

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 541165

(P2002 - 541165A)

(43)公表日 平成14年12月3日(2002.12.3)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
A 6 1 K 39/21		A 6 1 K 39/21	4 C 0 8 4
38/00		39/00	H 4 C 0 8 5
39/00		39/39	4 H 0 4 5
39/39		A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/18		C 0 7 K 14/16	ZNA

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 49数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 610400(P2000 - 610400)

(86)(22)出願日 平成12年4月12日(2000.4.12)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月15日(2001.10.15)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/00938

(87)国際公開番号 W000/61067

(87)国際公開日 平成12年10月19日(2000.10.19)

(31)優先権主張番号 99/04610

(32)優先日 平成11年4月13日(1999.4.13)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(31)優先権主張番号 99/16633

(32)優先日 平成11年12月29日(1999.12.29)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 サントル ナシオナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシュ シアンティフィーク (セ-エヌエ-
 ールエス)
 フランス国、エフ - 75794 パリ セデック
 ス 16、リュ ミシェル - アンジュ 3

(72)発明者 ロレット、エルワン
 フランス国、エフ - 13009 マルセイユ、ブ
 ルヴァール デ イルス ドール 1

(74)代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H I V - 1 の T A T タンパク質の全体又は一部を含有する抗 H I V - 1 ワクチン

(57)【要約】

本発明は、H I V に冒された個体における該タンパク質の同定に加えて、T a t H I V - 1 タンパク質の全体又は一部を含む抗 H I V - 1 ワクチンに関する。T a t タンパク質は、H I V - 1 O y i 変異体のタンパク質である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 医薬上許容され得る賦形剤及び、適宜、1種以上の適切な免疫アジュバントと組み合わせて、TARと結合できるが、トランス活性化ができない少なくとも1種のHIV-1 Tatタンパク質の全体又は一部を含有する抗HIV-1ワクチン。

【請求項2】 Tatタンパク質が99乃至106個のアミノ酸を含むことを特徴とする請求項1に記載のワクチン。

【請求項3】 Tatタンパク質が、そのヌクレオチド配列が、機能的なTatのヌクレオチド配列と比較して、少なくとも一つの変異を有するTatであることを特徴とする請求項1又は2に記載のワクチン。

【請求項4】 変異が、Tatタンパク質のシステインの少なくとも一つに作用することを特徴とする請求項3に記載のワクチン。

【請求項5】 Tatタンパク質が、HIV-1 Oyi変異体のTat又はこのTatの一部であることを特徴とする請求項1乃至4に記載のワクチン。

【請求項6】 Tatタンパク質が化学合成Tatであることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項7】 Tatが固相で合成されることを特徴とする請求項6に記載のワクチン。

【請求項8】 Tatタンパク質が組換えTatであることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項9】 Tatの全体又は一部ののためのヌクレオチド配列と、その発現のために必要な要素とを含む発現ベクターを含むことを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項10】 Tat配列の少なくともN末端領域及び/又は塩基性領域を含むことを特徴とする請求項1乃至9のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項11】 TatのC末端に位置するArg-Gly-Asp領域が改変されていることを特徴とする請求項1乃至7のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項12】 幾つかのTat変異体を認識できる抗Tatポリクローナ

ル抗体の製造方法であって、

- 免疫応答アジュバントと組み合わせて、T a tタンパク質又はこのT a tタンパク質の一部を注射することによって、動物を免疫化すること、
 - 該免疫化した動物の血清に含まれる特異的抗体を精製すること、
- を含む方法。

【請求項13】 免疫化工程で使用されるT a tタンパク質又はT a tタンパク質の一部が、O y i又はB r u c m C変異体に対応することを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 免疫化工程で使用されるT a tタンパク質又はT a tタンパク質の一部が、請求項6に記載のとおりであることを特徴とする請求項12又は13に記載の方法。

【請求項15】 生体試料中の、T a tタンパク質又はT a tタンパク質の一部の存在の検出方法であって、

- 該試料を、幾つかのT a t変異体と抗原 - 抗体複合体を生じさせることができる抗T a t抗体と接触させること、
- 該抗原 - 抗体複合体の存在を測定すること、

を含む方法。

【請求項16】 生体試料中のT a tタンパク質又はT a tタンパク質の一部の存在を測定することによる、H I V感染の診断用キットであって、

- 免疫学的反応に適した媒質の調製のための試薬、
- 免疫学的反応によって産生される抗原 - 抗体複合体の検出を可能とする試薬、
- 任意で、抗原を含まない参照生体試料（陰性対照）、
- 任意で、所定量の抗原を含む参照生体試料（陽性対照）、

を含むキット。

【請求項17】 免疫学的反応に適した媒質を調製するための試薬が、請求項15に記載の抗体を含むものである請求項16に記載のキット。

【請求項18】 F M O Cタイプ、好ましくはf a s t F M O Cタイプの保護基を使用することを特徴とする請求項1乃至5、10及び11のいずれか1項に記載のT a t変異体の合成方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明の主題は、H I V - 1のT a tタンパク質の全体又は一部を含有する抗H I V - 1ワクチン、幾つかのT a t変異体を認識できるモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の製造、及び生体試料中のT a tの検出方法である。

【0002】

本発明の主題は、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)に対するワクチンとしての、このウイルスの調節タンパク質、即ちT a tタンパク質の使用、及びH I Vに感染した個体におけるこのタンパク質の検出に関する。

【0003】

T a tは、H I V - 1ウイルス遺伝子の発現とこのウイルスの複製に必須のウイルスタンパク質である。T a t遺伝子は、単離株によって異なるが、99乃至106残基からなるタンパク質をコードする2個のエキソンからなる。しかし、C末端の一部が欠失した86残基を含む型のT a t活性が、既に報告されている。86残基を含むこれらのT a t誘導体は、実験室のアーティファクトか、もはや天然状態では存在しない先祖型であると考えられている。このタンパク質は、H I V - 1のmRNAの5'末端に位置するT A Rと命名されたヌクレオチド標的と結合することによって、H I V - 1遺伝子を活性化させる。このタンパク質は、H I Vに感染した細胞から分泌され、H I V - 1の有効な逆転写に必須である。細胞外に出ると、このタンパク質は、離れた感染細胞を活性化でき、非感染T細胞の免疫不全を引き起こすことができる。更に、このタンパク質は、カボシ肉腫などのA I D S関連の病理学的疾患に直接関与する。

【0004】

A I D Sに対するワクチンの開発が、地球上至る所で非常に期待されているが、A I D Sに対するワクチンの製造には、2点の主要な困難性がある。第1点は、エンベロープタンパク質であるG P 1 2 0の非常な変異性に関連する。第2の困難性は、抗G P 1 2 0抗体は、明白なA I D S患者に対しては病気を悪化させるらしいという事実による。しかし、予備的な結果によると、それ以前に汚染されていなかった人々においては、抗G P 1 2 0抗体によって防御効果が可能であ

りうることが示されている。抗GP120ワクチンによるフェーズIIが、米国においてRoche社によって開始されている。このフェーズIIのために選別された集団は、医学的観点から十分に監視されている。しかし、ワクチンが上市されると、同等な医学的指示を得ることは困難であろう。

【0005】

GP120とともに、Tatは、HIV-1感染患者の血液中に検出される。ウイルスに感染した細胞全部を除去する役割を担うマクロファージと細胞障害性Tリンパ球(CTL)の活性は、徐々にTatによってブロックされる。それ故、Tatは、免疫抑制物質として働く。抗Tat抗体(又はTatを標的とする活性な成分)は、CTLやマクロファージの活性を回復させるはずである。

【0006】

それ故、Tatは、抗Tat抗ウイルス剤の開発と、ワクチンアプローチの両方のために、好ましい標的である。

【0007】

それ故、Tatタンパク質は、実験の題目となってきた。生物学的に不活性な組換えTatタンパク質(Tatトキソイド)を用いて行われた前臨床試験によると、血清反応陰性の患者において、Tatトキソイドは、高いかつ持続的な抗Tat抗体の産生を引き起こすことが特に示された(Le Buanec et al., 1998)。血清反応陽性及び免疫不全の患者においては、抗Tat抗体レベルの顕著な増大が、通常の抗Tat抗体レベルと比較して観察される(Westendorp et al., 1995)。

【0008】

このTatトキソイドは、Tatシステインのカルボキシメチル化後に生物学的に不活性になっている組換えタンパク質である。本発明者らはまた、カルボキシメチル化Tat(Tat Bru cmC)を製造でき、トランス活性化活性の喪失も観察した(遊離のシステインを有する同じTat変異体(Tat Bru fC)が、トランス活性化ができるにもかかわらず)。Tat Bru cmCは、Tat Bru fCに匹敵するアフィニティでTARと結合できる。

【0009】

ワクチンとしてのカルボキシメチル化T a tの使用が不利である主要な点は、システインの化学修飾によって、本発明者らが円二色性とNMRで観察したコンフォメーション変化が引き起こされるということである。コンフォメーション変化は種々のT a t変異体間に存在するが、システインのカルボキシメチル化は、T a tのペプチド鎖のフォールディングにおいて大きな変化をもたらし、結果として、それは、抗T a tワクチンの製造のための良い候補とはならない。

【0010】

それ故、抗H I V - 1ワクチンにおいて、欠損はあるが、機能的なT a tに類似した構造的特徴を有するT a tタンパク質を使用することが賢明である。このT a tは、自然のT a tによって引き起こされる免疫応答と同様の免疫応答を引き起こすことができるように、できるだけ自然のT a tタンパク質に近いが、トランス活性化できない、即ち、上記のように、離れた感染細胞を活性化できず、非感染T細胞の免疫不全を引き起こすことができない、三次元構造を実際は有すべきである。この免疫不全性を阻害することは実に決定的である。

【0011】

それ故、本発明の主題は、医薬上許容され得る賦形剤及び、適宜、1種以上の適切な免疫アジュバントと組み合わせて、T A Rと結合でき、かつトランス活性化できない、少なくとも1種のH I V - 1のT a tタンパク質の全体又は一部を含有する抗H I V - 1ワクチンである。このT a tタンパク質は、それを投与される動物において、このタンパク質の他の変異体を認識できる抗体の産生を、該変異体のトランス活性化を阻害するのに十分なレベルで引き起こすことができるべきである。

【0012】

従って、本発明のワクチンの製造のために、T a tタンパク質ばかりでなく、本発明においてT a tタンパク質に所望される機能を果たすことができるこのタンパク質の1種以上の部分も使用することができる。上記ワクチンはまた、種々のT a tタンパク質、又は種々のT a tタンパク質の部分の組み合わせも含みうる。

【0013】

本発明の好適な実施態様によれば、T a t タンパク質が全体として使用される場合、T a t タンパク質は、好ましくは99乃至106個のアミノ酸からなり、更により好ましくは101個のアミノ酸からなる。

【0014】

“T a t タンパク質の一部”という表現は、同じ変異体に属するか、又は属さない1種以上のT a t タンパク質の任意のフラグメント、又はフラグメントの組み合わせ（抗体の産生を引き起こすために十分に免疫原性である）を意味するものと理解されたい。好ましくは、該フラグメントは、15乃至30アミノ酸からなり、好ましくは18乃至25アミノ酸からなる。この定義は、この表現が、本出願で使用されるときにはいつでも有効である。

【0015】

それ故、本発明のワクチンに使用できるT a t タンパク質は、トランス活性化はできないがT A Rとは結合できるように、“天然”と呼ばれる、即ち、天然状態で存在する種々のH I V - 1株から抽出される、機能的なT a t タンパク質とは異なるべきである。そういうわけで、本発明のワクチンに使用されるT a tは、機能的なT a tのヌクレオチド配列と比較して少なくとも1個の変異を有するヌクレオチド配列を有する。この変異は、一般的に点変異であり、例えば、1個以上のアミノ酸のサプレッション、付加、又は置換を引き起こしうる。

【0016】

本研究において、本発明者らはまず第1に、B r u単離株に対応するT a t変異体（86残基）を研究し、次いで、このタンパク質で観察される構造的多様性を各々が代表する5種の他の変異体を合成した（Gregoire et Loret, 1996）。即ち、T a t Z 2（86残基）、T a t M a l（87残基）、T a t E l i（99残基）、T a t O y i（101残基）、及びT a t J r（101残基）。全てのH I V - 1単離株のうち、6つの構造的な群が、タンパク質の大きさと変異の性質に基づき決定された。これらの全ての変異体は、カルボキシメチル化システイン（T a t B r u c m C）を有するものと、次いで遊離システイン（T a t B r u f C）を有するものと、2度合成されたT a t B r uと類似の薬理活性を恐らく有していた。使用した化学は、H B T Uアクティベーター

タを用いる *fast Fmoc* タイプのものである。タンパク質の精製は、高速液体クロマトグラフィーで行った。これらの全ての合成タンパク質は *TAR* に結合できることが見出されたが、大きな相違が *HeLa* 細胞のトランス活性化試験で観察された。最も驚くべき結果は、*Tat Oy i* 変異体で観察された、トランス活性化の無いことであった。また、カルボキシメチル化システインを有する *Tat Bru* 誘導体でもトランス活性化は観察されなかった。これらの合成タンパク質における水相円二色性 (*CD*) 研究は実際に、*Tat Bru cmC* の化学修飾は、*Tat Bru* の構造を顕著に改変したことを示す。一方、*Tat Oy i* は、その *CD* スペクトルによって実証されたように、他のものと類似の構造を有する。

【0017】

HIV-1 Oy i 株は、1988年にガボン人患者（より正確には、妊婦）で同定された (Huet et al., 1989)。この患者は、数年間血清反応陽性であったが、完全に健康であった。明らかに、欠陥のある *Tat* タンパク質が、この *HIV-1* 株に存在するという事実によって、この患者における *AIDS* への進行が妨げられ、彼女に *AIDS* ウイルスに対する免疫が与えられていた。実際、フィールドで行われた疫学的研究は、*HIV-1 Oy i* に感染した患者が、長期間非進行者であったことを示している。

【0018】

HIV Oy i 株は、欧州と北米で最も一般的な *HIV-1* 株に対応するサブタイプ *B* に属する。*HIV Oy i* 株が同定されたガボン人女性は、ガボンの南東の *Haut Ogooue* という田舎の州に住む31人のグループに属していた。このグループは、1986年、ガボン全体で感染した約2000人に対し行われた血清疫学的解析の間に見出された。この *Haut Ogooue* グループは注目をあびた。というのは、感染した人々は、健康良好で、また、全く例外的なウエスタンブロットプロフィールをも示したからである。実際に、これらの人々において、抗 *gp120* 抗体、抗 *gp160* 抗体、抗 *gp41* 抗体の存在を検出できなかったが、抗 *gag* 抗体、抗 *pol* 抗体は同定された (Huet et al., 1989)。

【0019】

次いで、この同じ Haut Ogooue 州の750人の妊婦の一群が研究され、彼女らのうち25人(即ち、3.3%)がELISA試験でHIV陽性であることが示された。これらの25人の女性のうち、23人がこの地区に特徴的な例外的ウエスタンブロットプロフィール(上記参照)を有していた。HIV-1 Oyi 株を有するその一人を含む約10人の女性が、2年間追跡調査された。

【0020】

この期間中、例外的な血清学的プロフィールは一定のままであった。これは、最近感染したこと(最近感染したのならば、抗gp120抗体の形成のための時間が無かったであろう)の可能性を除外している。HIV-2感染の存在は除外された。というのは、HIV-2 gagに対する反応が無く、HIV-2感染は、ガボンでは2ケースが報告されるのみであり、それらは沿岸地域に位置していたからである。モニタリングされた全ての患者は、2年間の研究の間、健康良好で、体重の減少は無く、日和見疾患も無かった(Huet et al., 1989)。

【0021】

Oyi が同定された女性は、田舎出身で、健康は良好で、HTLV-1とHIV-2に対し血清反応陰性であった。彼女のリンパ球とPPMCの共培養は、15日間後のみRT活性を示した。これは、非常に異常である。該ウイルスはまた、殆ど検出できない細胞変性活性しか有しなかった。培養上清は、PBMCを感染させることができたが、H-9やCEM又はU-937単球などの正常なリンパ球株では、実質的に複製は不可能であった。この解析の正当性を実証すべく、全てのケースで抗gp120抗体の非存在を確認している、同じ地区の17人の他の患者でも、同様の結果が観察された。通常のHIV-1ドナーの血清は、HIV-1 Oyi gp120を認識できることに注目することは、興味深い(Huet et al., 1989)。それ故、HIV-1 Oyi ウイルスはクローニングされた。Tat 遺伝子を除いて配列決定は成功した(Huet et al., 1989)。

【0022】

Cys22のSerへの変異が、トランス活性化の喪失の理由であると考えられ、この変異の復帰が、Tat活性の回復を可能とする。

【0023】

更に、T a tの非存在下、該ウイルスの増殖は可能であるが、非常に低レベルであることが観察された。それ故、H I Vの毒性とT a tトランス活性化効率の間に密接な関連がある。この疫学的研究は、今一度、この疾患の死亡率とH I V複製速度の間に存在する密接な関連を示す。それ故、T a tは、このウイルス感染を命にかかわる疾患に変化させる複製速度にH I Vが到達するのを可能にすると考えられる。

【0024】

更に、H a u t O g o o u e地区のこれらの例外的な患者に関するこの研究から、正常なH I V株と比較して、欠陥のあるH I V株が提供するように考えられる防御が示された。実際に、数人の例外的な患者からの新しく集められたリンパ球のP C R解析は、正常なH I V株の存在を示したらしい。該防御機構は抗g p 1 2 0抗体を含まない。抗g p 1 2 0抗体はこれらの患者には存在しないからである。細胞障害性Tリンパ球の作用は、該ウイルスの除去を可能にする機構でありうる。

【0025】

ガボンで行われた比較的最近の疫学研究 (Delaporte et al., 1996) によると、他のアフリカ諸国と比較してH I V感染者の割合が低い (2乃至3%) ことがわかる。O y i サブタイプは、集団から完全に消失したようであり、H I V - 1 O y i 株が採取されたガボン人女性は、1995年において完全に健康であり、3人の子供を産んだ。3人とも全て血清反応陰性であった。H I V - 1 O y i ウイルスは、もはや彼女において検出できなかった。

【0026】

それ故、H I V - 1 O y i 変異株のT a tタンパク質は、抗H I V - 1ワクチンの組成物に入れる最良の候補であると考えられる。しかし、不活性化されたT a tは、必ずしも免疫原性ではない。目下、ワクチンの全ての利点は、抗体の産生を引き起こすことであり、本ケースでは、更に、他のT a t変異体に対して活性な抗体の産生を引き起こすことである。驚くべきことに、本発明者らは、この証明をすることができた。それ故、本発明のワクチンは、特に好適な実施態様

によれば、H I V - 1 O y i 変異株のT a t の全体又は一部を含有する。

【0027】

抗T a t ワクチンの利点は、幾つかのレベルで予見さえされうる。無症候の患者において、免疫不全性を制限することによって、A I D S への進行を遅らせることは可能であろう。このようなワクチンは、感染の開始においてそうであると考えられるように、患者が該ウイルスに対し有効な免疫を保持するのを可能にするだろう。特に、細胞障害性Tリンパ球(C T L)とマクロファージ(それらはH I V に感染しないが、それらの活性はT a t によって阻害される)の活性の回復は、結果的に患者が非進行者になることを可能にするだろう。

【0028】

明白なA I D S 患者において、抗T a t ワクチンは、H I V 感染細胞によるT a t タンパク質の分泌後のT a t タンパク質の直接的な作用に関連していると考えられる、カポジ肉腫又は神経学的症候群などのある種の病理学的疾患の発生を制限できよう。

【0029】

本発明において、H I V - 1 O y i 変異株の利点は、異なるT a t 変異体間の交差認識があるかどうかを決定するために本発明者らが行った、ウエスタンブロット実験(ゲルの写真は、本出願で示さず)とE L I S A 試験によって、更に確認される。

【0030】

実際に、これら2つのタイプの実験において、3種の異なる抗T a t 血清が、7種のT a t 変異体に対して試験された。

【0031】

本発明者らは、フロイントアジュバントの存在下、従来免疫化プロトコルに従い、ウサギをT a t O y i、T a t B r u c m C、T a t E l i で免疫化した。53日後に得られたポリクローナル血清をウエスタンブロットティングとE L I S A 試験で解析した。観測された力価は、抗O y i 抗体、抗B r u c m C 抗体、抗E l i 抗体に関して、それぞれ700、11、660 pMである。

【0032】

変性条件下でのウエスタンブロット実験より、抗Tat Oyi血清と抗Tat Eli血清は、全ての変異体と交差免疫原性を示すことができないことがわかる（抗Tat Bru cmC血清の場合は交差免疫原性を示すのだが）。

【0033】

Tat Bru cmCは、そのシステインがカルボキシメチル化されている変異体である。システインのこの化学修飾は、トランス活性化活性の喪失（Peloponese et al., 1999）を引き起こすだけでなく、この変異体の3D構造の喪失も引き起こす（ランダムコイルに変換する）（結果は発表されていない）。それ故、全ての変異体の変性している場合、抗Tat Bru cmC血清がそれら全てを認識できることが観察されるのは、驚くべきことではない。

【0034】

非変性条件下でのELISA試験（図7）より、抗Tat Oyi血清は、抗Tat Bru cmC血清と同様、全ての変異体を認識できることがわかる。一方、抗Tat Eli血清は、やはり全ての変異体を認識できない。それ故、保存された3Dエピトープが多数のTat変異体に存在すると考えられる。しかし、Tat Oyiの特別な免疫原性の特徴のみが、これらの抗体を大量に産生させることを可能とする。それ故、今まで、患者におけるTatの存在が過少評価されてきた可能性が高い。3種の血清の希釈は1/1000である。希釈しない以外は同一の実験においては、抗Tat Eli血清もまた全ての他のTat変異体を認識できる。Tat Bruのリシン50（Tat Bru K50）のアセチル化は、低濃度で抗Tat Eli血清による認識を可能とすることに注目するのは、好都合である。

【0035】

それ故、これら3種のウサギポリクローナル血清を用いて行われたこれらの実験によって、ワクチンとしてのTat Oyiの利点を確認される。更に、抗Tat Oyi血清は、Tat Bru又はTat EliによるHeLa細胞におけるトランス活性化を阻害できる。対照として使用された抗Tat Eli血清は、活性な変異体からの抗体の産生でさえ、Tat Oyiで観察されているようには全てのTat変異体の交差認識を保証しないことを示す。長い変異体で

ある(101残基) Tat Oyiは、短い変異体である(86残基) Tat Bru cmCと比較して、Tat変異体のより良好な認識を可能とする。短い Tat変異体を有するHIV-1株は実際的に消失して、それは、実験室のアーティファクトであったと考えられる(Jeang et al., 1999)。更に、抗Tat Oyi血清は、もはや、変性型(即ち、線状エピトープ)を認識しないので、それは、高特異性を示す。逆に、抗Tat Bru cmC血清は、Tat Bru cmCの大きな構造的多様性の故に、ヒトにおいて自己免疫抗体を産生する顕著なリスクがある。本発明者らは実際に、ヒトアルブミンを認識できる抗体が抗Tat Bru cmC血清中に存在することを観察した(データは示さず)。

【0036】

それ故、少なくとも1種のTatエピトープの三次元構造の保存は、抗Tat 3D抗体による他のTat変異体の認識に必須である。

【0037】

更に、本発明者らは、抗Tat Oyi抗体は、Tat Eliタンパク質のトランス活性化を阻害できることも示した。

【0038】

それ故、本発明の主題はまた、幾つかのTat変異体を認識できる抗Tatモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の製造方法である。それ故、これらの抗体が、HIVに感染したかもしれない個体において、変異体にかかわらず、血液中にTatタンパク質の存在を検出するのに使用し得ることは、実際に強調されるべきである。

【0039】

それ故、本発明は、幾つかのTat変異体を認識できる抗Tatポリクローナル抗体の製造方法であって、

- 免疫応答アジュバントと組み合わせて、Tatタンパク質又はこのTatタンパク質の一部によって動物を免疫化すること、
 - 該免疫化した動物の血清中に含まれる特異的抗体を精製すること、
- を含む方法に関する。

【0040】

動物の免疫化は、注射、吸入、経口投与、皮下、皮内、腹腔内、静脈内、又は筋肉内などの、T a tタンパク質又はこのT a tタンパク質の一部をこの動物内に導入する任意のやり方で行うことができる。

【0041】

動物の免疫化はまた、当業者に周知の技術に従って、T a tタンパク質の全体又は一部の配列ばかりではなく、T a tタンパク質の発現に必要な全てのシステムを担持するベクターを*in vivo*及び*in situ*で発現させることによって行うこともできる。

【0042】

免疫化した動物の血清に含まれる特異的抗体の精製は、例えば、抗原として役立つタンパク質又はタンパク質の一部が前もって結合されているアフィニティークラムで行うことができる。

【0043】

本発明の好適な実施態様によれば、上記方法の免疫化工程で使用されるT a tタンパク質又はT a tタンパク質の一部は、O y i変異体又はB r u c m C変異体に対応する。

【0044】

本発明の別の実施態様によれば、上記タンパク質は化学合成タンパク質である。

【0045】

7個のシステイン残基の位置(領域22-37)は、全てのT a t変異体で高度に保存されている。トランス活性化のために、これらのシステイン残基のうち6個が重要であることが、文献(Jeang, 1996)に広範に記載されている。

【0046】

それ故、T a t変異体をトランス活性化できなくするが、本発明において所望される性質を有するようにするために、これらのシステインの少なくとも一つにおいて、T a t変異体を変異させることを想起することは大いに可能である。この変異は、例えば、システインのセリン又はアラニンなどの別のアミノ酸への置

換でありうる。

【0047】

本発明者らは、異核2D NMRによるT a t B r uの3D構造の決定により、T a t変異体において保存されるべき標的領域を更に同定した。この標的は部分的には、T a t配列のN末端領域と塩基性領域からなる。

【0048】

T a t B r u変異体の3D構造は、システインリッチな領域は、N末端領域と塩基性領域の3次元空間に近いことを示す。このことは、システインのカルボキシメチル化は恐らく、この標的の構造を改変することを示す。また、このことから、このように改変されたT a tは、抗H I Vワクチンの製造のために可能性ある候補として考えることができないという事実が確認される。

【0049】

更に、本発明者らは、種々のT a tタンパク質の固相化学合成を行った。

【0050】

当分野の知識の現在のレベルで、この形態の合成により与えられる利点は、分子生物学によって製造されるT a tと比較して、製造費の安いこと、より良好な収率、及びコンタミネーションの無いことにある。

【0051】

好ましくは、本発明のワクチンで使用されるT a tは、化学合成、より詳細には、固相化学合成、例えば、F M O Cタイプ、好ましくはf a s t F M O Cタイプの合成によって製造される。このタイプの保護基を用いる合成方法もまた、本発明の主題である。

【0052】

しかし、本発明のワクチンで使用されるT a tはまた、他の任意の方法、例えば、当業者に周知の組換え技術によっても合成することができる。これらの技術において使用されるこれらのクローニング及び発現システムは、大腸菌、バチルス、ストレプトマイセス、サッカロマイセスなどの微生物ばかりでなく、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞に由来し得る。バキュロウイルス発現システムも想起することができる。T a tタンパク質の全体又は一部の配列を担持するベクターは

、当業者に周知の技術に従い、上記のことをするために必要な発現システムを全て含むことは、きわめて明白である。

【0053】

更に、T a t タンパク質、特にT a t O y i の膜内への移行の故の毒性のリスクの可能性を避けるために、全てのT a t 変異体の配列のC末端に存在するA r g - G l y - A s p 配列を改変することが賢明であろう。この配列は細胞表面の膜レセプターを認識するので (Jeang, 1996)、膜移行に実に必須である。より詳細には、この改変は、構造には何の影響も与えないであろうL y s - A l a - G l u 配列、又は、ことによるとA l a - A l a - A l a 配列で、この配列を置換することでありうる。

【0054】

上記のように、H I V 感染者数は、今まで、感染者における、例えば、感染者の血液中におけるT a t タンパク質の存在を検出するのに失敗したために、過少評価されてきた可能性が高い。本発明の利点は、限られた数の抗体によって、最大可能数のT a t 変異体を検出する手段を提供することである。

【0055】

それ故、本発明の主題はまた、生体試料中のT a t タンパク質又はT a t タンパク質の一部の存在の検出方法であって、

- 該試料を、幾つかのT a t 変異体と抗原 - 抗体複合体を生じさせることができる抗T a t 抗体と接触させること、
- 該抗原 - 抗体複合体の存在を測定すること、

を含む方法である。

【0056】

“抗T a t 抗体” という表現は、抗体全体ばかりでなく、本発明において所望される役割を果たすことができる、即ち、T a t タンパク質の全体又は一部を認識できる抗体のフラグメント又はキメラ抗体をも意味するものと理解されたい。

【0057】

抗原 - 抗体複合体の存在の測定は、当業者に周知の方法で行う。詳細には、これらの複合体の検出を可能とする試薬はマーカールを含んでもよく、あるいは、よ

り詳細には使用される抗体が非標識である場合、今度は標識試薬によって認識されるものであってもよい。

【0058】

本発明の方法において、生体試料を、抗Tat抗体と接触させることは、抗Tat血清によって行いうる。

【0059】

“生体試料”という表現は、患者から収集された任意の液体試料、細胞試料、又は組織試料を意味し、適当な抗体の存在下、抗原-抗体複合体を産生できる抗原を含んでいそうであるものと理解されたい。好ましくは、この生体試料は血液である。

【0060】

最後に、本発明の主題はまた、生体試料中のTatタンパク質又はTatタンパク質の一部の存在を測定することによる、HIV感染の診断用キットであって、

- 免疫学的反応に適した媒質の調製のための試薬、
 - 免疫学的反応によって産生される抗原-抗体複合体の検出を可能とする試薬、
 - 任意で、抗原を含まない参照生体試料（陰性対照）、
 - 任意で、所定量の抗原を含む参照生体試料（陽性対照）、
- を含むキットである。

【0061】

本発明の好適な実施態様によれば、免疫学的反応に適した媒質を調製するための試薬は、幾つかのTat変異体と抗原-抗体複合体を生じさせることができる抗Tat抗体を含む。好ましくは、該試薬は、抗Tat Oyi抗体もしくは抗Tat Bru cmM抗体又はこれら2つの組み合わせを含む。

【0062】

図面

図1：種々のTatタンパク質の比較。

Tatタンパク質は、6つの構造群に分離される。6つの構造群は、図1Aでは太字で言及され、図1Bでは下線が引いてある。

【0063】

図1A: Tatタンパク質のアミノ酸配列。

TatZ2は、HIV-1ウイルスの先祖株に近いHIV-1単離株から得られる(Zhu et al., 1998)。TatMalとTatEliは、異性愛HIV感染において中央アフリカで80年代に単離されたHIV-1株から得られる(Alizon et al., 1986)。TatBrは、実験室で最も広範に使用される配列を含み、フランスで単離されたHIV-1株から得られる(Barre-Sinoussi et al., 1983)。一方、TatJrは、アメリカのHIV-1単離株から得られる(O'Brien et al., 1990)。TatOyiは、TatJrとTatBruに密接に関連するが、ガボンの健康な患者で同定されたHIV株から得られる(Huet et al., 1989)。

【0064】

図1B: MULTALINプログラムを用いた、Tatタンパク質のサイズと、それらが含む変異の関数としてのTatタンパク質の分類(Corpet, 1989)。

【0065】

図2: HIV-Oyi変異体のTatタンパク質の配列(Huet et al., 1989に記載)。

【0066】

図3: 280nmにおける、C8グラフトドカラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィーによる6つのTat変異体の精製(実験方法の材料及び方法を参照)。

【0067】

各フレームにおいて、下のトレーシングは、精製前のペプチド合成の結果を示し、一方、上のトレーシングは、最後の精製工程後の合成の結果を示す。TatBru(A)、TatJr(B)、TatZ2(C)、TatOyi(D)、TatMal(E)、及びTatEli(F)を、TFAによって樹脂から切断した。ブチルメチルエーテルによる沈殿後、タンパク質を、0.1%となるようにTFA緩衝液に溶解した(各フレームにおける下のトレーシング)。各タンパク質について、Hybar Merk C8カラム(4.5×125mm、流速0.8mL/分)上

で2回の連続的半分取HPLCランにより精製を行い、次いで、純粋なフラクションを解析し(各フレームの上のトレーシング)、質量分析とアミノ酸分析によって同定した(データは示さず)。各場合において、主要HPLCピークは完全な配列を示すことが観察される。10分乃至15分間のピークは、50残基の誘導体を表し、一方、主要フラクションに近いピークは、N末端から10乃至15欠失を有する誘導体である。高度に疎水性のフラクションは、恐らく不完全に未保護の側鎖による高分子量の誘導体である。

【0068】

図4：電気泳動による、ヌクレオチド標的TARに対する合成Tatのアフィニティ定数の測定(材料及び方法の電気泳動移動度シフトの試験を参照)。

【0069】

タンパク質濃度($\text{ng}/\mu\text{L}$)は、各ゲルバンドの上部に示している。遊離RNA又は複合体を形成したRNAは、それぞれf(遊離の場合)及びcによって示している。同じRNA調製物を、6つのタンパク質による滴定のために使用する。カルボキシメチル化システインを有するTat Bru誘導体(Bru c m C)も試験した。平衡における解離定数(K_d)は、電気泳動移動度シフト試験から直接測定された。 K_d 値は、Tat EliとTat Malの場合の約50 nMからTat OyiとTat Jrの場合の約140 nMまで変動する。更に、本発明者らは、 K_d 値のバリエーションに加えて、種々のタンパク質による結合プロフィールがやや異なることに注目した。例えば、Tat Bruは、低濃度では単一の良く分離された複合体を生じ、凝集物が形成されてアクリルアミドゲルを通り抜けられないのは、かなり高濃度(4.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 超)の場合だけである。対照的に、Tat Eliでは、多量体の複合体が低濃度でさえ容易に同定される。Tat Eliでは3つまでの遅延バンドを観察することが可能であり、Tat Jrではより少ない程度で観察することが可能である。このような効果は、例えば、Tat BruやTat Malなどのより短いタンパク質、及びより長いタンパク質であるTat Oyiでは観察されない。

【0070】

図5：HeLa細胞に対する合成Tatタンパク質のトランス活性化の試験。

これらの細胞を、LacZレポーター遺伝子が結合しているHIV-1 LTRでトランスフェクトした。産生された-galタンパク質のレベルは、種々の合成Tatのトランス活性化能力に比例する。LTRは、HIVの転写のために必要な上流と下流のDNA配列を含み、TARは、mRNAの始まりに存在する(Claven and Charneau, 1994)。HIVのトランス活性化に必要な細胞の補因子は、HeLa細胞に存在する。Tatが無ければ、対照(C)として示される-galの基礎量の発現がある。次の柱状グラフは、2つの濃度、即ち、1 μ M (明灰色ボックス)と5 μ M (暗灰色ボックス)を用いて、種々のTat変異体で観察されるトランス活性化を示す。各々の場合に、Tatは細胞緩衝液に加えられるので、対照より高い-galの発現は、合成Tatが核膜と細胞質膜を通過することができ、TARと結合でき、細胞補因子と相互作用できることを意味する。Tat Bru cmC (データは示さず)とTat Oyiのみが、この実験で欠陥があるが、それらはTARと結合する(図1)。Tat MalとTat Eliは、Tat Bruより3乃至4倍高いトランス活性化のレベルを示す。Tat Z2は、先祖Tatタンパク質に最も近いが、それは、低レベルのトランス活性化を示す。進化はより有効なTatを有するHIV-1単離株を選択するのだろう。同様の結果が、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用いた、他のトランスフェクション試験で得られた。Tat MalとTat Eliは、1 μ Mで、トランス活性化Tat-pCMVによって得られたものに匹敵するレベルでLTRを実際にトランス活性化した(データは示さず)。種々の実験で使用される濃度範囲は、0.1 μ M乃至10 μ Mである(データは示さず)。0.1 μ Mで、Tat Eliのみが、基礎レベルより有意に高いトランス活性化レベルを示す。10 μ Mで、6つのTatは、非常に高いトランス活性化レベルを示すので、飽和の故に、それらの間で差異を観察することは不可能である。

【0071】

図6: Tat Z2 (白三角)、Tat Oyi (黒三角)、Tat Bru (白円)、Tat Bru cmC (記号無し)、Tat Jr (黒円)、Tat Mal (白四角)、Tat Eli (黒四角)変異体の二色性スペクトル。

【0072】

スペクトルは、リン酸緩衝液20mM、pH4.5で測定する。スペクトルは、光路長50μmで、260から178nmまで記録する。CDスペクトルで観察された差異は、サイズにかかわらず、Tat変異体間で構造的な不均一性を示す。短いTat(白記号)と長いTat(黒記号)からなる2つのカテゴリーにCDスペクトルを整理することは不可能である。CDスペクトルは、無秩序な構造に典型的な200nmに近い負バンドによって特徴づけられる。Tat Bru cmCで観察された200nmのバンドの強い大きさは、システインの修飾が、他のTatと比較して、大きなコンフォメーション変化を引き起こしたことを示す。

【0073】

図7: 変性条件下、Tatタンパク質の7つの変異体に関し、3つのウサギボリクローナル血清(抗Tat Bru cmC、抗Tat Oyi、抗Tat Eli)の希釈液を用いて行われたELISA試験。

【0074】

図8: 抗Tat Eli血清、抗Tat Oyi血清、抗Tat Bru cmC血清による、Tat Eliによるトランス活性化の阻害。

【0075】

本発明は上記記載に限定されない。本発明は、例示としてだけ記載されている実施例によってより明確に理解されよう。

【0076】

実施例1) 図3乃至6に対応する材料及び方法タンパク質合成、精製及びキャラクタリゼーション

ペプチドは、BaranyとMerrifieldの方法(1980)に従って、自動合成機(ABI 433A, Perkin Elmer, Applied Biosystem Inc., Forster City, CA)で、1%の4-ヒドキシメチル-フェノキシメチル-コポリスチレンジビニルベンゼン(HMP)(0.5-0.65mmol)で予めチャージした樹脂(Perkin Elmer, Applied Biosystem Inc., Forster City, CA)上で合成した。欠失を示す誘導

体が得られるのを避けるために、無水酢酸 (Merck) 4.75%、2.0 Mの DIEA 6.25%、1 Mの1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) (Perkin Elmer, Applied Biosystem Inc., Warrington, GB) 1.5%、及びN-メチルピロリドン (Perkin Elmer, Forster City, CA) 87.5%を含む混合物による処理後、FmocのないN末端をアセチル基で保護した。各脱保護工程は導電率デバイスで制御した。ペプチドを脱保護し、10%メチルフェニルスルフィド (Merck) と5%エタンジチオール (Merck) を補充したトリフルオロ酢酸 (TFA) によって樹脂から切り離した。精製は、Beckman高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置とMerck C8逆相カラム (10 × 250 mm) によって行った。緩衝液Aは水と0.1% TFAからなり、緩衝液Bはアセトニトリルと0.1% TFAからなっていた。グラジエントは、緩衝液Bが20から40%で、40分かけ、流速は2 mL / 分であった。エレクトロスプレー質量分析は、Perkin Elmer PE-SCIEX API 150ex simple quadを用いて行った。アミノ酸分析は、Beckman, model 6300 analyzerで行った。

【0077】

電気泳動移動度シフト試験

必須のプリミジンUUUバルジを含むTAR RNAの59ヌクレオチドを、*in vitro*で、RNAポリメラーゼT3による転写によって調製した。結合反応混合液 (20 µL) は、TK緩衝液 (50 mM Tris pH7.4, 20 mM KCl, 0.1% Triton X-100) 中に0.2 nmolの放射性標識TAR RNA、0-100 ngのTatを含んでいた。0.1% Triton X-100を含む8%変性ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動によって、複合体を非結合RNAから分離した。試料 (25 µL) を負荷する前に、ゲルを30分間予め作動した。電気泳動は、約200 Vで90分間続ける。遊離及び/又は結合RNAの相対量は、リンイメージングによって測定した。

【0078】

円二色性 (CD)

円二色性スペクトルは、Jobin-Yvon CD UV スペクトロフォトメータ (Long-Jumeau, FRANCE) (Mark VI) 上で、光路長50 µmで、260 nmから1

78 nmで測定した。装置は、(+)-10-カンファースルホン酸で較正した。290.5 nmでの正のCDバンドと192.5 nmでの負のバンドの間で、比2.1が見出された。データを、スキャン速度1 nm/分で、0.5 nmの間隔で集めた。CDスペクトルはアミド当たり の形式でプロットした。試料を20 mMリン酸緩衝液(pH 4.5)中に調製した。タンパク質濃度は、0.5乃至1 mg/mLの範囲であった。

【0079】

HIV LTRでトランスフェクトされた細胞でのトランス活性化

合成Tatによる機能的トランス活性化をP4細胞を用いて測定した。これらのCD4-HeLa細胞は、HIV LTRの制御下に細菌のlacZ遺伝子を担持し、 β -ガラクトシダーゼの細胞質蓄積は、厳密にTatの存在に依存した。12ウエルプレート上にまかれた80%コンフルエントな細胞を、5%CO₂存在下、37℃で24時間、0.1%BSAを補充したDMEM培地に含まれるTatタンパク質と共にインキュベートした。このインキュベーションの期間の後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、タンパク質を抽出して、 β -ガラクトシダーゼの場合に抗原に結合した酵素を用いる市販の免疫吸着試験(ELISA)(Boehringer Mannheim, FRANCE)により、製造業者の指示に従って β -ガラクトシダーゼを分析した。Bradford法によって測定した、異なる細胞溶解液の全タンパク質の濃度を用いて、値を基準に合わせた。

【0080】

トランス活性化の阻害

今回、抗Tat Eli血清、又は抗Tat Oyi血清、又は抗Tat Bru血清を培養培地に添加する以外は、HIV LTRでトランスフェクトされた細胞によるトランス活性化の上記実験を再現した。Tatタンパク質は、その役目のためにEli変異体から得た。

【0081】

本発明者らは、特に抗体を含まない対照培地と比較して、抗Tat Oyi抗体により、Tat Eliタンパク質のトランス活性化が不活化されることを観察した。

【0082】

2) 図7に対応する材料及び方法

免疫化条件は、0.5 mLの100 mMリン酸緩衝液 pH 4.5 + 0.5 mLの完全フロイントアジュバント中の精製 Tat タンパク質 100 µg の皮内注射である(0日)。21日目に、不完全フロイントアジュバント(0.5 mL)を用いる以外は同一条件下で、最初のブースターを行う。42日目に、41日目と同一で、2回目のブースターを行う。53日目に血液をFSTチューブに集め、2000回転/分の遠心後に血清を得る。血清の希釈は1/1000である。

【0083】

ELISA:

試験は、Maxisorp U96 プレート (Polylabo) で行う。リン酸緩衝液 pH 4.5中のタンパク質を、4℃で一晩プレート上でインキュベートする。MPBS緩衝液(8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 0.24 g/L KH₂PO₄, 5%スキムミルク, HClでpH 7.4に調整)中で飽和後、タンパク質を、ウサギ1次抗体と1時間インキュベートする。次いで、ペルオキシダーゼと結合した、ウサギFcフラグメントに特異的なヤギ抗体(Cappel)と1時間インキュベートする。発色は、H₂O₂, 100 mMクエン酸, 50 mM NaOH, 0.2 mg/mL ABTS (Boehringer)の存在下で行う。吸光度を405 nmで読む。

【0084】

希釈しなければ、抗Tat Eli血清は全てのTat変異体又は誘導体を認識できる。

【0085】

3) ウエスタンブロッティングのための材料及び方法

ウエスタンブロッティング: まず、3 M Tris-HCl, pH 8.8, 5% -メルカプトエタノール, 2% SDS, 10%グリセロール, プロモフェノールブルーの存在下で、タンパク質を変性させる。それらを15%ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動で分離する。次いで、免疫検出によって示されるように、該タンパク質をニトロセルロース膜上にトランスファーする。5%スキムミルク

クを含むPBS溶液(8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, 0.24g/L KH₂PO₄, HClでpH7.4に調整)で、特定の部位をブロッキングする。ニトロセルロース膜を、ウサギ1次抗体と1時間インキュベートする。次いで、ペルオキシダーゼと結合した、ウサギFcフラグメントに特異的なヤギ抗体(Sigma)とインキュベートする。発色は、H₂CO₂, PBS, ジアミノベンズアミジンの存在下で行う(ゲル写真は、本発明では示さず)。

【0086】

4) 図8に対応する材料及び方法

トランス活性化は、図5に関して記載したプロトコルに従い、HIV-1LTRと β -ガラクトシダーゼタンパク質のレポーター遺伝子(LacZ)でトランスフェクトされたヒトHeLa細胞を用いて測定する。

【0087】

血清は、図7に関して記載したプロトコルに従い、ウサギから得る。

【0088】

100 μ Lの3つの抗Tat血清、即ち、抗Tat Eli、抗Tat Oyi、抗Tat Bru cmCを希釈倍率を上げながら、細胞培養培地に加え、次いで、100 μ LのTat Eli変異体を1又は5 μ M加える。それ故、 β -ガラクトシダーゼの細胞質蓄積は、Tatの存在に依存する。

【0089】

第1に、同一希釈では、抗Tat Eli血清が最も効果的であることが観察される。このことは論理にかなう。該血清は、トランス活性化活性を中和することが求められているものと同じ変異体に対して産生される抗体を含むからである。しかし、Tat OyiがTat Eliのトランス活性化活性を顕著に中和する抗体を産生できることは、強調されるべきである。事実、この阻害は、特に、抗Tat Bru cmC血清を用いて1/10希釈の場合に観察される阻害よりも大きい。このことにより、他のTat変異体に対する抗Tat Oyi抗体の利点を確認される。

【0090】

参考文献

Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L., & Sonigo, P. (1986) *Cell* **46**, 63-74

Barany, G. & Merrifield, R.B. (1980) in Gross, E., & Meinhofer, J. (Eds) *The peptide : Analysis, Synthesis, Biology*. Academic Press, New York, Vol. 2, pp 1-284

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983) *Science* **220**, 868-871

Clavel, F. & Charneau, P. (1994) *J. Virol* **68**, 1179-1185

Corpet, F. (1989) *Nucl. Acid. Res.* **22**, 10881-10890.

Delaporte E., Janssens W., Peeters M., Buve A., Dibanga G., Perret J.L., Ditsambou V., Mba J.R., Courbot M.C., Georges A., Bourgeois A., Samb B., Henzel D., Heyndrickx L., Franssen K., van der Groen G., Larouze B. (1996) *AIDS* **8**, 903-910

Grégoire, C. & Loret, E.P. 1996. *J. Biol. Chem.* **271**, 22641-22646

Huet, T., Dazza, M.C., Brun-Vezinet, F., Roelants, G.E. & Wain-Hobson, S. 1989 *AIDS* **3**, 707-715

Jeang, K.T. (1996) in Los Alamos National Laboratory (Ed) *HIV-1 Tat: Structure & Function Human Retroviruses & AIDS compendium*. III, pp 3-18

Jeang, K.T., Xiao, H., & Rich, E.A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28837-28840.

Le Buanec, H., Lachgar, A., Bizzini, B., Zagury, J.F., Rappaport, J., Santagostino, E., Muca-Perja, M. & Gringeri, A. 1998. *Biomed. Pharmacother* **10**, 431-435

O'Brien, W.A., Koyanagi, Y., Namazie, A., Zhao, J.Q., Diagne, A., Idler, K., Zack, J.A. & Chen, I.S. (1990) *Nature* **348**, 69-73

Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M. & Krammer, P.H. 1995 *Nature* **375**, 497-500

Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M. & Ho, D.D. (1998) *Nature* **391**, 594-597

【図面の簡単な説明】

【図1】

種々のTatタンパク質の比較。図1A：Tatタンパク質のアミノ酸配列。
図1B：MULTALINプログラムを用いた、Tatタンパク質のサイズと、
それらが含む変異の関数としてのTatタンパク質の分類。

【図2】

HIV-Oyi変異体のTatタンパク質の配列。

【図3】

280nmにおける、C8グラフトドカラムを用いた逆相高速液体クロマト
グラフィーによる6つのTat変異体の精製。

【図4】

電気泳動による、ヌクレオチド標的TARに対する合成Tatのアフィニティ
定数の測定。

【図5】

HeLa細胞に対する合成Tatタンパク質のトランス活性化の試験。

【図6】

Tat Z2 (白三角)、Tat Oyi (黒三角)、Tat Bru (白円

)、Tat Bru cmC (記号無し)、Tat Jr (黒円)、Tat Mal (白四角)、Tat Eli (黒四角) 変異体の二色性スペクトル。

【図7】

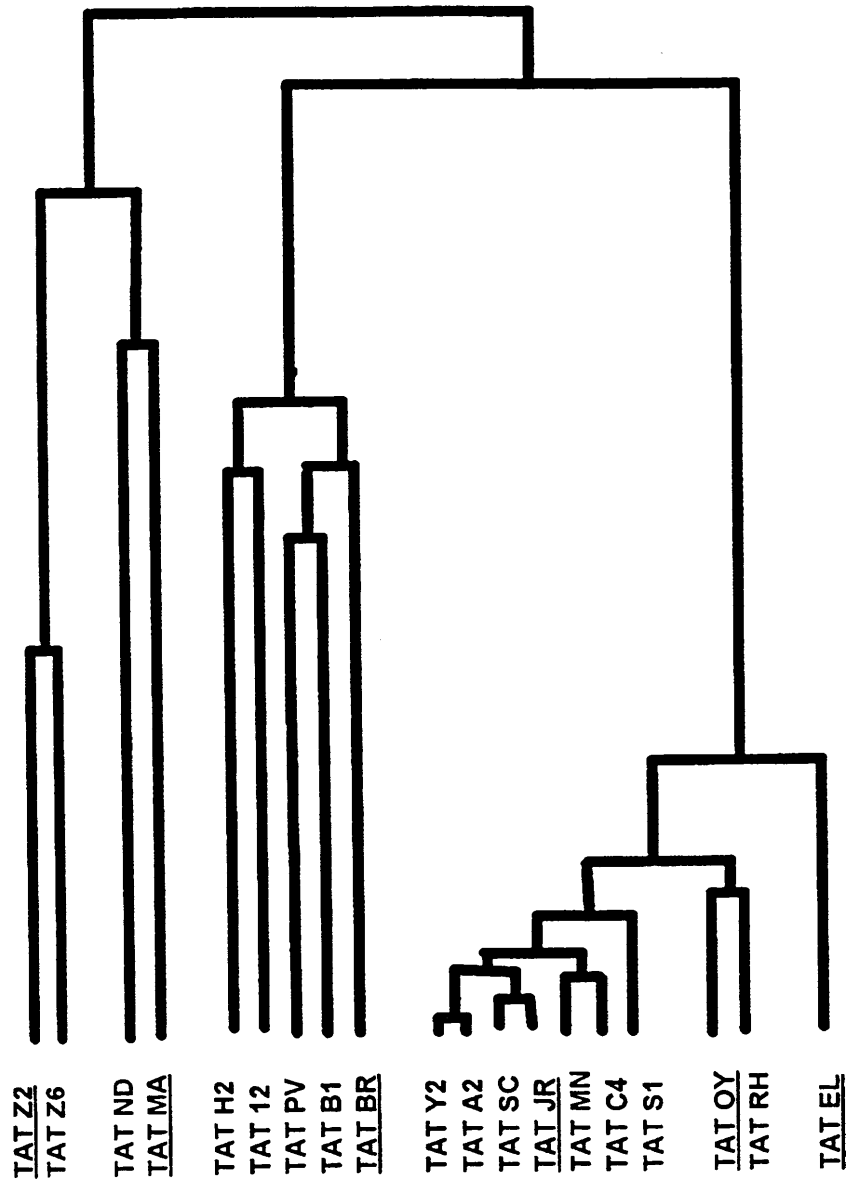
変性条件下、Tatタンパク質の7つの変異体に関し、3つのウサギポリクローナル血清(抗Tat Bru cmC、抗Tat Oyi、抗Tat Eli)の希釈液を用いて行われたELISA試験。

【図8】


抗Tat Eli血清、抗Tat Oyi血清、抗Tat Bru cmC血清による、Tat Eliによるトランス活性化の阻害。

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
TAT_HV1Z2	MDPVDPNIEPW	HFGSQPKTAC	NRCHCKKCCY	HCQVCEITK	GLGISYGRKR	RRRPSGGG	QTHQDDIIPK	QSSQPRGD	PTGPKE	86
TAT_HV1Z6	L.....	R.....	K.....	M.....	K.P.D.A.V..	E.....	S.....	N.....	86
TAT_HVIND	L.S.....	R.P.K.Y.....	K.....	M.....	K.P.D.A.V..	E.....	S.....	N.....	86
TAT_HV1MA	L.....	R.P.K.Y.....	K.....	M.....	K.P.D.A.V..	E.....	S.....	N.....	87
TAT_HV1H2	E.....	RL.K.....	TN.Y.....	F.....	A.....	AH.NS.....	ASLS.....	T.S.....	86
TAT_HV1I2	E.....	RL.K.....	TN.Y.....	F.....	A.....	AP.S.....	VSL.....	T.S.....	86
TAT_HV1PV	E.....	RL.K.....	TN.Y.....	F.....	A.....	P.S.....	VSL.....	T.S.....	86
TAT_HV1B1	E.....	RL.K.....	TN.Y.....	F.....	A.....	P.S.....	VSL.....	T.S.....	86
TAT_HV1BR	E.....	RL.K.....	TT.Y.....	F.....	T.A.....	P.S.....	VSL.....	T.....	86
TAT_HV1Y2	E.....	L.K.....	R.N.Y.....	E.....	TK.....	P.DS.....	SSL.....	T.L.....	T.SKKKVERETETDPVH	101
TAT_HV1A2	E.....	L.K.....	R.N.Y.....	E.....	TR.....	AP.DS.....	ASLS.....	A.S.....	T.SKKKVERETETDPFD	101
TAT_HV1SC	E.....	RL.K.....	A.TS.Y.....	F.....	T.....	AP.DS.....	VSL.....	A.A.....	SKKKVERETETDPD	101
TAT_HV1JR	E.....	SL.K.....	TN.Y.....	L.....	T.....	P.DS.....	VSL.....	Q.....	SKKKVERETETDPD	101
TAT_HV1MN	E.....	RL.K.....	TT.Y.....	F.....	TK.A.....	APEDS.....	VSL.....	AP.F.....	SKKKVERETETHPVD	101
TAT_HV1C4	E.....	RL.K.....	TN.Y.....	F.....	TK.A.....	AH.DS.N.....	ASLS.....	T.....	PKKEVEREAETDPLD	101
TAT_HV1S1	E.....	RL.K.....	TN.Y.....	F.....	TK.A.....	APPDSEV.....	VSL.....	A.Q.....	SKKKVERETETDPVH	101
TAT_HV1OY	E.....	RL.K.....	S.N.Y.R.L.....	TK.....	TK.....	AP.DSK.....	VSL.....	A.....	SKKKVERETETDPED	101
TAT_HV1RH	E.....	RL.K.....	N.Y.....	L.....	L.....	G.P.S.....	VSL.....	T.....	SKEKVERETETDPAVQ	102
TAT_HV1EL	L.....	R.P.K.....	P.....	LN.....	G.P.....	A.V.....	QKKKVESEAEITDP	99

【図1B】

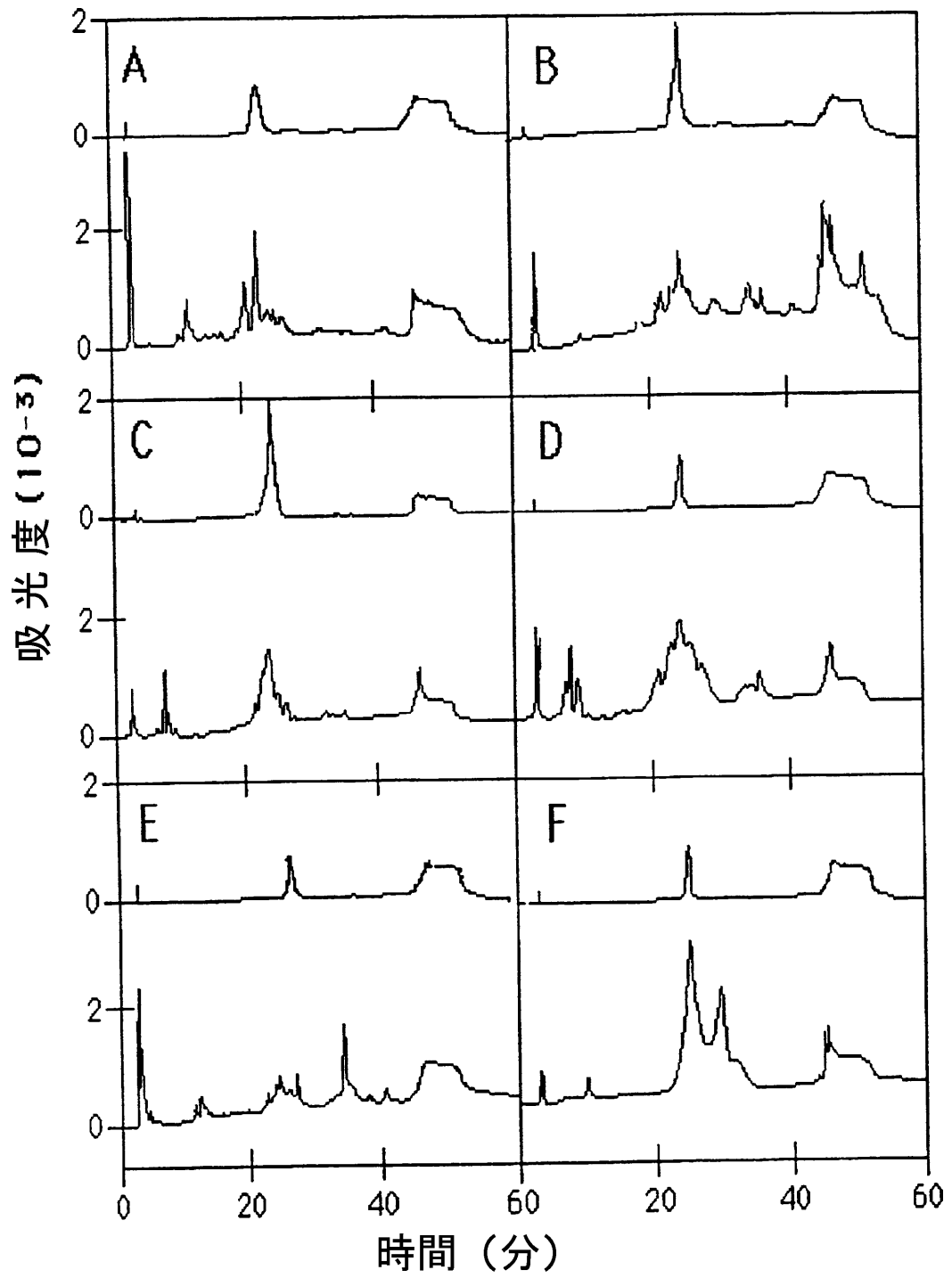


1B

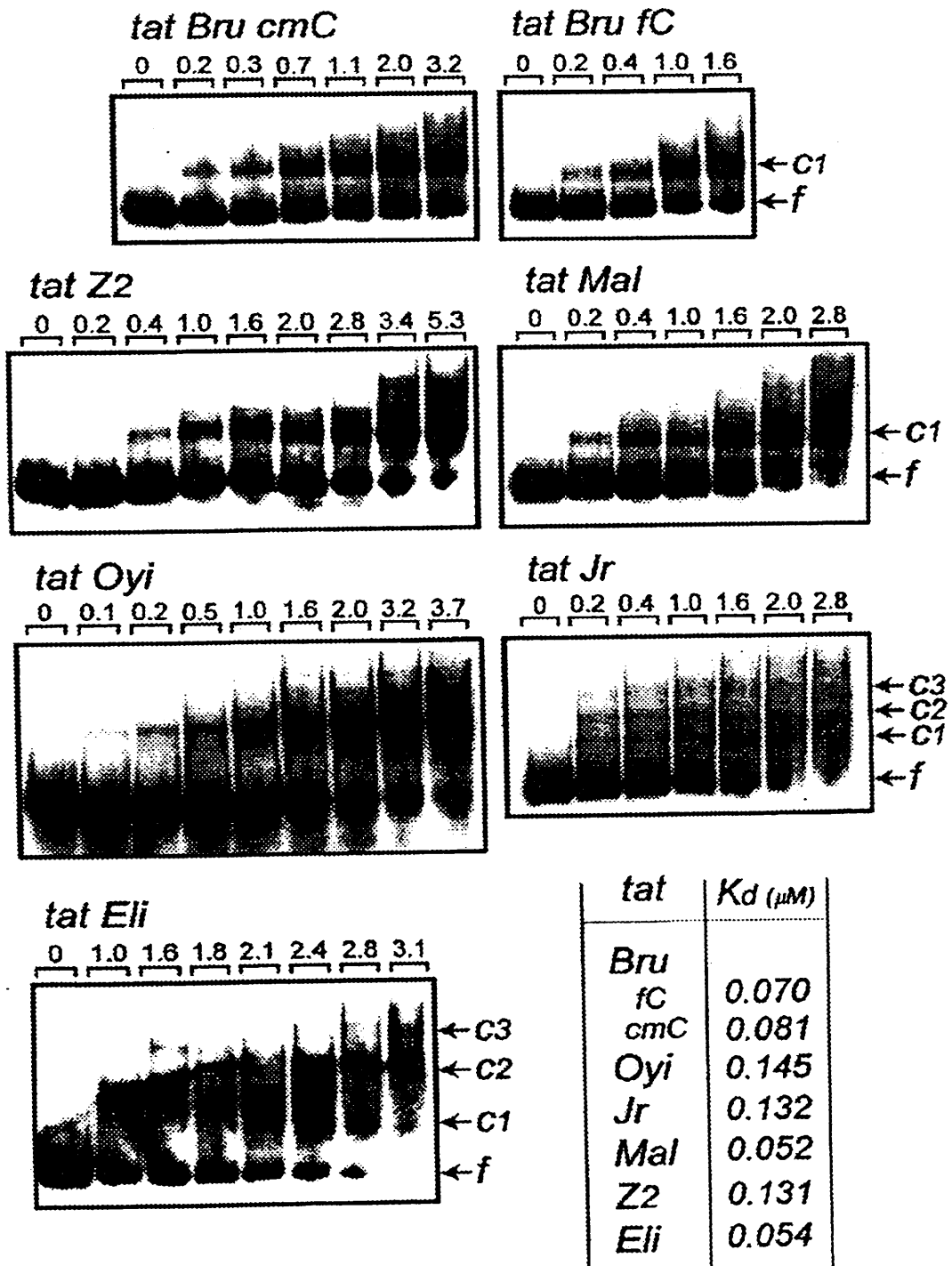
【 2】

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

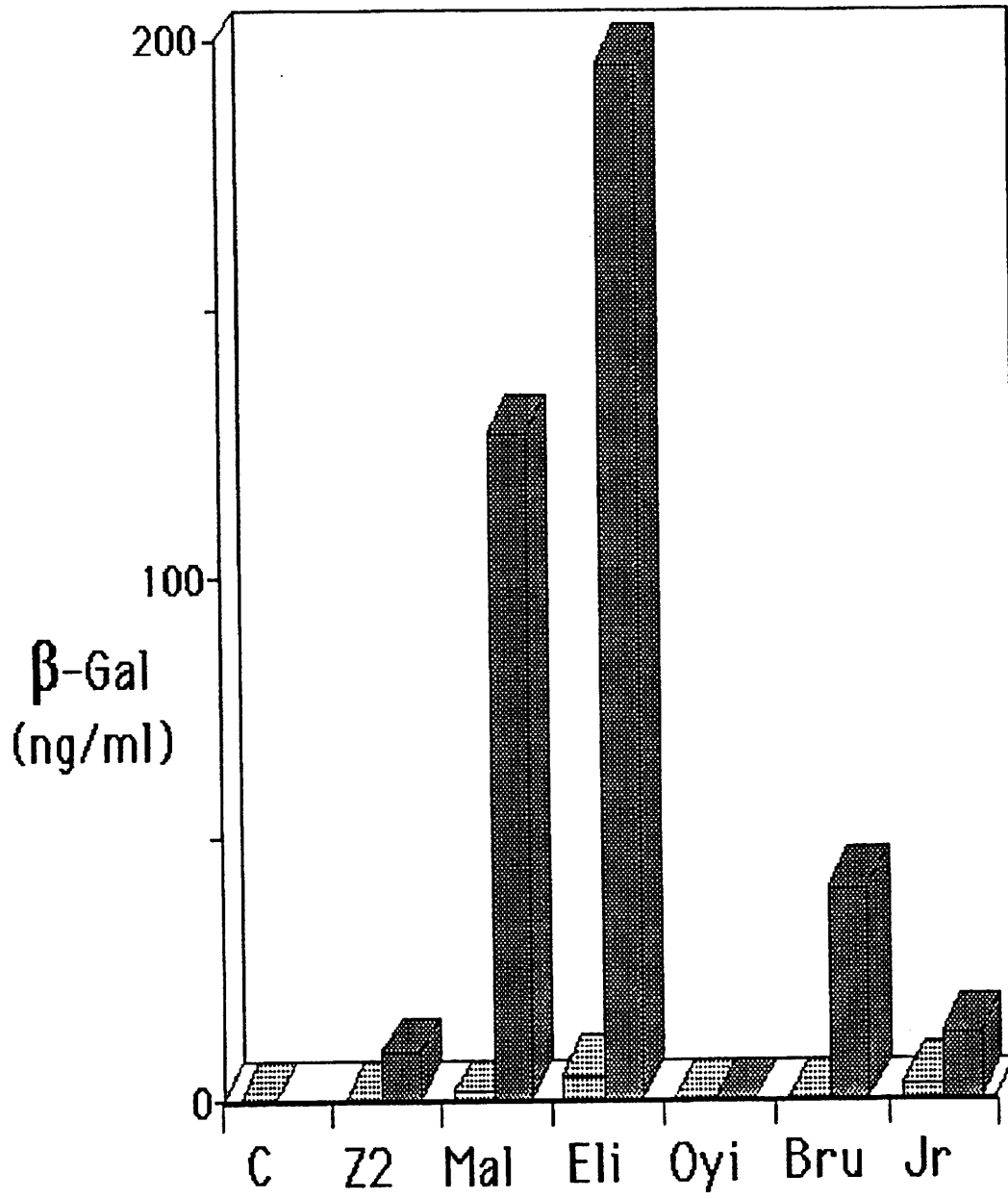
【圖3】



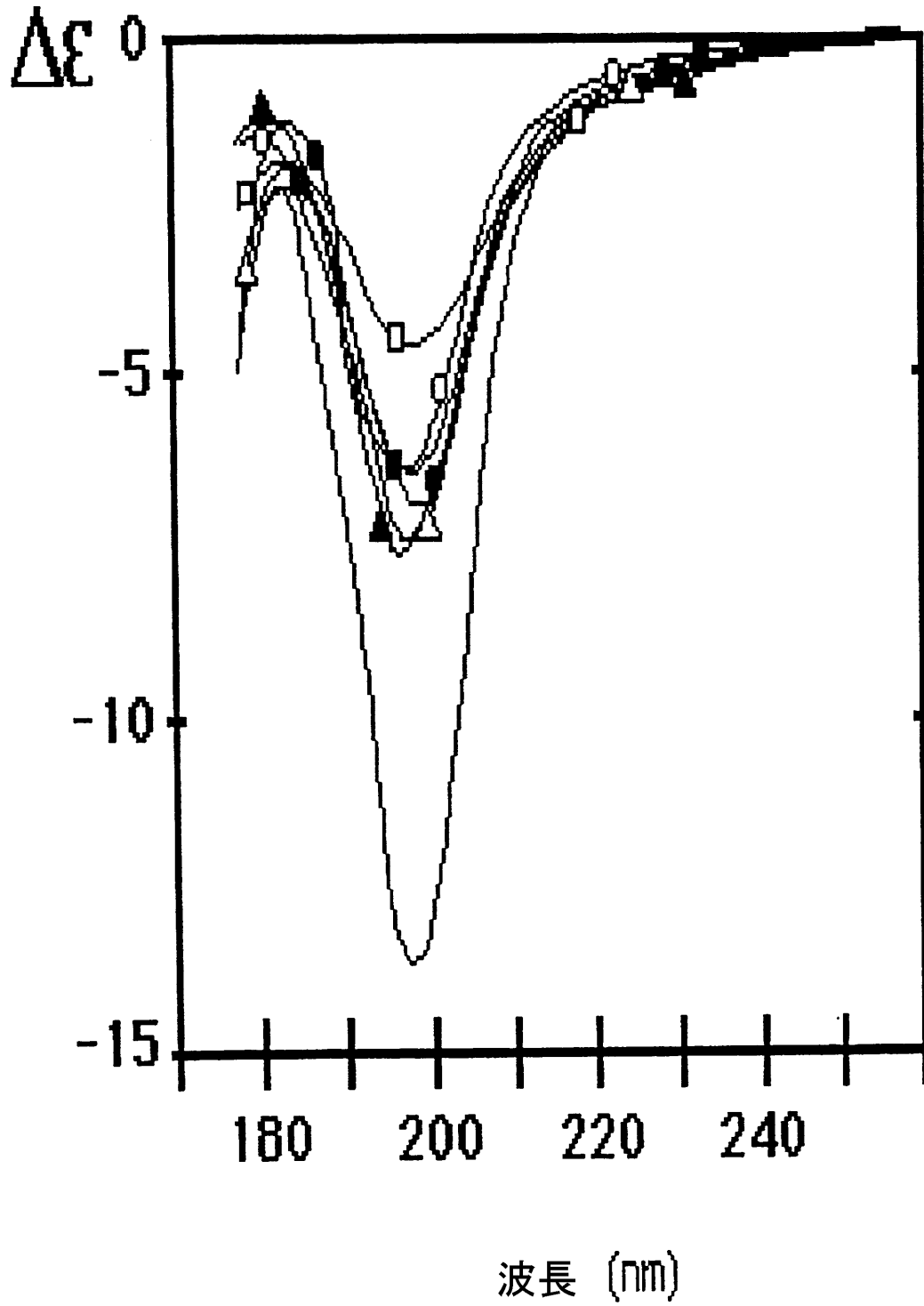
【図4】



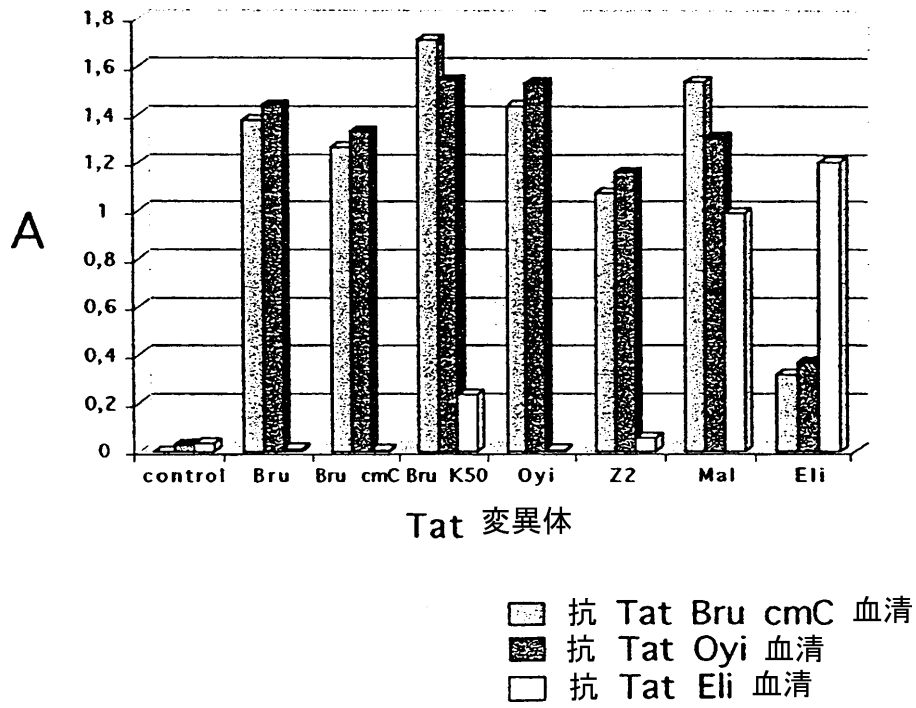
【図5】



【図6】

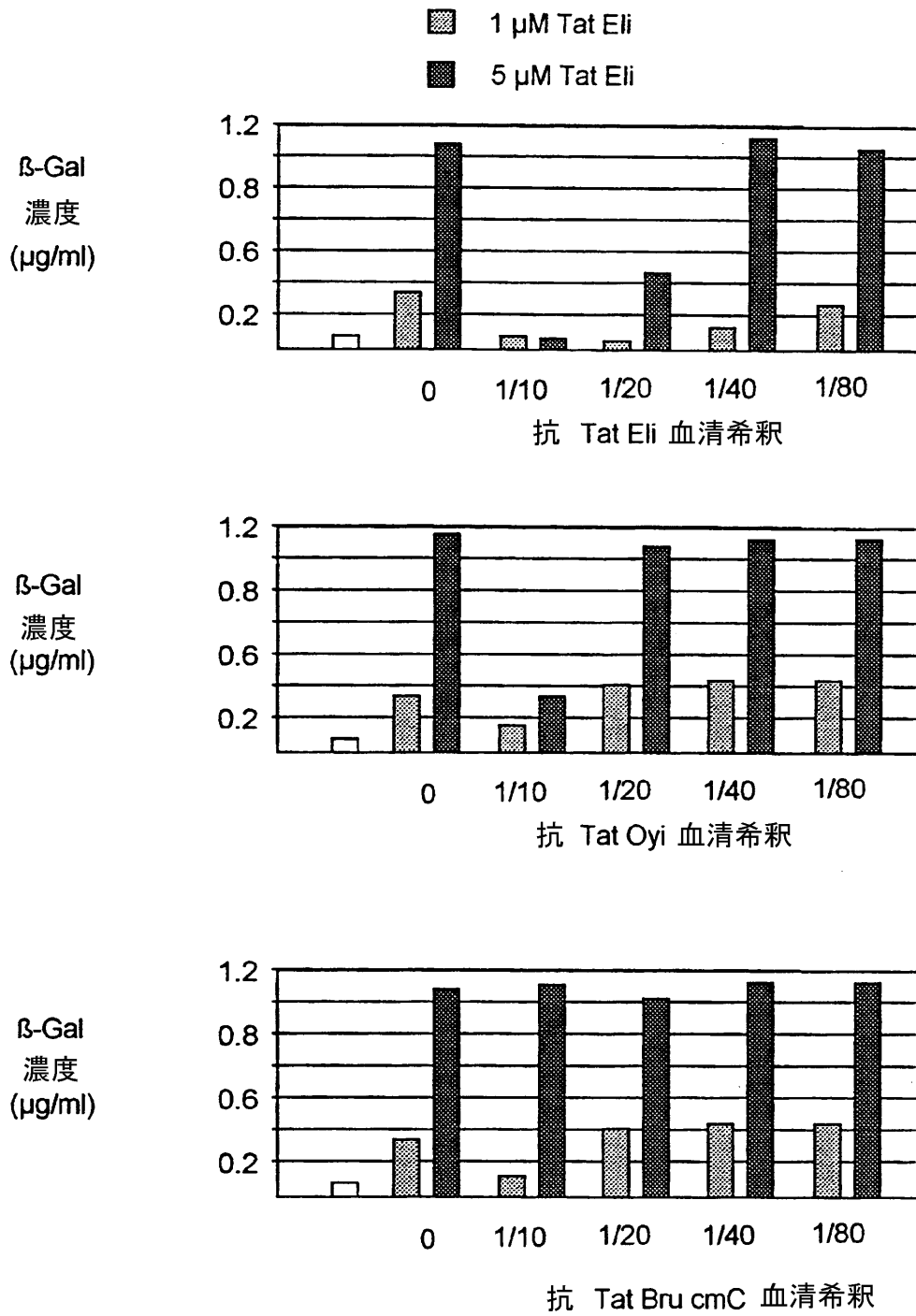


【図7】



【図8】

トランス活性化の阻害



【手続補正書】特許協力条約第19条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年12月8日(2000.12.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 医薬上許容され得る賦形剤及び、適宜、1種以上の適切な免疫アジュバントと組み合わせて、T a r と結合できるが、トランス活性化ができない少なくとも1種のH I V - 1 T a t タンパク質の全体又は一部を含有する抗H I V - 1 ワクチン。

【請求項2】 T a t タンパク質が99乃至106個のアミノ酸を含むことを特徴とする請求項1に記載のワクチン。

【請求項3】 T a t タンパク質が、そのヌクレオチド配列が、機能的なT a t のヌクレオチド配列と比較して、少なくとも一つの変異を有するT a t であることを特徴とする請求項1又は2に記載のワクチン。

【請求項4】 変異が、T a t タンパク質のシステインの少なくとも一つに作用することを特徴とする請求項3に記載のワクチン。

【請求項5】 T a t タンパク質が、H I V - 1 O y i 変異体のT a t 又はこのT a t の一部であることを特徴とする請求項1乃至4に記載のワクチン。

【請求項6】 T a t タンパク質が化学合成T a t であることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項7】 T a t が固相で合成されることを特徴とする請求項6に記載のワクチン。

【請求項8】 T a t タンパク質が組換えT a t であることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項9】 T a t の全体又は一部ののためのヌクレオチド配列と、その発現のために必要な要素とを含む発現ベクターを含むことを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載のワクチン。

至5のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項10】 Tat配列の少なくともN末端領域及び/又は塩基性領域を含むことを特徴とする請求項1乃至9のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項11】 TatのC末端に位置するArg-Gly-Asp領域が改変されていることを特徴とする請求項1乃至7のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項12】 幾つかのTat変異体を認識できる抗Tatポリクローナル抗体の製造方法であって、

- 免疫応答アジュバントと組み合わせて、請求項6において定義されているようなTatタンパク質又はこのTatタンパク質のある一部を注射することによって、動物を免疫化すること、
 - 該免疫化した動物の血清に含まれる特異的抗体を精製すること、
- を含む方法。

【請求項13】 免疫化工程で使用されるTatタンパク質又はTatタンパク質の一部が、Oyi又はBrucmC変異体に対応することを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 生体試料中の、Tatタンパク質又はTatタンパク質の一部の存在の検出方法であって、

- 該試料を、幾つかのTat変異体と抗原-抗体複合体を生じさせることができる抗Tat抗体と接触させること、
 - 該抗原-抗体複合体の存在を測定すること、
- を含む方法。

【請求項15】 生体試料中のTatタンパク質又はTatタンパク質の一部の存在を測定することによる、HIV感染の診断用キットであって、

- 免疫学的反応に適した媒質の調製のための試薬、
 - 免疫学的反応によって産生される抗原-抗体複合体の検出を可能とする試薬、
 - 任意で、抗原を含まない参照生体試料(陰性対照)、
 - 任意で、所定量の抗原を含む参照生体試料(陽性対照)、
- を含むキット。

【請求項16】 免疫学的反応に適した媒質を調製するための試薬が、請求項14に記載の抗体を含むものである請求項15に記載のキット。

【請求項17】 FMO Cタイプ、好ましくはf a s t FMO Cタイプの保護基を使用することを特徴とする請求項1乃至5、10及び11のいずれか1項に記載のT a t 変異体の合成方法。

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年3月13日(2001.3.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 医薬上許容され得る賦形剤及び、適宜、1種以上の適切な免疫アジュバントと組み合わせて、TARと結合できるが、トランス活性化ができない、99乃至106個のアミノ酸を含む少なくとも1種のHIV-1 Tatタンパク質の全体又は一部を含有する抗HIV-1ワクチン。

【請求項2】 Tatタンパク質が、そのヌクレオチド配列が、機能的なTatのヌクレオチド配列と比較して、少なくとも一つの変異を有するTatであることを特徴とする請求項1に記載のワクチン。

【請求項3】 変異が、Tatタンパク質のシステインの少なくとも一つに作用することを特徴とする請求項2に記載のワクチン。

【請求項4】 Tatタンパク質が、HIV-1 Oyi変異体のTat又はこのTatの一部であることを特徴とする請求項1乃至3に記載のワクチン。

【請求項5】 Tatタンパク質が化学合成Tatであることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項6】 Tatが固相で合成されることを特徴とする請求項5に記載のワクチン。

【請求項7】 Tatタンパク質が組換えTatであることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項8】 Tatの全体又は一部のためのヌクレオチド配列と、その発現のために必要な要素とを含む発現ベクターを含むことを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項9】 Tat配列の少なくともN末端領域及び/又は塩基性領域を

含むことを特徴とする請求項1乃至8のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項10】 TatのC末端に位置するArg-Gly-Asp領域が改変されていることを特徴とする請求項1乃至6のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項11】 幾つかのTat変異体を認識できる抗Tatポリクローナル抗体の製造方法であって、

- 免疫応答アジュバントと組み合わせて、請求項5に記載のTatタンパク質又はこのTatタンパク質の一部を注射することによって、動物を免疫化すること

、

- 該免疫化した動物の血清に含まれる特異的抗体を精製すること、
を含む方法。

【請求項12】 免疫化工程で使用されるTatタンパク質又はTatタンパク質の一部が、Oyi又はBrucmC変異体に対応することを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】 生体試料中の、Tatタンパク質又はTatタンパク質の一部の存在の検出方法であって、

- 該試料を、幾つかのTat変異体と抗原-抗体複合体を生じさせることができる抗Tat抗体と接触させること、

- 該抗原-抗体複合体の存在を測定すること、
を含む方法。

【請求項14】 生体試料中のTatタンパク質又はTatタンパク質の一部の存在を測定することによる、HIV感染の診断用キットであって、

- 抗原-抗体反応に適した媒質の調製のための試薬、
- 免疫学的反応によって産生される抗原-抗体複合体の検出を可能とする試薬、
- 任意で、抗原を含まない参照生体試料（陰性対照）、
- 任意で、所定量の抗原を含む参照生体試料（陽性対照）、
を含むキット。

【請求項15】 免疫学的反応に適した媒質を調製するための試薬が、請求項13に記載の抗体を含むものである請求項14に記載のキット。

【請求項16】 FMOCタイプ、好ましくはfast FMOCタイプの保護基を使用することを特徴とする請求項1乃至4、9及び10のいずれか1項に記載のTat変異体の合成方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 00/00938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/21 C07K14/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, PAJ, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 891 994 A (GOLDSTEIN GIDEON) 6 April 1999 (1999-04-06) column 2, line 60 - column 3, line 4; claim 18 column 3, line 24 - line 26 column 4, line 36 - line 58 column 12, line 16 - line 57	12, 14-17
X	DE 195 14 089 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 24 October 1996 (1996-10-24) column 1, line 17 - line 28; claim 1 --- -/-	16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *B* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 September 2000		Date of mailing of the international search report 18/10/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Paternitaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Charles, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 00/00938

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOLDSTEIN G: "HIV - 1 Tat protein as a potential AIDS vaccine." NATURE MEDICINE, (1996 SEP) 2 (9) 960-4. REF: 34, XP002129594 page 961, column 2, paragraph 1 - paragraph 2	1
X	page 962, column 2, paragraph 1 page 963, column 1, paragraph 5 -column 2, paragraph 2	16
X,P	PELOPON ESE J M JR ET AL: "Full peptide synthesis, purification, and characterization of six Tat variants. Differences observed between HIV-1 isolates from Africa and other continents." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1999 APR 23) 274 (17) 11473-8., XP002129596 page 11473, column 2, paragraph 4 page 11477, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 1	1-7, 10-18
X,P	LEFEVRE E A ET AL: "Cutting edge: HIV-1 Tat protein differentially modulates the B cell response of naive, memory, and germinal center B cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 AUG 1) 163 (3) 1119-22., XP002129595 page 1119, column 2, paragraph 2 page 1122, column 1, paragraph 2 - paragraph 3	1-5, 10-17
X,P	CASELLI E ET AL: "DNA immunization with HIV - 1 tat mutated in the trans activation domain induces humoral and cellular immune responses against wild-type Tat." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 MAY 1) 162 (9) 5631-8., XP002129597 page 5632, column 1, paragraph 1 - paragraph 2 page 5632, column 2, paragraph 2 page 5633, column 2, paragraph 1 page 5635, column 1, paragraph 1 -page 5636, column 1, paragraph 2	1-4,6,8, 10-12, 14-17
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00938

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	T. HUET ET AL.: "A HIGHLY DEFECTIVE HIV-1 STARIN ISOLATED FROM A HEALTHY GABONESE INDIVIDUAL PRESENTING AN ATYPICAL WESTERN BLOT" AIDS, vol. 3, 1989, pages 707-715, XP000867752 cited in the application page 708, column 1, paragraph 1 page 712, column 2, paragraph 1 - paragraph 2 ---	1-5, 10, 11
A	H. LE BUANEC ET AL.: "A PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC AIDS VACCINE CONTAINING AS A COMPONENT THE INNOCUOUS TAT TOXOID" BIOMED & PHARMACOTHER, vol. 52, 1998, pages 431-435, XP000867754 cited in the application the whole document ---	1-3, 12, 14
A	US 5 889 175 A (MEHTALI MAJID ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) column 1, line 5 - line 12; claims 1,9-11; table 1 column 2, line 23 - line 37 column 3, line 1 - line 16 column 3, line 27 - line 35 column 3, line 48 -column 4, line 47 column 7, line 53 -column 8, line 15 ---	1-3, 10
A	GREGOIRE C J ET AL: "Conformational heterogeneity in two regions of TAT results in structural variations of this protein as a function of HIV-1 isolates." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 SEP 13) 271 (37) 22641-6., XP002129593 cited in the application page 22641, column 2, paragraph 1 -page 22642, column 1, paragraph 1 page 22645, column 1, paragraph 1 ---	1-5, 10
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 RE M C ET AL: "Effect of antibody of HIV-1 tat protein on viral replication in vitro and progression of HIV-1 disease in vivo." Database accession no. PREV199698593925 XP002148917 abstract & JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES AND HUMAN RETROVIROLOGY, vol. 10, no. 4, 1995, pages 408-416, ISSN: 1077-9450 ---	1, 15-17
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 00/00938

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1990 BRAKE D A ET AL: "CHARACTERIZATION OF MURINE MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE TAT PROTEIN FROM HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1" Database accession no. PREV199089070184 XP002148918 abstract & JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 64, no. 2, 1990, pages 962-965, ISSN: 0022-538X</p>	15-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00938

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5891994 A	06-04-1999	AU 8392798 A	08-02-1999
		EP 0994724 A	26-04-2000
		WO 9902185 A	21-01-1999
DE 19514089 A	24-10-1996	WO 9632646 A	17-10-1996
		EP 0820595 A	28-01-1998
		JP 11503524 T	26-03-1999
US 5889175 A	30-03-1999	FR 2700169 A	08-07-1994
		AU 668441 B	02-05-1996
		AU 5280393 A	14-07-1994
		CA 2112652 A	05-07-1994
		EP 0614980 A	14-09-1994
		JP 6234791 A	23-08-1994

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
C 0 7 K 14/16	Z N A	C 0 7 K 16/10	
		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53			H
		33/569	
		A 6 1 K 37/02	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
Fターム(参考)	4C084 AA02 BA02 BA08 BA20 BA21 BA23 CA01 CA59 DC50 MA01 NA01 ZB332 ZC551		
	4C085 AA03 AA38 BA69 CC08 CC21 CC32 EE01 EE06 FF24		
	4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 DA75 DA86 EA29 FA34 FA50 FA71		

