K. Yamamoto (1994) "FIV as a model for AIDS vaccination," AIDS Res. Hum. Retroviruses 10:225-228.

【非特許文献 1 5】Yamamoto, J.K., T. Hohdatsu, R.A. Olmsted, R. Pu, H. Louie, H. Zochlinski, V. Acevedo, H.M. Johnson, G.A. Soulds, M.B. Gardner (1993) "Experimental vaccine protection against homologous and heterologous strains of feline immunodeficiency virus," J. Virol. 67:601-605. 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明の簡単な概要

本発明は、宿主動物におけるFIV感染症に対して広範囲の防御的免疫を誘発するワクチンに関する。特に、本発明は異なるFIVサブタイプから単離された無細胞ウイルス単離株、またはそれぞれが異なるサブタイプの異なるプロトタイプFIVウイルスに感染した細胞株の組み合わせ、を用いて調製される多種サブタイプFIVワクチンに関する。本発明のFIV 20
ワクチンを接種したネコは、同種および異種FIV株に対して液性および細胞性の免疫反応を引き起こす。

【0008】

本発明はまた、多種のFIVサブタイプに易感染性である新規のネコ科細胞株にも関する。本発明の細胞株は、本発明の方法によるFIVワクチンにおける使用と共に、多種のFIVサブタイプの増殖および産生に有用である。さらに、本細胞株はまた、ネコ抗血清のFIVウイルス中和アッセイにおいてネコ末梢血単核球(PBMC)の代わりに用いることができる。

【0009】

配列の簡単な説明

配列番号：1は、SV-V3-2と呼ばれるFIV表面エンベロープペプチドのアミノ酸配列である。 30

配列番号：2は、TM-C1と呼ばれるFIV膜通過ペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：3は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：4は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：5は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：6は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：7は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：8は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：9は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：10は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。 40

配列番号：11は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：12は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：13は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：14は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：15は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号：16は、FIV PCRプライマーのヌクレオチド配列である。

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の詳細な開示

本発明は、感受性宿主動物におけるFIV感染症に対する防御的免疫の誘導に有用な新規 50

の方法およびワクチン組成物に関する。本明細書に記載のワクチン組成物は、宿主動物に投与すると、FIVの同種および異種株による感染症に対して防御的液性および細胞性免疫反応を誘導する。ワクチン組成物は、無細胞FIVウイルス単離株を含んでいてもFIV-感染細胞株を含んでいてもよい。好ましい態様において、本発明のワクチン組成物は、異なる2つのFIVサブタイプからのFIV株を含む。好ましくは、ワクチン組成物は、各株が異なるFIVサブタイプである3つのFIV株を含む。より好ましくは、FIVサブタイプA、サブタイプBおよびサブタイプDのそれぞれから少なくとも1つのFIV株がワクチン組成物に含まれる。

【0011】

特定の態様において、ワクチン組成物はFIV_{P e t}-およびFIV_{S h i}-感染細胞株を含む。もう一つの態様において、ワクチン組成物はFIV_{P e t}-、FIV_{B a n g}-、およびFIV_{S h i}-感染細胞株を含む。FIVサブタイプの全てまたは一部を表すその他のFIV株の使用は、本発明において特に企図される場所である。例えば、FIVサブタイプAプロトタイプウイルスを提供する目的で、FIV_{D i x}またはFIV_{U k 8}をFIV_{P e t}に加えて、またはFIV_{P e t}の代わりに、ワクチン組成物に含めることができる。FIVサブタイプBおよびDプロトタイプウイルスに関して、その他のFIV株による同様の追加または置換を行うことができる。

【0012】

本明細書に記載のように、本明細書のワクチン組成物は、FIV感染細胞株、または無細胞ウイルスおよび感染細胞株の組み合わせと共に、無細胞ウイルス全体、またはウイルス、FIV蛋白質およびポリペプチドの一部を含んでいてもよい。FIV感染細胞株からなるワクチン組成物は、それぞれが異なるFIVサブタイプに感染した多数の細胞株を含んでいてもよい。本発明のワクチン組成物はまた、例えばFIV env、gag/pro、またはenv-gag/proを含む組換えウイルスベクターに基づくFIV構築物を含む。組換え型ベクター/FIV構築物を調製するために用いることができるいかなる適当なウイルスベクターも、本発明での使用が企図される。例えば、アデノウイルス、鳥類ポックスウイルス、ネコヘルペスウイルス、ワクシニア、カナリアポックス、昆虫ポックス、ブタポックス、および当技術分野で既知のその他のウイルスに由来するウイルスベクターを、本発明の組成物および方法と共に用いることができる。FIV成分をコードし発現する組換えポリヌクレオチドベクターは、当技術分野で既知の標準的な遺伝子操作技術を用いて構築することができる。さらに、本明細書に記載の様々なワクチン組成物は、個別に用いることも、互いに組み合わせて用いることもできる。例えば、動物の一次免疫には、単一または複数のサブタイプ成分を有する、組換えベクターに基づくFIV構築物を用い、二次免疫には不活性化FIV-感染細胞株からなるワクチン組成物を用いてもよい。本発明のワクチン組成物によるその他の免疫プロトコルは、当業者には明らかで、本発明の範囲内であると企図される。

【0013】

本明細書に特に記載された多種サブタイプFIVワクチンのネコにおける免疫原性および有効性を調べた。本ワクチン組成物でワクチン接種した特定病原体非保有(SPF)ネコの、同種および異種FIV株によるチャレンジ前後の液性および細胞性免疫をモニターした。液性免疫は、ウイルス中和(VN)抗体活性の測定によってモニターし、細胞性免疫は細胞障害性Tリンパ球(CTL)活性の測定によってモニターした。ワクチン接種ネコの血清および免疫細胞の同種および異種FIV株に対するVNおよびCTL活性をそれぞれインビトロで試験し、本ワクチンがFIV感染に対する広範囲の防御を誘発できることを証明した。本発明の指示に従い、異なるFIVサブタイプからのプロトタイプウイルス単離株を組み合わせることによって、または異なるサブタイプのプロトタイプウイルスに感染させた個々の細胞を組み合わせることによって、有効な多種サブタイプFIVワクチンを産生することができる。

【0014】

本明細書に特に例示した株に加えて全てのFIV株は、本発明での使用が企図される。多くのFIV単離株が文献に記述されており、当業者に既知である。FIV_{P e t}は米国特許第5,

037,753号に記述されている。記述されているその他のFIV単離体は、当業者によって定法を用いて感染したネコから容易に単離することができる。FIVの単離および培養法は、参照として本明細書に組み入れられる米国特許第5,037,753号および第5,118,602号に記述されている。

【0015】

本明細書に例示されている新規の細胞株は、本発明のワクチン接種法および組成物において用いることができる。末梢血単核細胞を含むFIV株易感染性のその他の細胞または細胞株もまた、本発明での使用が企図される。

【0016】

FIVウイルス蛋白質の天然ポリペプチド、組換えポリペプチドまたは合成ポリペプチド、およびそのペプチド断片もまた、本方法によるワクチン組成物として用いることができる。好ましい態様において、多種のFIVサブタイプに由来するFIVポリペプチドをワクチン組成物に結合させ、これを用いて宿主動物にワクチン接種する。例えば、異なるサブタイプからの少なくとも2つのプロトタイプFIV株からのFIVエンベロープ糖蛋白質に基づくポリペプチドをワクチンに組み合わせることができる。ポリペプチドは一つの株に対して同種であってもよく、そのアミノ酸配列が少なくとも2つの明確なFIVサブタイプからの接合または結合ポリペプチドに由来する「ハイブリッド」または「キメラ」ポリペプチドを含むものであってもよい。FIVポリペプチドの調製手順は当業者に周知である。例えば、FIVポリペプチドは固相合成法を用いて合成することができる(メリフィールド(Merrifield)、1963)。FIVポリペプチドはまた、FIV蛋白質またはペプチドをコードするポリペプチド分子が、細菌、酵母、または哺乳類細胞株などの宿主細胞で発現されるよう、DNA組換え技術を用いて産生することができ、当技術分野の標準的な技術を用いて発現した蛋白質を精製することができる。

【0017】

本発明はまた、FIVに対して易感染性である新規のネコ科T細胞株にも関する。インターロイキン-2(IL-2)依存的細胞および非依存的細胞の両者を特に例示する。FeT-1CおよびFeT-Jと呼ばれる細胞株を本明細書に記述する。FeT-1C細胞株はIL-2依存的であり、FeT-J細胞株はIL-2非依存的である。本発明の細胞株は、インビトロでのFIVウイルス株の増殖および産生と共に、ネコのFIV免疫の媒体を提供するのに有用である。IL-2依存的FeT-1CおよびIL-2非依存的FeT-J非感染細胞株をいずれも培養液中の逆転写酵素(RT)活性についておよびPCRによるFIVプロウイルス配列について20回以上試験し、FIV陰性であることを確認した。FeT-J細胞株は、FIV_{S h i}、FIV_{D i x}、FIV_{U k g}、FIV_{P e t}およびFIV_{B a n g}を含む調べた全てのFIV株に高度に感染可能であったが、FIV_{S h i}に直接感染させることはよ比較的困難であった。

【0018】

本発明はさらに、本発明の細胞株によって産生された細胞性産物にも関する。細胞性産物は当業者に既知の方法を用いて単離および検出することができる。細胞株に対する抗体は、既知の方法を用いて産生させることができ、本発明に企図される。

【0019】

FeT-1C(ATCC寄託番号CRL 11968)、およびFeT-J(ATCC寄託番号CTL 11967)と呼ばれるFIV非感染細胞株はいずれも、1995年8月24日に、米国メリーランド州ロックビルのアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)に寄託された。FIV_{B a n g}-(ATCC寄託番号11975)およびFIV_{S h i}-(ATCC寄託番号11976)感染細胞株は、1995年8月25日にアメリカンタイプカルチャーコレクションに寄託された。

【0020】

本培養物は、本特許出願の係属中、特許庁長官により37 CFR 1.14および35 U.S.C.122の下で資格を与えられると決定された者は、寄託物を利用することができるよう保証される条件下で寄託されている。寄託物は、本出願の写しまたはその所産が提出されている国の外国特許法の要請に応じて利用することができるだろう。しかし、寄託物の利用は、政府の決定によって付与された特許権の適用の制限において本発明を実施する認可とはなら

ないことを理解すべきである。

【0021】

さらに、本培養寄託物は、微生物の寄託に関するブダペスト条約 (Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms) の要件に従って保存され、公的に利用可能となる、すなわち、寄託物は、寄託試料の最も最近の分譲請求から少なくとも5年間、そしていずれにしても、寄託日から少なくとも30年間、または培養物の開示が発行されるあらゆる特許の有効期間にわたって、細心の注意を払って保存され、汚染を免れる。寄託者は、寄託物の状態のために、寄託所が請求時に試料を分譲できない場合には、寄託物を交換する義務を理解している。本培養寄託物の公衆への利用可能性を制限するものは全て、これを開示する特許が付与された際に、変更不可能に取り除かれるであろう。

10

【0022】

本発明の方法によれば、本明細書に記載のFIVワクチン組成物は、易感染性宿主、典型的には飼いネコに有効な量および方法で投与され、その後のチャレンジまたはFIVによる宿主の感染に対する防御的免疫を誘導する。ワクチンは、例えば皮下、腹腔内、または筋肉内注射によって非経口的に投与されるのが一般的である。その他の適当な投与法は経口または鼻腔内投与である。通常、ワクチンは宿主に少なくとも2回、各投与間に1週間以上の間隔をあけて投与する。しかし、ワクチンの初回および追加投与に関するその他のレジメは企図されており、実施者の判断および処置する特定の宿主動物に依る。

【0023】

本発明のワクチン組成物は、当業者に周知の方法によって調製することができる。例えば、ワクチンは注射可能な形態、例えば溶液または懸濁液として調製することが一般的である。ワクチンは投与剤形と融和するように、受容者に治療的有効量かつ免疫誘発量で投与する。特定のワクチン製剤の至適投与量および投与パターンは、当業者によって容易に決定することができる。

20

【0024】

ワクチン製剤におけるウイルスおよび細胞は、当技術分野で既知の方法を用いて不活化または弱毒化してもよい。例えば、ウイルス全体および感染細胞をパラホルムアルデヒド、ホルマリン、フェノール、UV光線、温度上昇等に暴露することによって不活化または弱毒化することができる。ワクチン用量における無細胞FIV全体の量は通常、約0.1 mg~約5 mgの範囲内で、より通常は約0.2 mg~約2 mgの範囲内である。FIV感染細胞株からなるワクチン製剤の投与量は通常、約 10^6 ~ 約 10^8 細胞/用量であり、より一般的には 5×10^6 ~ 約 7.5×10^7 細胞/用量である。ウイルスまたは細胞は、投与直前にアジュバントと混合するのが一般的である。ワクチン製剤において用いられるアジュバントは、トレオニルムラミルジペプチド (MDP) (バイアーズら (Byars), 1987) またはフロイトの完全および不完全アジュバントの混合液のいずれかであることが一般的である。ミョウバンなどの、本発明の方法およびワクチンでの使用に適当なその他の多様なアジュバントは、当技術分野で周知であり、本発明での使用が企図される。

30

【0025】

本発明はさらに、本発明の非感染細胞株を用いて、試料中のウイルス中和 (VN) 抗体を解析する新規の方法にも関する。一定数の継代後に使用できなくなり、FeT-1CまたはFeT-J細胞ほど容易に増殖しないPBMCとは異なり、FeT-1CおよびFeT-J細胞は、確立された細胞株で、今後の使用のために容易に凍結保存することができる。異なるSPFネコから得られたPBMCは細胞増殖速度およびFIV易感染性が個々に異なるため、FeT-1C細胞を用いたVNアッセイから得られた結果は、PBMCを用いたVNアッセイより再現性が高い。さらに、VNアッセイ用のPBMCは、PBMCを用いたインビトロVNアッセイに影響を及ぼす可能性がある、起こりうるインビボ感染を排除するために、無菌室収容および維持を必要とするSPFネコから得なければならない。このように、異なるサブタイプのFIVに容易に感染させることが可能なFeT-1Cのようなネコ科細胞株は、VNアッセイにおいてPBMCの都合の良い代用とすることができる。

40

【0026】

50

本明細書では、FIV株について以下の略語を用いる：

株 (サブタイプ)	略語
Petaluma (A)	FIV _{P e t}
Dixon (A)	FIV _{D i x}
UK8 (A)	FIV _{U K 8}
Bangston (B)	FIV _{B a n g}
Aomori-1 (B)	FIV _{A o m 1}
Aomori-2 (B)	FIV _{A o m 2}
Shizuoka (D)	FIV _{S h i}

【0027】

10

材料および方法

細胞培養。全ての懸濁細胞株は10%熱不活化仔ウシ胎児血清 (FCS) を含むPRMI 1640培地で培養した。10 mM HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-n'-2-エタンスルホン酸)、2 mM L-グルタミン、50 μg/mlゲンタマイシンおよび 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール。IL-2依存的細胞にはヒト組換えIL-2 (Cetus Corporation、エメリービル、カリフォルニア) 100 U/mlを補足した。懸濁細胞は、 $0.5 \sim 4 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞濃度で継代し、週2回新鮮な培地で再度培養した。単層細胞は全て、細胞初濃度 2×10^6 細胞/mlで週2回継代した。FIV感染細胞からの組織培養液 (TCF) を週2回回収し、3000 rpmで1時間遠心して、残留細胞を除去し、試験時に直ちに使用する予定のTCFに関しては、-20 または -70 で保存した。FIV-易感染性細胞 (1×10^6 細胞/ml) は約30,000 cpm/mlの逆転写酵素 (RT) 活性を有するFIVに感染させた。

20

【0028】

FIVの精製。FIV感染細胞株の組織培養液は、個々に2000~3000 rpmで1時間遠心して細胞を除去した。TCF中のウイルスは16,000 rpmで2時間超遠心してペレットにし、まず10/50% (w/v) 不連続蔗糖勾配で、次に10/50%連続蔗糖勾配で超遠心して精製した (ペダーセンら (Pedersen)、1987; ヤマモトら (Yamamoto)、1988)。ウイルス単離株のそれぞれを18時間1.25%滅菌パラホルムアルデヒド (0.22 μm濾過滅菌) で不活化し、その後滅菌PBSで十分に透析した。不活化ウイルスは、滅菌PBSで500 μg/mlの濃度に希釈し、各株の250 μg/0.5 mlを滅菌マイクロフュージチューブに移して-70 で保存した。不活化FIV株は室温で解凍し、不活化ウイルス250 μgの0.5 ml滅菌PBS溶液を免疫直前にアジュバント0.5 mlと混合した。FIV-感染細胞株は、個別に18時間1.25%滅菌パラホルムアルデヒドで不活化し、滅菌PBSで3回洗浄し、滅菌チューブ中で約 5.0×10^7 細胞/mlの濃度に再懸濁して4 で保存した。典型的には、不活化感染細胞約 2.5×10^7 細胞/mlの0.5 ml PBS溶液を免疫直前にアジュバント0.5 mlと混合した。トレオニルムラミルジペプチド (MDP MF75.2アジュバント; Chiron Corporation、エメリービル、CA) 250 μg/0.5 mlをアジュバントとして用いた。

30

【0029】

CTLアッセイ。末梢血単核細胞 (PBMC) を、10日間のFIV感染前にコンカナバリンA (Con A) で3日間刺激した (ソングら (Song, 1992))。これらの細胞をCTLアッセイの標的細胞として用いた。CTL活性は、Con A刺激PBMCをUV-および放射線不活化FIV-感染自家PBM Cと共に5日間培養することによって生じた。これらの細胞を刺激エフェクター細胞として用いた。解析当日に標的細胞を $Na^{51}CrO_4$ 50 μCiで1~3時間標識して、3回洗浄し、次に固定数の標識標的細胞 (5×10^4 細胞/ウェル) をマイクロタイタープレートに加えた。エフェクター細胞を様々なエフェクター/標的細胞比 (例えば、100:1、50:1、および10:1) で3連ずつ加えた。プレートを400 rpmで1分遠心し、37 で4時間インキュベートした。対照 ^{51}Cr -標識標的細胞を洗浄剤で溶解し、最大放出値を得た。被験試料ウェルから上清を収集し、ガンマカウンターを用いて放射能を定量した。エフェクター細胞の非存在下で ^{51}Cr -標識標的細胞をインキュベートすることによって、自然発生放出を定量した。特異的細胞障害百分率は以下のように計算した：

40

【数 1】

$$\%細胞障害性 = (100) \frac{(\text{試験放出の平均cpm} - \text{自然放出の平均cpm})}{(\text{最大放出の平均cpm} - \text{自然放出の平均cpm})}$$

【0030】

イムノプロットおよび酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) ヤマモトら (Yamamoto, 1993) の記述のように、蔗糖勾配精製ウイルスをイムノプロットアッセイの基質として用いた。感染細胞の組織培養液からの FIV_{P_et} は低速遠心 (2000 rpm で 45 分) で不純物を除去し、超遠心 (16,000 rpm で 2 時間) によって濃縮し、10 / 50% (w / v) 連続蔗糖勾配上での超遠心によって精製した。この技法で精製したウイルスをイムノプロットアッセイの基質として用いた。 10

【0031】

これまでに記述されたイムノプロット技法 (ヤマモトら (Yamamoto), 1991a) の改変を用いた。ウイルスプロット片は、ウイルスを 0.1% SDS で可溶化し、その後 10% SDS ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、ニトロセルロース膜上に電気泳動的に移動させることによって調製した。ワクチン接種ネコからの血清試料を緩衝液 3 (0.15 M 塩化ナトリウム、0.001 M エジチ酸、0.05 M トリス塩基、0.05% ツイーン 20、および 0.1% ウシ血清アルブミン) で 1 : 50 に希釈し、イムノプロットプレートの個々のウェル中でウイルスプロット片と共に 37 °C で 18 時間インキュベートした。プロット片は洗浄液 (0.15 M NaCl および 0.05% ツイーン 20 脱イオン水溶液) で個々に洗浄し、ビオチン化抗ネコ IgG (Vector Laboratories、パーリングイム、CA) と共に 37 °C で 1 時間インキュベートし、洗浄液で 3 回洗浄した。次にプロット片を個々に、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン (ベクター・ラボラトリーズ) と共に 30 分インキュベートした。十分な洗浄後、各片を新鮮な基質溶液 (0.05% ジアミノベンジジン、400 μg / ml NiCl₂、および 0.01% H₂O₂ の 0.1 M トリス緩衝溶液、pH 7.4) と共に室温でインキュベートした。目に見えるバンドが確立した後、過剰量の蒸留水を加えて反応を停止させ、プロット片を乾燥させた。次に、イムノプロット上のバンドの分子量は、先にアミドブラックで染色した片上の分子量標準物質の移動距離とそれらの移動距離を比較して決定した。各イムノプロット分析には診断的評価の内部対照として陽性および陰性対照血清を含めた。 20 30

【0032】

ウイルス抗原特異的 ELISA は既に記述されている (ヤマモトら (Yamamoto), 1991a ; ヤマモトら (Yamamoto), 1993)。蔗糖勾配精製 FIV_{P_et} および表面エンベロープ (SU) ならびに FIV_{P_et} の保存 (C) および可変 (V) 領域双方の膜通過 (TM) ペプチドは、96 ウェルイムノロプレート (Dynatic Laboratories, Inc.、シャンティリー、VA) 上に重炭酸緩衝液 (pH 9.6) と共に 250 ng / ウェルで 12 ~ 18 時間、37 °C でコーティングし、ELISA の基質として用いた。SU-V3-2 ペプチドのアミノ酸配列は : Gly Ser Trp Phe Arg Ala Ile Ser Ser Trp Lys Gln Arg Asn Arg Trp Glu Trp Arg Pro Asp Phe (配列番号 : 1) ; および TM-C1 ペプチドのアミノ酸配列は : Gln Glu Leu Gly Cys Asn Gln Asn Gln Phe Phe Cys Lys Ile (配列番号 : 2) である。合成ペプチドは、FMOC ペプチド合成化学 (マガジンら (Magazine), 1988) を用いて、バイオサーチ 9500 ペプチドシンセサイザー (Biosearch、サンラファエル、CA) で合成した。合成ペプチドの純度は、逆相高速液体クロマトグラフィー上での単一のピークの存在によって決定し、ピーク試料について実施したアミノ酸配列分析によって確認した。 40

【0033】

ペプチドコーティングプレートは、使用直前に緩衝液 3 で 1 回洗浄した。血清試料を緩衝液 3 で 1 : 200 に希釈し、FIV 抗原コーティングウェル中で 37 °C で 1 時間インキュベートし、6 回洗浄した。ウェルを洗浄液で洗浄し、ビオチン化抗ネコ IgG (Vector Laboratories、パーリングイム、CA) と共に 37 °C で 1 時間インキュベートし、6 回洗浄し、ホースラ 50

ディッシュペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン（ベクター・ラボラトリーズ）と共に37℃で1時間インキュベートした。次にウェルを洗浄液で6回洗浄して、ELISA基質溶液（0.005%テトラメチルベンジジンおよび0.015% H_2O_2 の0.96%クエン酸溶液）と共に室温でインキュベートした。既知のFIV陽性ネコ血清からなる連続希釈標準物質に可視反応色が確立すれば、0.1 Mフッ化水素酸で反応を停止させた。バイオラッドELISAリーダー（バイオラッド・ラボラトリーズ、ハーキュルズ、CA）で光学濃度414 nmでの吸光度を測定した。

【0034】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）。感染細胞のプロウイルスDNA濃度は、同じまたは異なるサブタイプからの多種FIV株を識別するために最近開発された分別PCRによってモニターした（オカダら（Okada）、1994）。PCRの感度を増加させる手段として、表1に示すネステッドPCRプライマーセットを用いた。PCRは2段階反応で行い、最初はオカダら（Okada、1994）が記述した条件下で1対の外側のプライマー（全てのFIV株に共通）で行った。PCRの第二段階では、内側のプライマー（各FIV株に特異的）を用いて第一段階産物の1/25を増幅した。ネステッドPCRを用いて、FIV_{P e t}、FIV_{U K 8}、FIV_{B a n g}、FIV_{A o m 1}、FIV_{A o m 2}、およびFIV_{S h i} に感染した細胞を互いに区別することができる。

【表 1】

表 1. 分別PCRのプライマーセット				
サポタイプ	株	プライマー(方向)	配列	位置*
外側の7°プライマーセット A11	NA	共通(+)	GAAATGTATAAATATTGGCTGG (配列番号:3)	1570-1589
		共通(-)	GAAATTGATTTTGATTACATCC (配列番号:4)	2112-2092
内側の7°プライマーセット A	Petaluma	Pet (+)	TAGTAGTTATAGTGGTACTA (配列番号:5)	1639-1678
		Pet (-)	TCTTTAAGGCTTCAGTCACCT (配列番号:6)	1984-1964
B	UK-8	UK8 (+)	GTACAAATAGTAGTAGTACAA (配列番号:7)	1646-1666
		UK8 (-)	TCTTTAAGGCTTCAGTCACCT (配列番号:8)	1984-1964
C	Bangston	Bang (+)	GGGACTACTAGCAATGGAAATA (配列番号:9)	1654-1674
		Bang (-)	AGTGCCCTCAGTTATTTTATCC (配列番号:10)	1979-1959
D	Aomori-1	Aol (+)	TGGGACTGATGATAGTAAAC (配列番号:11)	1654-1674
		Aol (-)	AGTGCCCTCAGTTATTTTATCC (配列番号:12)	1979-1959
E	Aomori-2	Ao2 (+)	TGGGACTGATATAATAGTAAAC (配列番号:13)	1654-1674
		Ao2 (-)	AGTGCCCTCAGTTATTTTATCC (配列番号:14)	1979-1959
F	Shizuoka	Shi (+)	TCAATCATTTCCAACATGTC (配列番号:15)	1663-1681
		Shi (-)	AATGCTTCAGTTATTTGATC (配列番号:16)	1979-1960

*ヌクレオチドの位置はPetaluma配列の位置に対応し、数値はenv配列の起点からの位置を表す

10

20

30

40

【0035】

プロウイルスDNAの細胞当たりのおおよその量は、既知の細胞数から抽出したDNAの希釈を変化させて半定量的PCRによって定量した。例えば、 10^5 個の細胞をDNA抽出に用いた場合、DNA調製物を 10^{-5} 希釈すれば、細胞1個当たり存在するDNAにほぼ相当することになる。これらの変化させたDNA希釈液についてPCRを実施し、陽性PCR結果を示す最終希釈をエンドポイント希釈と見なす。エンドポイント希釈に相当する細胞数を用いて、以下の

50

式に従って所定の細胞調製物中のウイルス感染細胞の百分率を決定した：

【数 2】

$$\% \text{感染細胞} = \frac{1}{Z} \times 100$$

式中、Zはエンドポイント希釈に相当する細胞数である。

【0036】

逆転写酵素 (RT) アッセイ。RNA-依存的DNAポリメラーゼ (RT) の有無は、本質的にレイラ (Rey) の記載に従い細胞培養上清において解析した。FIVを検出するRTアッセイは、外因性鋳型プライマーとしてポリ (rA) -オリゴ (dT_{1 2 - 1 8})、異なる4つのデオキシリボヌクレオチド3リン酸、2価陽イオンとしてMg⁺⁺と共に20 mM KCl、および1試料当たり5 μCi [³H]-標識チミジン3リン酸を用いた。5 μCi [³H]TTPは、ベックマンLS 250シンチレーションカウンター (Beckman Instruments, Inc.、パロアルト、CA) でシンチレーション液混合物 (キシレン1対研究産物国際生物分解計数シンチラント9の割合) を用いて、平均総カウント1,200,000 cpmを生じた。その結果、調べる試料のRT値は1,200,000 cpm/ml未満となると考えられる。

10

【0037】

ウイルス中和アッセイ。株およびサブタイプ特異的VNアッセイを開発する計略は記述されている (オカダら (Okada)、1994)。ネコ末梢血単核細胞 (PBMC) (4 × 10⁵ 細胞/ml) またはFIV易感染性FeT-1C細胞 (2 × 10⁵ 細胞/ml) を加える前に、熱不活化血清の連続希釈物を24ウェルプレート中で37 °Cで45分、各FIV株の100 TCID₅₀と共にインキュベートした。培養3日後に、細胞をHank's緩衝塩溶液で1回洗浄し、培養から残留ウイルスを除去し、次に細胞を新鮮な培養培地 (10% 熱不活化仔ウシ胎児血清、10 mM HEPES緩衝液、50 μg/mlゲンタマイシン、5 × 10⁻⁵ M 2-メルカプトエタノール、および100 単位/mlヒト組換えIL-2を含むRPMI-1640) に再懸濁した。細胞のウイルス感染は、培養9、12、15、および18日目に回収した培養液のMg⁺⁺ 依存的RTアッセイによってモニターした。RT活性が、SPF血清からなる感染対照培養の25%以下である場合、血清はVN抗体陽性と見なした。

20

【0038】

以下は、本発明の実施に関する最良の形態を含む手順を図示する実施例である。これらの実施例は、制限的なものと解釈してはならない。百分率は全て重量で表し、溶媒混合比は、他に明記していなければ全て容積である。

30

【実施例 1】

【0039】

実施例 1 - FIV感染細胞株。

IL-2依存的FeT-1Mクローンの母株であるFeT-1Cと呼ばれる新規インターロイキン-2 (IL-2) 依存的ネコ科T細胞株を用いて、FIV_{P e t}、FIV_{D i x}、FIV_{U k 8}、FIV_{B a n g}、FIV_{A o m 2}、またはFIV_{S h i}のいずれかに慢性的に感染させた個々の細胞株を確立した。FeT-1Mクローン (FIV-Fet1Mとも呼ばれる) は、本明細書に参照として組み入れられる米国特許第5,275,813号に記述されており、これを用いて、FIV_{P e t}を慢性的に産生するIL-2非依存的細胞株FL-4 (これも米国特許第5,275,813号に記述されている) を産生した。FeT-1C細胞株は、FIVサブタイプA、B、およびDの異なる単離体に高度に感染可能である。FeT-1C細胞株を長期間継代すると、その感染性、特にFIVサブタイプDに対する感染性は低下する；したがって、至適FIV感染率を得るため、またはVNアッセイで使用するためには、継代回数は約35回未満とすること。半定量的PCRおよびウイルスコア抗原分析により、FIVに暴露された細胞株は全て、個々のFIV株に有意に感染することが示された。

40

【0040】

FIV易感染性のIL-2非依存的ネコ科細胞株も同様に、FeT-1C細胞から作製した。FeT-Jと呼ばれるこの細胞株は、FIV感染培地または細胞を用いて共培養によってFIVに感染させる

50

ことができる。例えば、FIV_{B a n g} 感染FeT-1C細胞株を、IL-2の非存在下で非感染FeT-J細胞と共培養して、IL-2非依存的FIV_{B a n g} 感染FeT-J細胞株（Bang / FeT-Jと呼ぶ）を確立した。共培養による感染法では、Bang / FeT-1C細胞を非感染FeT-J細胞と約2 : 1 ~ 約10 : 1（感染 : 非感染）の比で混合した。細胞混合物はIL-2の非存在下で培地中で数日間培養し、FeT-1C細胞を死亡させた。残った細胞は、FIV_{B a n g} 感染FeT-J細胞から成った。このように、FIV感染FeT-1C細胞を用いてFeT-J細胞を感染させ、異なるFIVサブタイプに感染したIL-2非依存的FeT-J細胞株を確立することができる。FIV感染FeT-1C細胞との共培養法の結果、異なるFIVサブタイプを中等度から高レベル産生するIL-2非依存的FeT-J細胞株が得られた。

【0041】

FeT-1C細胞株をまたFIV_{S h i} に感染させ、十分に継代すると、Shi / FeT-1Cと呼ばれるIL-2依存的細胞株が得られた。Shi / FeT-1C細胞株を後に、IL-2の非存在下でFeT-Jと共培養し、得られたIL-2非依存的FIV_{S h i} -感染細胞株をShi / FeT-Jと呼んだ。IL-2非依存的Shi / FeT-J細胞株は、IL-2依存的Shi / FeT-1C細胞株より高レベルのFIV_{S h i} を産生する（図1）。

【0042】

FIV_{B a n g} に感染させたFeT-J細胞株の作製はまた、FeT-1C細胞株を用いずに実施した。FeT-J細胞株を無細胞FIV_{B a n g} 接種体に直接感染させ、IL-2を用いずに十分に継代した。得られたIL-2非依存的FIV_{B a n g} 産生細胞株をBang / FeT-Jと命名した。Bang / FeT-J細胞株は、FeT-1C細胞株をFIV_{B a n g} に感染させて作製したIL-2依存的Bang / FeT-1C細胞株より高レベルのFIV_{B a n g} を産生した。

【実施例2】

【0043】

実施例2 - 多種サブタイプFIVワクチン。

FIV感染細胞は遠心によって上清から除去し、不活化し、そしてワクチンとして用いた。同様に、FIVウイルス全体は、超遠心によって感染した無細胞上清から沈殿させ、不活化した。感染細胞およびウイルスはいずれも、5 で1.25%パラホルムアルデヒドで24時間処置して不活化し、その後それぞれ、十分に洗浄、またはPBSで透析した。この方法は、免疫原性を失うことなくFIVを効率よく不活化する。本方法によって産生されたFIV免疫原は、防御免疫の誘導に非常に有効である（ヤマモトラ（Yamamoto）、1993；ヤマモトラ（Yamamoto）、1991a；ヤマモトラ（Yamamoto）、1991b）。弱毒化したウイルス単離体もまた、本発明のワクチン組成物に用いることができると企図される。

【0044】

FIV_{S h i} 感染FeT-1C細胞株をFIV_{P e t} 株に重複感染させると、多種サブタイプFIV（すなわち多種サブタイプA / D FeT-1C細胞株）に感染した単一の細胞株が得られるが、共感染の2ヶ月以内に、FIV_{S h i} プロウイルス濃度は50%から5%未満に減少し、一方FIV_{P e t} プロウイルス濃度は同時に約50%に増加した。このように、FIVワクチンとして用いるための、多種サブタイプFIVに感染させた単一細胞株の維持は、本発明の好ましい態様ではない。

【0045】

その結果として、本発明の一つの態様において、ワクチン組成物は、各株が異なるFIVサブタイプに感染した2つの個々の細胞株から作製した。特定の態様において、2種サブタイプのFIVワクチン組成物は、FIVサブタイプA感染細胞株（Pet / FL-4）とFIVサブタイプD感染細胞株（Shi / FeT-1C）との組み合わせから成った。AサブタイプおよびDサブタイプ感染細胞株は記述のように不活化し、等しい細胞数（MDP 250 μg中に各 2.5×10^7 細胞）を混合し、これを用いてネコを免疫した。SPFネコ3匹を不活化Pet / FL-4細胞でワクチン接種し、別のネコ4匹を不活化Shi / FeT-1C細胞でワクチン接種した（ 2.5×10^7 細胞 / 接種量）。一連の4回のワクチン接種後、2種サブタイプ（Pet / FL-4およびShi / FeT-1C）ワクチンは、調べた両FIV株に対して有意なVN抗体価を含む抗FIV抗体を誘導した（図2および表2、試験1）。2種サブタイプ（Pet / FL-4およびShi / FeT-1C）ワクチン接種ネ

10

20

30

40

50

コ4匹に、FIV_{B a n g} (50 CID₅₀) をチャレンジした。Pet / FL-4ワクチン接種ネコ3匹全てとShi / FeT-1Cワクチン接種ネコ2匹にFIV_{B a n g} の50 CID₅₀ 量をチャレンジした。残る2匹のShi / FeT-1Cワクチン接種ネコには、FIV_{S h i} の50 CID₅₀ 量をチャレンジした。

【0046】

2種サブタイプワクチン接種ネコは全て、感染後(pi)6週目でのウイルス単離およびPBMCのPCRにより、FIV_{B a n g} 陰性であったが、偽免疫ネコは全て、感染後6週目でのウイルス単離およびPCRにより、FIV_{B a n g} またはFIV_{S h i} のいずれかに対して陽性であった(表2、試験1)。対照的に、Pet / FL-4ワクチン接種およびShi / FeT-1Cワクチン接種群のネコそれぞれ1匹ずつにFIV_{B a n g} をチャレンジすると、FIV_{B a n g} 陽性であった。予想されたように、FIV_{S h i} ワクチンを接種し、その後FIV_{S h i} をチャレンジしたネコは全て、感染後6週目でFIV_{S h i} に対して陰性であった。このように、特に例示した2種サブタイプワクチンは、異種FIV_{B a n g} チャレンジに対してと同様、同種FIV_{S h i} に対する感染も防御または遅らせた。

10

【0047】

2種サブタイプワクチンを接種したネコ(Pet / FL-4細胞およびShi / FeT-1C細胞)は、2回目の免疫後、ウイルスコア蛋白質p25(FIV p28とも呼ばれる)に対して特異的なFIV抗体を産生した(図2)。他のウイルス抗原に対するより高い抗体価は、3~4回の免疫後に示された。FIV_{P e t} に対するVN抗体は、2回の免疫後に産生されたが、FIV_{S h i} に対するVN抗体は4回の免疫後に産生された(表4)。FIV_{P e t} およびFIV_{S h i} に対するCTL反応は、調べた全てのネコにおいて3回の免疫で検出され(表3)、両株に対するより強いCTL反応は4回の免疫後に得られた。さらに、調べたネコ3匹のうち2匹が、4回の免疫後FIV_{B a n g} に対するCTL反応を示した。結果は、4回のワクチン接種後、2種サブタイプワクチンは、FIV_{P e t} およびFIV_{S h i} に対して強いCTL反応を誘導し(表3)、両FIV株に対してVN抗体価を含む高いFIV抗体を誘導した。

20

【0048】

不活化Shi / FeT-1C細胞で免疫したネコは、2回の免疫後ウイルスコア蛋白質p25に対して特異的なFIV抗体を産生し、3回の免疫後その他のウイルス抗原に対する抗体を産生した(図2)。これらのネコでは、FIV_{S h i} に対するVN抗体は4回の免疫後に産生されたが、FIV_{P e t} に対するVN抗体は免疫の過程において検出されなかった。Shi / FeT-1Cワクチン接種ネコはいずれも、4回の免疫後に限ってFIV_{S h i} に対するCTL反応を起こしたが、FIV_{P e t} に対するCTL反応は4回の免疫後でも起こさなかった(表3)。

30

【0049】

不活化Pet / FL-4細胞で免疫したネコは、2回の免疫後にp25に対する抗体を産生し(図2)、2~3回の免疫後FIV_{P e t} に対するVN抗体を含む他のウイルス抗原に対する抗体を産生した(表4)。Pet / FL-4細胞で免疫したネコに検出される唯一のCTL反応は、FIV_{P e t} に対するものであった。全体的に、2種サブタイプワクチンは、1種サブタイプワクチンより、速やかにかつ高いVN抗体価、および両FIV株に対するCTL反応を誘導した。偽免疫SPFネコは、ウイルス抗体、VN抗体、または抗FIV CTL反応を示さなかった。

【表 2】

表2. 多種サブタイプFIVワクチンによるネコの防御

ワクチンタイプ	ネコの数	FIVチャレンジ株 (CID ₅₀) ¹	Pi 0日での以下に対する平均VN抗体 ²	Pet	Shi	Bang	ウイルス単離およびPCR	防御率 (%)
2種サブタイプワクチン 試験I(A+D):								
Pet/FL-4細胞 + Shi/FeT-1C細胞	5	FIV _{Bang} (50 CID ₅₀)	<10	1000	550	<10	3/5陰性	3/5 (pi 6週目で60%)
Pet/FL-4細胞	3	FIV _{Bang} (50 CID ₅₀)	<10	1000	<10	<10	全て陽性	0/3 (pi 6週目で0%)
Shi/FeT-1C細胞	2	FIV _{Bang} (50 CID ₅₀)	<10	<10	75	<10	全て陽性	0/2 (pi 6週目で0%)
Shi/FeT-1C細胞	2	FIV _{Shi} (50 CID ₅₀)	<10	<10	30	<10	全て陽性	0/2 (pi 6週目で0%)
偽	3	FIV _{Bang} (50 CID ₅₀)	<10	<10	<10	<10	全て陽性	0/3 (pi 6週目で0%)
偽	2	FIV _{Shi} (50 CID ₅₀)	<10	<10	<10	<10	全て陽性	0/2 (pi 6週目で0%)
3種サブタイプワクチン 試験II(A+B+D):⁴								
Pet/FL-4細胞 + Bang/FeT-J細胞 ⁵ + Shi/FeT-1C細胞	3	FIV _{TKS}	1000	1000	370	1000	NA	2/3 (pi 24週目で67%)
Bang/FeT-J細胞	2	FIV _{TKS}	<10	<10	<10	1000	NA	0/2
Bang/FeT-J細胞	2	FIV _{Bang}	<10	<10	<10	100	NA	1/2
偽非感染FeT-J	2	FIV _{TKS}	<10	<10	<10	<10	NA	
非感染FeT-J	2	FIV _{TKS}	<10	<10	<10	<10	NA	0/2
偽アジュバントのみ	1	FIV _{TKS}	<10	<10	<10	<10	NA	0/2
非感染FeT-J	1	FIV _{Bang}	<10	<10	<10	<10	NA	0/1
偽アジュバントのみ	2	FIV _{Bang}	<10	<10	<10	<10	NA	1/2

¹ 全てのFIVチャレンジ接種物は、SPFネコの初代培養物PBMCを感染させることによってインピトロで作製した。アリコート接種物は全て-70°Cで保存し、使用直前に室温で解凍した。

² pi = FIV感染後

³ ND = 実施していない

⁴ VN結果は3回ワクチン接種後である。

⁵ 4回目のワクチン接種は、不活化Shi/FeT-1C細胞の代わりに不活化Shi/FeT-J細胞で実施する。

【表 3】

表 3-2 種サブタイプワクチン接種ネコのCTL反応

ネコ#	ワクチンタイプ	CTL標的	クロム放出 (%溶解)					
			3回ワクチン接種 エフェクター：標的比		4回ワクチン接種 エフェクター：標的比		100:1	
			10:1	50:1	10:1	50:1	10:1	50:1
K55	Pet + Shi	Pet	0	9	20	17	25	33
		Bang	ND	ND	ND	0	0	14
		Shi	0	9	8	7	11	17
3L4	Pet + Shi	Pet	0	11	19	0	11	19
		Bang	ND	ND	ND	0	0	0
		Shi	0	9	13	0	9	17
N55	Pet + Shi	Pet	ND	ND	ND	0	11	17
		Bang	ND	ND	ND	0	0	7
		Shi	ND	ND	ND	0	9	15
M55	Shi	Pet	0	0	0	0	0	0
		Bang	ND	ND	ND	0	0	0
		Shi	0	0	0	0	7	15
007	Shi	Pet	0	0	0	0	0	0
		Bang	ND	ND	ND	0	0	0
		Shi	0	0	0	0	0	8
2H5D	Pet	Pet	0	7	15	6	15	25
		Bang	ND	ND	ND	0	0	0
		Shi	0	0	0	0	0	0
3G1	Pet	Pet	0	10	14	6	13	19
		Bang	ND	ND	ND	0	0	0
		Shi	0	0	0	0	0	0
H7P	Sham	Pet	0	0	0	0	0	0
		Bang	ND	ND	ND	0	0	0
		Shi	0	0	0	0	0	0

10

20

30

40

【表 4】

ネコNo.	FIVワクチン	ワクチン接種前				ワクチン2回接種後				ワクチン4回接種後			
		Pet	Bang	Shi	Pet	Bang	Shi	Pet	Bang	Shi	Pet	Bang	Shi
K55	Pet + Shi	>10	>10	>10	100	<10	<10	1000	<10	<10	1000	<10	100
3L4	Pet + Shi	>10	>10	>10	100	<10	<10	1000	<10	<10	1000	<10	1000
N55	Pet + Shi	>10	>10	>10	10	<10	<10	1000	<10	<10	1000	<10	1000
973	Pet + Shi	>10	>10	>10	10	<10	<10	1000	<10	<10	1000	<10	100
M55	Shi	>10	>10	>10	>10	>10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	50
006	Shi	>10	>10	>10	>10	>10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	100
007	Shi	>10	>10	>10	>10	>10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10
999	Shi	>10	>10	>10	>10	>10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	50
3G1	Pet	>10	>10	>10	<10	<10	<10	1000	<10	<10	1000	<10	<10
3G2	Pet	>10	>10	>10	10	<10	<10	1000	<10	<10	1000	<10	<10
2H5D	Pet	>10	>10	>10	100	<10	<10	1000	<10	<10	1000	<10	<10
8C2	Sham	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
8C8	Sham	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
H7P	Sham	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
8G8	Sham	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
RF5	Sham	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

10

20

30

40

50

【0050】

好ましい態様において、本発明のワクチン組成物は、各細胞株が異なるFIVサブタイプ（AまたはBもしくはD）からのウイルス株に感染している3つの細胞株から調製された3種サブタイプFIVワクチンからなる。特定病原体不在ネコ3匹を3種サブタイプ（FIV_{Pet} + FIV_{Bang} + FIV_{Shi}）ワクチンで免疫した。その他のネコは1種サブタイプFIV_{Bang} ワクチンで免疫して、ワクチン成分としてマクロファージ親和性FIV_{Bang} の免疫原性を評価した。VN抗体価の結果は、3種サブタイプ（FIV_{Pet} + FIV_{Bang} + FIV_{Shi}）と1種類サブタイプFIV_{Bang} ワクチンはいずれも、2回の免疫後においても高い抗ウイルス抗体価を誘発した（表2、試験IIおよび表5）。このように、リンパ球親和性およびマクロファージ親和性FIVは、本発明のワクチン組成物の成分として用いることができる。

【 0 0 5 1 】

不活化Pet / FL-4、不活化Bang / FeT-J、および不活化Shi / FeT-1C細胞の組み合わせ（全体でMDP 250 μ g中に各 2.5×10^7 細胞）で免疫したSPFネコ3匹は、ウイルスコア蛋白質p25およびFIV SUおよびTMエンベロップ蛋白質を含むその他のウイルス抗原に特異的なFIV抗体を2回の免疫後に産生した（図3、4、5）。FIV_{P e t}、FIV_{B a n g}、およびFIV_{S h i}に対するVN抗体は、2回の免疫後まもなく大多数のネコに産生され、3回目の免疫により全てのネコに産生された（表5）。さらに、ネコ1匹が3回の免疫後にFIV_{U K 8}に交叉反応するVN抗体を産生した。不活化Bang / FeT-J細胞のみで免疫したSPFネコ4匹は、ウイルスコア蛋白質p25およびその他のウイルス抗原に特異的な抗体を産生した（図3）。これらのネコではFIV_{B a n g}に対するVN抗体は2回の免疫後に産生された（表5）が、FIV_{P e t}およびFIV_{U K 8}に対するVN抗体は免疫過程において検出されなかった。3種サブタイプFIVワクチン（Pet / FL-4、Bang / FeT-JおよびShi / FeT-1C細胞）で3回免疫したネコのFIV A、B、およびDサブタイプ標的細胞に対するCTL反応を表6に示す。調べたこれら3つのFIVサブタイプ全てに対してCTL反応が検出された。このように、3種サブタイプワクチンは、1種サブタイプワクチンより幅広いCTL反応ならびに、より速やかかつより高いVN抗体価およびSU-エンベロップ抗体価を誘導した。非感染FeT-Jまたは偽免疫SPFネコも、ウイルス抗体またはVN抗体を産生しなかった。

【表 5】

表 5 - 3 種サブタイプワクチン接種ネコのウイルス中和 (VN) 力価													
ネコ #	FIV ワクチン	ワクチン接種前			ワクチン 2 回接種後			ワクチン 3 回接種後					
		Pet	Bang	Shi	UK8	Pet	Bang	Shi	UK8	Pet	Bang	Shi	UK8
J55	Pet+Bang+Shi	<10	<10	<10	<10	1000	1000	<10	<10	1000	1000	10	<10
QY1	Pet+Bang+Shi	<10	<10	<10	<10	100	1000	100	<10	1000	1000	1000	<10
TAS	Pet+Bang+Shi	<10	<10	<10	<10	<10	1000	10	<10	100	1000	100	100
BE	Bang	<10	<10	<10	<10	<10	100	<10	<10	1000	<10	<10	<10
A	Bang	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	100	<10	<10	<10
QU8	Bang	<10	<10	<10	<10	<10	100	<10	<10	100	<10	<10	<10
RD2													
3G4	非感染FeT-J	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
3G5	非感染FeT-J	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
3G6	偽	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
3G7	偽	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

VN力価は 2 つの独立した VN アッセイの平均力価である。

10

20

30

40

【表 6】

表6. 3種サブタイプワクチン接種ネコの3回免疫後のCTL反応			
ネコNo.	標的FIV	E : T 比	CTL活性 (%クロム放出)
QY1	FIV _{Pet}	100	44%
		50	21%
		10	4%
QY1	FIV _{Bang}	100	13%
		50	6%
		10	1%
QY1	FIV _{UK8}	100	23%
		50	8%
		10	2%
Tas	FIV _{Bang}	100	8%
		50	3%
		10	1%
Tas	FIV _{Shi}	100	3%
		50	1%
		10	0.3%
J55	FIV _{UK8}	100	10%
		50	2%
		10	1%

10

20

【実施例 3】

【0052】

実施例 3 - FIVサブタイプに対するVN抗体。

FIVに対するVN抗体のアッセイはまた、本発明のFeT-1C細胞を用いて開発された。FIV_{P_{e_t} 感染ネコおよび不活化Pet / FL-4細胞または不活化FIV_{P_{e_t} ウイルスでワクチン接種したSPFネコの血清を、本明細書に記述のVNアッセイ法に従って、FeT-1C細胞またはPBMCのいずれかを用いてVN抗体価を調べた。ワクチンを接種せず、FIVに感染していないSPFネコ2匹の血清を対照血清として用いた。ワクチン接種およびFIV感染ネコの血清は1000以上の高いVN抗体価を示したが、非ワクチン接種SPFネコの血清は検出可能なVN抗体価を示さなかった。FeT-1Cに基づくVNアッセイは、ネコの初代培養PBMCを用いて得られた結果と同等のVN抗体価結果を示す(表6)。この知見は、FeT-1C細胞を用いたVNアッセイでのVN抗体価が、PBMCを用いたVNアッセイに関して得られた結果と相関することを証明している。したがって、FeT-1C細胞は、全てのFIVサブタイプに感染させることが可能で、組織培養において容易に増殖させることが可能なため、FIVに関する標準的なVNアッセイにおいてPBMCの代わりに都合良く用いることができる。}}

30

40

【表 7】

表 7. FeT-1CおよびPBMCで解析したVN力価		
血清源	VN力価	
	FeT-1C	PBMC
ワクチン接種 ¹	5000	5000
ワクチン接種 ¹	>1000	>1000
感染 ²	1000	1000
感染 ²	>1000	>1000
免役した非感染細胞 ³	<10	<10
免役した非感染細胞 ³	<10	<10

¹ 不活化Pet/FL-4細胞ワクチン接種ネコの血清
² FIV_{Pet}感染ネコの血清
³ 不活化非感染FeT-J免疫ネコの血清

10

20

【実施例 4】

【0053】

実施例 4 - FIV株の免疫タイピング

FIVサブタイプがFIV免疫型を反映するか否かを評価するために、FeT-1C細胞を用いてインビトロ試験を実施した。免疫タイピングはワクチン防御におけるVN抗体の役割を理解する上で重要である。FIVサブタイプA株 (FIV_{Pet}、FIV_{Dix}、FIV_{Uk8})、サブタイプB (FIV_{Bang}、FIV_{Om1})、およびサブタイプD (FIV_{Shi}) に感染させたネコの抗血清を、VNアッセイにおいてFeT-1C細胞を用いてインビトロでこれらの株を中和する能力に関して調べた (図 6)。試験抗血清は全て、対応する同種FIV株に対する中和活性を示した。サブタイプA株であるFIV_{Pet}は、FIV_{Dix}に感染させたネコの抗血清によって有意に交叉中和された。FIV_{Pet}は、表面エンベロープ糖蛋白質 (Env) 領域がFIV_{Dix}と約9%異なる。FIVサブタイプAに感染させたネコの抗血清はサブタイプBのFIV_{Bang}と交叉中和したが、サブタイプD FIV_{Shi}を中和しなかった。サブタイプBおよびD株に感染させたネコの抗血清のみが、同種サブタイプ内の他のFIV株を交叉中和した。さらに、FIV_{Uk8}に感染させたネコの抗血清はFIV_{Bang}を中和したが、サブタイプA内のFIV株を中和しなかった。FIV_{Uk8}はサブタイプAに分類されているが (ソドラら (Sodora)、1994; リグビーら (Rigby)、1993; カキヌマら (Kakinuma)、1995) が、これらの結果は、FIV_{Uk8}に対する抗血清がサブタイプB株を認識するがサブタイプA株を認識

30

40

【実施例 5】

【0054】

実施例 5 - FIV細胞親和性

感染FeT-1Cおよび感染FeT-J細胞株から得たFIV株の細胞指向性を、初代培養PBMCから得たFIV株の細胞指向性と比較した (表 8)。FIV単離体 2 個、FIV_{Uk8} およびFIV_{Bang}

50

はいずれも等しくリンパ球親和性およびマクロファージ親和性であるが、FIV_{S h i}は非常にリンパ球親和性である。FIV_{P e t}は、マクロファージ親和性よりリンパ球親和性で、その細胞親和性はその細胞源によって有意に影響を受けなかった。FIV_{B a n g}のマクロファージ親和性は、ウイルスの細胞源によって影響を受けなかった。感染FeT-1C細胞株からのFIV株の細胞親和性は、初代培養PBMCから得られた細胞親和性と同等であるため、FeT-1C細胞内で増殖するウイルスは、VNアッセイの接種体として用いることができ、治療および予防的アプローチを評価するための試験では、インビボ接種体として用いることもできる。

【表8】

表8. FIV単離株の細胞親和性

FIV (サブタイプ ^o)	FIV源	TCID ₅₀ ^a			
		FeT-1C	PBMC	肺胞 マクロファージ ^d	初代培養 ミコグリア
Petaluma (A)	PBMC	10 ⁴	10 ⁴	10 ²	ND
Petaluma (A)	FeT-1C ^b	10 ⁴	10 ⁴	10 ¹	ND
Petaluma (A)	FL-4 ^d	10 ⁴	10 ⁴	10 ¹	ND
Dixon (A)	FeT-1C	10 ⁴	10 ³	10 ¹	ND
UK8 (A)	PBMC	10 ²	10 ³	10 ³	ND
UK8 (A)	FeT-1C	10 ³	10 ³	10 ³	ND
Bangston (B)	PBMC	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²
Bangston (B)	FeT-1C ^b	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²
Bangston (B)	FeT-J ^b	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²
Shizuoka (D)	PBMC	10 ²	10 ³	<1	ND
Shizuoka (D)	FeT-1C ^b	10 ³	10 ³	<1	ND
Shizuoka (D)	FeT-J ^b	10 ³	10 ³	ND	ND

^a ウイルス接種物は全て、 5×10^5 細胞/mlのネコ科T細胞 (FeT-1C) または初代培養ネコ科細胞で滴定前のRT活性を120,000 cpm/mlに調整し、結果は21日の培養で回収したウイルスの最高力価を表す。

^b 感染細胞ワクチンと同じ細胞。

【0055】

本明細書に記載の実施例および態様は例示目的のためのみであり、その様々な改変または変更は当業者に示唆され、本出願および付属の請求の範囲の範囲内に含まれるものと理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】図1は、これらのFIV株でFeT-1CおよびFeT-J細胞株を感染させた後に産生されたFIV_{B a n g}およびFIV_{S h i}の逆転写酵素 (RT) 濃度を示す。

【図2】図2は、イムノプロットによって検出された、2種サブタイプワクチン接種ネコの抗FIV抗体とFIV蛋白質との免疫反応を示す。各プロット上の数値は、血清を検査した時点での動物に行ったワクチン接種回数を表す。

【図3】図3は、イムノプロットによって検出された、3種サブタイプワクチン接種ネコの抗FIV抗体とFIV蛋白質との免疫反応を示す。各プロット上の数値は、血清を検査した時点での動物に行ったワクチン接種回数を表す。

【図4】図4は、ELISAによって検出した、3種サブタイプワクチン接種ネコから得た抗FIV抗体とFIV SU-V3-2ペプチドとの免疫反応性を示す。

【図5】図5は、ELISAによって検出した、3種サブタイプワクチン接種ネコから得た抗FIV抗体とFIV TM-C1ペプチドとの免疫反応性を示す。

10

20

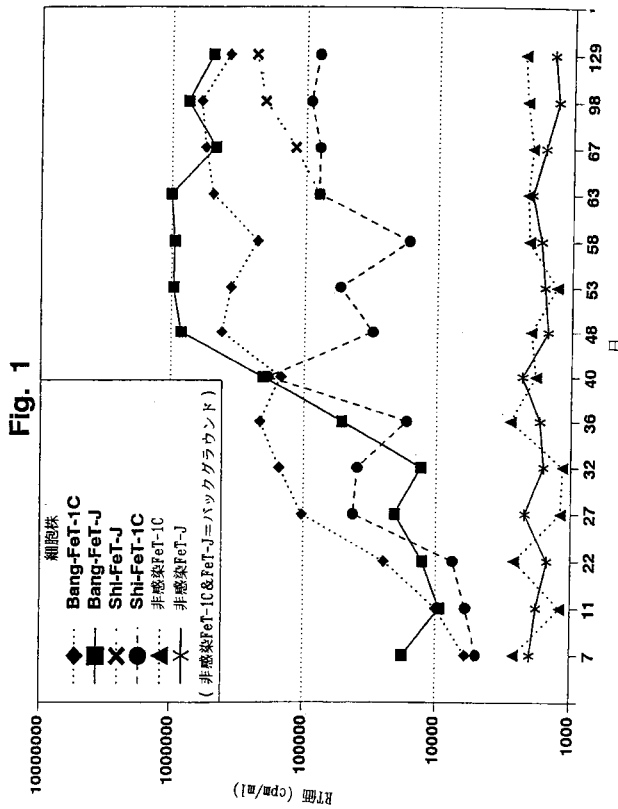
30

40

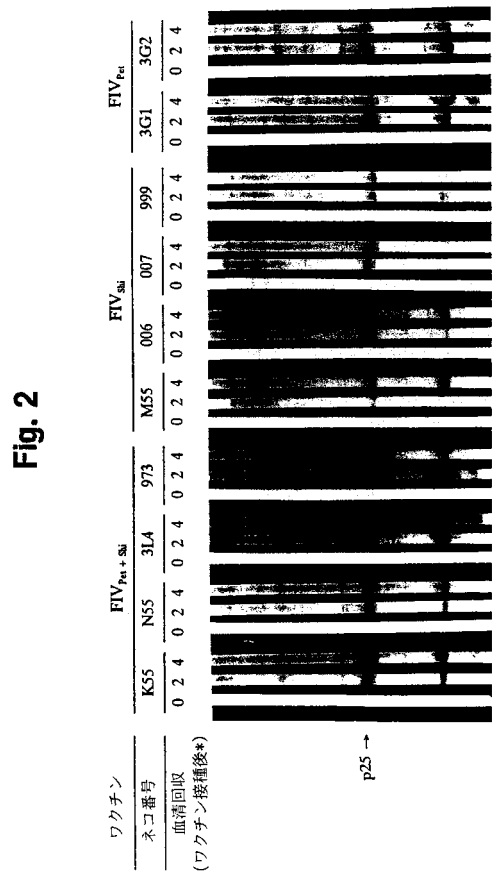
50

【図6】 図6は、FIV_{P e t} (A_P)、FIV_{D i x} (A_D)、FIV_{U K 8} (A_U)、FIV_{B a n g} (B_B)、FIV_{A o m i} (B_A)、およびFIV_{S h i} (D_S)のいずれかに感染したネコから得た血清の交叉中和抗体価を示す。感染前(カラム1)、感染後6ヶ月(カラム2)、および感染後12ヶ月(カラム3)での血清を、FeT-1C-細胞株においてサブタイプA FIV_{P e t}、サブタイプB FIV_{B a n g}、およびサブタイプD FIV_{S h i}に関して試験した。1株当たり少なくとも3匹のネコを試験し、結果は各株の代表的なネコから得たVN力価を示す。VNアッセイに関しては、初代培養PBMCを用いても同様の結果が得られた。

【図1】



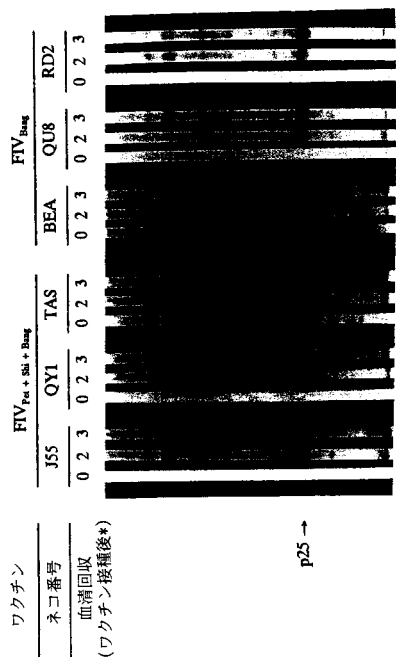
【図2】



*チャレンジ前

【 図 3 】

Fig. 3



*チャレンジ前

【 図 4 】

Fig. 4A

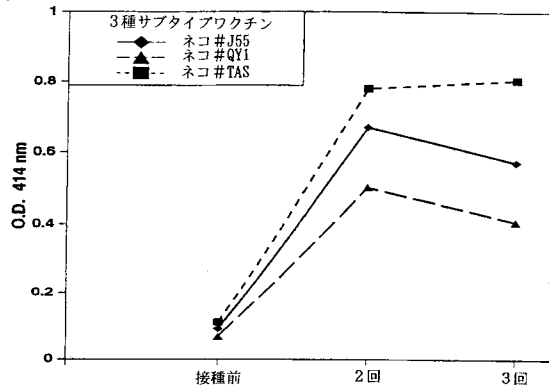
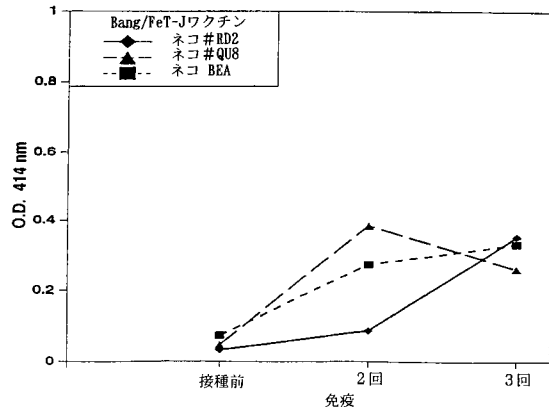


Fig. 4B



【 図 5 】

Fig. 5A

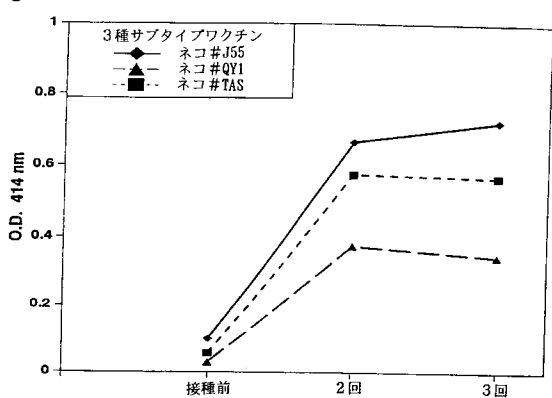
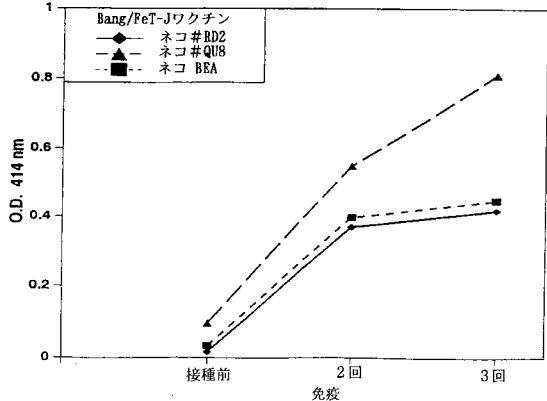
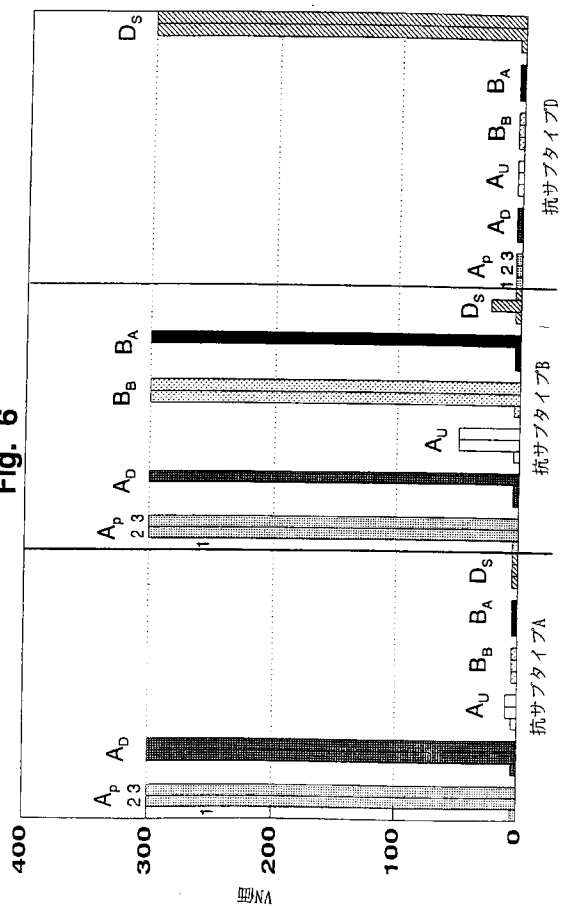


Fig. 5B



【 図 6 】

Fig. 6



【配列表】

2007284442000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年5月31日(2007.5.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

FIV免疫原を含む有効量のワクチン組成物をFIV感染に感受性である非ヒト動物に投与する工程を含む、FIV感染に感受性である非ヒト動物においてFIV感染に対する防御免疫反応を誘導する方法であって、

該FIV免疫原が、異なるFIVサブタイプのうち少なくとも2つの異なるFIV株に由来するか又はこのような株を含む1つ又は複数の免疫原を含み、該ワクチン組成物が、該動物に3つ又はそれ以上のFIVサブタイプに対して免疫反応を誘発することが可能であり、該3つ又はそれ以上のサブタイプのうち1つが、FIV免疫原のFIVサブタイプと異種であり、および該ワクチン組成物が、該動物にFIV免疫原のFIV株と同種及び異種のFIV株に対して免疫反応を誘発することが可能である方法。

【請求項2】

前記免疫原が、FIVペプチド、天然もしくは組換えFIV蛋白質又は該FIV蛋白質の免疫原性断片、組換えウイルスベクター-FIV構築物、無細胞FIVウイルスの全体または部分、ならびにFIVウイルスを感染させた細胞からなる群より独立に選択される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記FIVウイルスまたはFIV感染細胞株が、ワクチンを非ヒト動物へ投与する前に、不活化されるよう処置される、請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記FIVウイルスが、パラホルムアルデヒド、ホルマリン、フェノール、UV光線、又は温度上昇に暴露することによって不活化される、請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記FIVウイルスまたはFIV感染細胞株が、ワクチンを非ヒト動物へ投与する前に、弱毒化されるよう処置される、請求項2記載の方法。

【請求項6】

前記FIVウイルスが、パラホルムアルデヒド、ホルマリン、フェノール、UV光線、又は温度上昇に暴露することによって弱毒化される、請求項5記載の方法。

【請求項7】

前記少なくとも2つの異なるFIVサブタイプが、サブタイプA、B、CおよびDからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項8】

前記少なくとも2つの異なるFIVサブタイプが、サブタイプAおよびDである、請求項7記載の方法。

【請求項9】

前記少なくとも2つの異なるFIVサブタイプが、サブタイプA、B及びDである、請求項7記載の方法。

【請求項10】

非感染細胞株がネコ科由来T細胞株であって、ATCC寄託番号11968でありFeT-1Cと命名された細胞株、およびATCC寄託番号11967でありFeT-Jと命名された細胞株から選択される、FIV感染細胞株を含む、請求項2～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 1】

FIVに感染したネコ科由来T細胞であって、ATCC寄託番号11976でありShi/FeT-1Cと命名された細胞株、およびATCC寄託番号11975でありBang/FeT-Jと命名された細胞株から選択される細胞を含む、請求項 2 ~ 9 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 2】

前記1つまたは複数のFIV免疫原が、FIV_{Dix}、FIV_{UK8}、FIV_{Bang}、FIV_{Aom1}、FIV_{Aom2}、FIV_{pet}、およびFIV_{Shi}からなる群より選択されるFIVウイルス株に由来する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 11968でありFeT-1Cと命名された細胞株に由来し、且つFIVに感染されている、請求項 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 11967でありFeT-Jと命名された細胞株に由来し、且つFIVに感染されている、請求項 2 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 10772でありFL-4と命名された細胞株に由来し、且つFIVに感染されている、請求項 2 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 10775でありFeT-1Mと命名された細胞株に由来し、且つFIVに感染されている、請求項 2 記載の方法。

【請求項 1 7】

前記細胞がFIV_{Shi}に感染されており、且つ前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 11976でありShi/FeT-1Cと命名された細胞株に由来する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 1 8】

前記細胞がFIV_{Bang}に感染されており、且つ前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 11975でありBang/FeT-Jと命名された細胞株に由来する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ウイルスベクターFIV構築物が、FIV_{env}、FIV_{gag/pro}、またはFIV_{env-gag/pro}を含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 2 0】

前記非ヒト動物がネコである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 1】

前記FIV蛋白質が、FIVエンベロープ糖蛋白質またはそれらの免疫原性断片を含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 2 2】

前記FIVエンベロープ糖蛋白質が、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

前記FIV蛋白質が、少なくとも2つの異なるFIVサブタイプ由来の蛋白質のアミノ酸配列を含むキメラ蛋白質である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

前記キメラ蛋白質が、FIVエンベロープ糖蛋白質を含む、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

前記ワクチン組成物がアジュバントをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 6】

前記アジュバントが、トレオニルムラミルジペプチド、ミョウバン、フロイトの完全アジュバント、およびフロイトの不完全アジュバントからなる群より選択される、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ワクチン組成物が、非経口、経口または鼻腔内に投与される、請求項 1 記載の方法

。

【請求項 2 8】

前記非経口投与が、皮下、腹腔内、または筋肉内注射による、請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記FIV感染細胞が、約 10^6 細胞～約 10^8 細胞の用量で投与される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 3 0】

前記FIV感染細胞が、約 5×10^6 細胞～約 7.5×10^7 細胞の用量で投与される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 3 1】

無細胞FIVウイルスの全体または部分が、約0.1 mg～約5 mgの用量で存在する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 3 2】

無細胞FIVウイルスの全体または部分が、約0.2 mg～約2 mgの用量で存在する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 3 3】

前記ワクチン組成物が、前記動物に、各投与について少なくとも1週間の間隔をあけて少なくとも2回投与される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記FIV免疫原が、(a) 第1のサブタイプのFIVで感染された細胞、および(b) 第2のサブタイプの無細胞FIVの全体または部分を含み、該FIVの第1および第2のサブタイプが、A、B、C、およびDからなる群より選択され、且つ該FIVの第1および第2のサブタイプが同一ではない、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 5】

少なくとも一次免疫が、組換えウイルスFIV構築物または組換えウイルスFIVベクターを投与する工程を含み、その後、組換えウイルスFIV構築物、組換えウイルスFIVベクター、FIVポリペプチド、無細胞FIVウイルス全体、およびFIV感染細胞株からなる群より選択されるワクチン組成物で追加免疫が行われる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 6】

FIV免疫原を含むワクチン組成物であって、該FIV免疫原が、異なるFIVサブタイプのうち少なくとも2つの異なるFIV株に由来するか又はこのような株を含む1つ又は複数の免疫原を含み、該ワクチン組成物が、動物に3つ又はそれ以上のFIVサブタイプに対して免疫反応を誘発することが可能であり、該3つ又はそれ以上のサブタイプのうち1つが、FIV免疫原のFIVサブタイプと異種であり、および該ワクチン組成物が、該動物にFIV免疫原のFIV株と同種および異種であるFIV株に対して免疫反応を誘発することが可能である組成物。

【請求項 3 7】

前記免疫原が、FIVペプチド、天然もしくは組換えFIV蛋白質又は該FIV蛋白質の免疫原性断片、組換えウイルスベクターFIV構築物、無細胞FIVウイルスの全体または部分、ならびにFIVウイルスを感染させた細胞からなる群より独立に選択される、請求項 3 6 記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記FIVウイルスまたはFIV感染細胞株が、ワクチンを非ヒト動物へ投与する前に、不活化されるよう処置される、請求項 3 7 記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記FIVウイルスが、パラホルムアルデヒド、ホルマリン、フェノール、UV光線、又は温度上昇に暴露することによって不活化される、請求項 3 8 記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記FIVウイルスまたはFIV感染細胞株が、ワクチンを非ヒト動物へ投与する前に、弱毒化されるよう処置される、請求項 3 7 記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記FIVウイルスが、パラホルムアルデヒド、ホルマリン、フェノール、UV光線、又は温度上昇に暴露することによって弱毒化される、請求項40記載の組成物。

【請求項42】

前記少なくとも2つの異なるFIVサブタイプが、サブタイプA、B、CおよびDからなる群より選択される、請求項36記載の組成物。

【請求項43】

前記少なくとも2つの異なるFIVサブタイプが、サブタイプAおよびDである、請求項42記載の組成物。

【請求項44】

前記少なくとも2つの異なるFIVサブタイプが、サブタイプA、B及びDである、請求項42記載の組成物。

【請求項45】

非感染細胞株がネコ科由来T細胞株であって、ATCC寄託番号11968でありFeT-1Cと命名された細胞株、およびATCC寄託番号11967でありFeT-Jと命名された細胞株から選択される、FIV感染細胞株を含む、請求項36～44のいずれか一項記載の組成物。

【請求項46】

FIVに感染したネコ科由来T細胞であって、ATCC寄託番号11976でありShi/FeT-1Cと命名された細胞株、およびATCC寄託番号11975でありBang/FeT-Jと命名された細胞株から選択される細胞を含む、請求項36～44のいずれか一項記載の組成物。

【請求項47】

前記1つまたは複数のFIV免疫原が、FIV_{Dix}、FIV_{UK8}、FIV_{Bang}、FIV_{Aom1}、FIV_{Aom2}、FIV_{Peet}、およびFIV_{Shi}からなる群より選択されるFIVウイルス株に由来する、請求項36記載の組成物。

【請求項48】

前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 11968でありFeT-1Cと命名された細胞株に由来し、且つFIVに感染されている、請求項37記載の組成物。

【請求項49】

前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 11967でありFeT-Jと命名された細胞株に由来し、且つFIVに感染されている、請求項37記載の組成物。

【請求項50】

前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 10772でありFL-4と命名された細胞株に由来し、且つFIVに感染されている、請求項37記載の組成物。

【請求項51】

前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 10775でありFeT-1Mと命名された細胞株に由来し、且つFIVに感染されている、請求項37記載の組成物。

【請求項52】

前記細胞がFIV_{Shi}に感染されており、且つ前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 11976でありShi/FeT-1Cと命名された細胞株に由来する、請求項37記載の組成物。

【請求項53】

前記細胞がFIV_{Bang}に感染されており、且つ前記細胞が、ATCC寄託番号CRL 11975でありBang/FeT-Jと命名された細胞株に由来する、請求項37記載の組成物。

【請求項54】

前記ウイルスベクターFIV構築物が、FIV_{env}、FIV_{gag/pro}、またはFIV_{env-gag/pro}を含む、請求項37記載の組成物。

【請求項55】

前記非ヒト動物がネコである、請求項36記載の組成物。

【請求項56】

前記FIV蛋白質が、FIVエンベロープ糖蛋白質またはそれらの免疫原性断片を含む、請求項37記載の組成物。

【請求項57】

前記FIVエンベローブ糖蛋白質が、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む、請求項5
6記載の組成物。

【請求項58】

前記FIV蛋白質が、少なくとも2つの異なるFIVサブタイプ由来の蛋白質のアミノ酸配列
を含むキメラ蛋白質である、請求項36記載の組成物。

【請求項59】

前記キメラ蛋白質が、FIVエンベローブ糖蛋白質を含む、請求項58記載の組成物。

【請求項60】

前記ワクチン組成物がアジュバントをさらに含む、請求項36記載の組成物。

【請求項61】

前記アジュバントが、トレオニルムラミルジペプチド、ミョウバン、フロイトの完全ア
ジュバント、およびフロイトの不完全アジュバントからなる群より選択される、請求項6
0記載の組成物。

【請求項62】

前記ワクチン組成物が、非経口、経口または鼻腔内に投与される、請求項36記載の組
成物。

【請求項63】

前記非経口投与が、皮下、腹腔内、または筋肉内注射による、請求項62記載の組成物

。

【請求項64】

前記FIV感染細胞が、約 10^6 細胞～約 10^8 細胞の用量で投与される、請求項37記載の
組成物。

【請求項65】

前記FIV感染細胞が、約 5×10^6 細胞～約 7.5×10^7 細胞の用量で投与される、請求項37
記載の組成物。

【請求項66】

無細胞FIVウイルスの全体または部分が、約0.2 mg～約2 mgの用量で存在する、請求項
37記載の組成物。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/18 (2006.01)		A 6 1 P 31/18		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		N
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/569		L
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00		A

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(72)発明者 ヤマモト ジャネット ケイ .

アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲインズビル 77ス ストリート エス . ダブリュー . 4309

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA02 GA11 HA17

4B065 AA90X AA90Y AA95Y AB01 AC14 AC20 CA45

4C085 AA03 AA04 BA65 CC07 CC08 CC21 DD01 EE01 EE03

专利名称(译)	各种亚型FIV疫苗		
公开(公告)号	JP2007284442A	公开(公告)日	2007-11-01
申请号	JP2007121532	申请日	2007-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	佛罗里达州研究基金会，公司大学 加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	佛罗里达州研究基金会，公司大学 加州大学校董会		
[标]发明人	ヤマモト ジャネット ケイ		
发明人	ヤマモト ジャネット ケイ.		
IPC分类号	A61K39/21 C12N5/06 A61K39/00 A61K39/295 A61P31/12 A61P31/18 G01N33/53 G01N33/569 C12N15/09 C12Q1/02 A61K31/00 A61K48/00 A61P31/00 A61P31/14 C07K16/10 C12N5/02 C12N5/10 C12N7/01 C12N7/04 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/563 G01N33/573		
CPC分类号	A61K39/21 A61K39/12 A61K48/00 A61K2039/515 A61K2039/5156 A61K2039/5252 A61K2039/552 C07K16/1045 C07K2319/40 C12N2740/15034 G01N33/56966 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N2333/155		
FI分类号	A61K39/21.ZNA C12N5/00.E A61K39/00.H A61K39/295 A61P31/12.171 A61P31/18 G01N33/53.N G01N33/569.L C12N15/00.A C12N5/00.202.L C12N5/0783		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024 /EA02 4B024/GA11 4B024/HA17 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065 /AC14 4B065/AC20 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/BA65 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/DD01 4C085/EE01 4C085/EE03		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	08/519386 1995-08-25 US		
其他公开文献	JP5339687B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新方法和组合物，用于使用多亚型FIV疫苗保护猫免受各种FIV毒株的感染。描述了包含无全细胞病毒或病毒感染细胞系的多特异性亚型FIV疫苗。还描述了具有该疫苗组合物的猫的疫苗接种方法。当用同源或异源FIV株攻击时，根据本发明的方法和组合物接种的猫表现出对FIV的保护性体液和细胞免疫应答。本发明还涉及与FIV相容的新型猫科动物细胞系及其使用方法。【选择图】无

打針液	株	アミノ酸配列	位置*
A1	NA	共有(+) 共有(-)	195-199 212-202
	Belgian	Bel (+) Bel (-)	188-194 194-194
UK1	UK (+) UK (-)	共有(+) 共有(-)	184-186 184-184
	Belgian	Bel (+) Bel (-)	184-194 194-199
Amen1	Ame1 (+) Ame1 (-)	共有(+) 共有(-)	188-194 194-199
	Amen2	Ame2 (+) Ame2 (-)	184-194 194-199
Shanda	Sh1 (+) Sh1 (-)	共有(+) 共有(-)	184-194 194-199
	Sh2 (+) Sh2 (-)	共有(+) 共有(-)	184-194 194-199

*アミノ酸の位置は、本発明の位置からの変異を示す