

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4500541号  
(P4500541)

(45) 発行日 平成22年7月14日(2010.7.14)

(24) 登録日 平成22年4月23日(2010.4.23)

(51) Int.Cl.		F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/155 (2006.01)	C O 7 K 14/155	
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

請求項の数 13 (全 52 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)
(65) 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)
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/026543
(87) 国際公開番号	W02003/016333
(87) 国際公開日	平成15年2月27日(2003.2.27)
審査請求日	平成17年7月26日(2005.7.26)
(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)

(73) 特許権者	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 212 02, バルチモア, 701 イー. プラ ット ストリート, 스위트 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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

H I V 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、  
前記ウイルススコートポリペプチドが変異フェーリン開裂部位を含む g p 1 2 0 であり、  
前記ウイルスス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、該ウイルス  
ス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おり、  
前記受容体ポリペプチド配列が C D 4 模倣物であり、  
前記キメラポリペプチドが、配列番号：6 のアミノ酸配列を含む、  
前記キメラポリペプチド。

【請求項2】

前記ウイルススコートポリペプチド配列が、配列番号：30 である、請求項1 に記載のキ  
メラポリペプチド。

【請求項3】

前記受容体ポリペプチド配列が、配列番号：20 である、請求項1 に記載のキメラポリ  
ペプチド。

【請求項4】

前記 g p 1 2 0 ポリペプチド配列が、アルギニンをトレオニンに置換することによって

、フューリン開裂部位で変異している、請求項 1 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 5】

異種ドメインをさらに含み、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 1 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 6】

前記異種ドメインが、配列番号：32 である、請求項 5 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 7】

薬学的に許容可能な担体をさらに含む、請求項 1 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 8】

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

10

【請求項 9】

前記核酸配列が、配列番号：5 である、請求項 8 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記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：29 である、請求項 8 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

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：19 である、請求項 10 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 8 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含有する宿主細胞。

20

【請求項 13】

請求項 11 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含有する宿主細胞。

【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。

30

【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。

40

【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

50

る免疫付着因子 (immuno adhesion)、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. Acad. 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<sub>DH12</sub>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<sub>DH12</sub>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 (Masciola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) 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

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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 ( i n t a c t c e l l ) の表面上に存在しうる。この方法は、H I V、S I V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。

#### 【 0 0 1 5 】

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 ( i n v i t r o または i n v i v o 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 】

#### 【 0 0 1 6 】

発明の詳細な説明

本発明は、H I V エンベロープポリペプチドおよび C D 4 受容体を含む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、C D 4 に結合する H I V g p 1 2 0 は、H I V が細胞上に存在する C D 4 に結合すると生じる、エンベロープタンパク質 - C D 4 遷移状態を再現し、g p 1 2 0 は、複合体形成時に曝露され、かつコレセプターである C C R 5 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 - C D 4 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 H I V 感染における重要な工程である。したがって、例えば、g p 1 2 0 - C D 4 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 g p 1 2 0 - C D 4 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 H I V 感染からの保護も仲介しうる。

#### 【 0 0 1 7 】

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、C C R 5 への免疫不全ウイルスのエンベロープポリペプチド C D 4 複合体を抑制し、阻害し、または防止する物質が、H I V 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。

#### 【 0 0 1 8 】

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。かかる特異的な抗体は、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。

#### 【 0 0 1 9 】

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むキメラポリペプチドは、i n v i v o 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

10

20

30

40

50

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、スパ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に、十分な長さのアミノ酸を有するスパ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、ハンタールウイルス、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）、バルボウイルス科（バルボウイルス）、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

10

20

30

40

50

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。

10

【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）」、エックアルト・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）。

20

【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)	フーパー(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(Klatzmalm)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( $\alpha$ 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)
$\alpha v\beta 3$ (ビプロネクチン)	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)

10

20

30

【 0 0 2 6 】

【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 (ピコナウイルス科) A 亜群トリ白血 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( $\alpha-1$ ) 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)	ウイレット(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)
高アフィニティラーミン受容体	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	バルボウイルス B19 (バルボウイルス科)	ブラウン(Brown)ら(1993年)
BLVRop.1	ウシ白血球ウイルス (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)とスピーア(Spear) (1989年)

10

20

30

40

## 【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CXCR

50

R4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、STRL33/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。

10

【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エンベロップ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。

20

【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ッ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、エンベロッ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、エンベロップポリペプチド配列は、gp120、gp160、またはgp41である。

30

【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。

40

【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

50

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H I V g p 1 2 0およびC D 4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。

**【 0 0 3 5 】**

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。

**【 0 0 3 6 】**

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、C D 4 D 1およびD 2ドメインであり、これらはH I V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、T c S cにおける)を欠く切断型H I V g p 1 2 0である。

**【 0 0 3 7 】**

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、H I V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C D 4配列である。本明細書で例示されているように、切断型H I V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g p 1 2 0であり、切断型C D 4ポリペプチドはD 1およびD 2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C D 4ポリペプチド配列である。

**【 0 0 3 8 】**

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、または誘導體化が含まれる。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。

**【 0 0 3 9 】**

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、複数の機能を有しうる。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 g l u - g l n - l y s - l e u - i l e - s e r - g l u - g l u - a s p - l e u、（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ポリペプチドのフェ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、ウイルスコート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

10

20

30

40

50

、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KKVVLGKKGD T V E L T C T A S Q K K S I Q F H W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CNLARCLRCKSLGLLGKCA G S F C A C G P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の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

10

20

30

40

50

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。

10

## 【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、FLS C R / Tは、改変FLS C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。

20

## 【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。

30

## 【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。

40

## 【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

50

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-R/Tのヌクレオチド配列は、配列番号：29およびCD4 D1D2（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を追加的に含む。

#### 【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CD4 D1D2（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RNA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、バクタ

10

20

30

40

50

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。

10

#### 【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。

20

#### 【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）。

30

40

#### 【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

50

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、適度にストリンジेंट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（低ストリンジेंटな洗浄）、約42℃下に0.5×SSC/0.1%SDS（適度に高ストリンジेंटな洗浄）が挙げられる。適度に高いストリンジエンス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（適度に高ストリンジेंटな洗浄）。高いストリンジエンス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（高い嚴重洗浄）。

10

## 【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-リボ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、不活性ピ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、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。

20

## 【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み込まれている場合、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み込みによって操作されうる当業界で周知の他の媒体を指す。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、ピター（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。

30

40

## 【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

50

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。

10

【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な追加のDNA配列も含みうる。

【0072】

20

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。

30

【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)。

40

【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

50

)、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92/14829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(Mossmann)ら、J Virol.、1996年(70)、p.19.53~60)、またはサルモネラ(R.ポウエル(Powell)ら著、感染症の管理のための分子手法(Molecular Approaches to the control of infectious diseases)(p.183~187)所収、F.ブラン(Bran)、E.ノルビイ(Norrby)、D.パートン(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、ベクターは細胞当たり約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(Expression 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

10

20

30

40

50

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 Practical 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。

10

## 【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。

20

## 【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。

30

## 【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

40

50

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（オルニチ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、当業界で公知の方法を用いてCaCl<sub>2</sub>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

10

20

30

40

50

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りガンドでありうる。モノクローナル抗体もターゲット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。選択されたりガンドは、プリフォームされたり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. Acta, 1995年(1233), p. 134を参照)。

10

## 【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、オランウータン等)、家畜類などの哺乳動物である。

20

## 【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)。

30

## 【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。

40

## 【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

50

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H I V - 1およびH I V - 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。

10

#### 【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、H I Vエンベロープポリペプチド配列g p 1 2 0は、C D 4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H I V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。

20

#### 【0091】

理論によって束縛されることは望まないが、C D 4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、および特異的变化特性を有する。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、ウィ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。

30

#### 【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、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、およびF v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、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、およびF v）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(K L H)、サイログロブリン、ウシ血清アルブミン(B S A)、および破傷風トキソイドが挙げられる。

40

#### 【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(K o h l e r)ら、N a t u r e、1975年(256)、p. 495、およびハーロー(H a r l o w)ら、A n t i b o d i e s : A L a b o

50

ratory 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) 10  
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) 20  
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) 20  
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  
30  
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 (Morrison) 20  
ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1984年(81)、p. 6851、タケダ (Takeda) 20  
ら、Nature、1985年(314)、p. 452、シンガー (Singer) 20  
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  
40  
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  
50  
ため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、他のウィルス療法と併用することもできる。

10

【0098】

「有効量」は、対象におけるウィルス感染を抑制し、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ィルスに対する免疫反応を導き出す量でありうる。ウィルスにすでに感染した対象に投与される有効量も、ウィルス負荷を減少し、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）対象へのウィ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ィルスに対して生成されうる。

20

【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））。

30

40

【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

50

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み込みによって達成しうる。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、ポラス投与によって（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（Lee）とフェビガー（Febiger）（1990年）、ジェナロ（Genaro）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、HIV gp120-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

10

20

30

40

50

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、ジゴキシンと抗ジゴ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

10

20

30

40

50

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。

10

#### 【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。

20

#### 【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の特徴づけるための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。

30

#### 【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かを検出する）。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。

40

#### 【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

50

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 (ドウオン (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タ (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 - SCBa1 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

10

20

30

40

50

)であり、逆方向プライマーは、GGG - GTT - TAA - ACT - TAT - TAC - A  
GA - TCC - TCT - TCT - GAG - ATG - AGT - TTT - GTT - CAG - C  
TA - 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 (Car  
lsbad, 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 10  
- 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 - CT  
T - CAC - CAC - CTT - GAT - CTT - GTA - CAG - CTC (配列番号：1  
6)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 - GC  
T - GAT - CAG - GCG - GCC - CGC - GCC - GAT - GTT - GAA - GC 20  
T - GCA - GTT - CTT - CAT - CTC - GCC - CGC - GCC - CAG - GG  
T - 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 - C  
TG - GCC - CGC - TGC - CAG - CTG - CGC - TGC - AAG - AGC - C  
TG - GGC - CTG - CTG - GGC - AAG - TGC - GCC - GGC - AGC - T  
TC - 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 - 30  
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N  
ot1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、F  
LSC 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。スパーサー領域 (配列番号：11)およびCD4  
D1D2 (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、C1 C5 V1V2gp120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、F  
LSC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FLS  
C - 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パーサー  
のアミノ酸配列は、GSSGGGSGSGGGGSGGGA (配列番号：11)で  
ある。 40

## 実施例 I I

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-マンハイム（Boehringer-Mannheim））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。5 μg/ml プラスチ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（Abaciglu）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。

10

## 【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、pH 8.3）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、pH 7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HIV gp120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。

20

## 【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パ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；ベーリンガー-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。

30

40

## 【0125】

簡単に言えば、リン酸緩衝食塩水中のD7324 2 μg/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3 μg/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

50

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（Amer sham - 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に結合したエンペローブ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ス（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アリコートをもモノ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ペローブと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てい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

10

20

30

40

50

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)。

10

#### 実施例II I

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、適切に積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のアリコートを手動二通の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。

20

30

#### 【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(バトルズ(Bartl

40

50

es) (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 (1 µg/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-CD4 MA b 45 (パートルズ(ワシントン州イサクアー) (Issaquah, WA)) を用いて代替りのELISAフォーマットを作った。1 µg/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】

10

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、それらのそ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。

20

【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、MA b 45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(IgG1b12、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。

30

【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、ウエスタンプ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-my c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。

40

#### 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

50

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、免疫プ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。

10

#### 【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.ウーラ、Nature、1996年(384)、p.179~183、L.ウーラ、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。

20

#### 【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程度の濃度(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。

30

#### 【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。

40

#### 【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/rsCD4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、

50

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CCR5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 $10^4$  U373/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100 $\mu$ lで置換した。次いで、50TCID<sub>50</sub>のウイルスを含有する追加の培地100 $\mu$ l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 $^{\circ}$ C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に従って、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(Galastostar)(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<sup>2</sup>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<sub>90</sub>)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( $ID_{50} > 10 \mu g/ml$ )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イ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-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し、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プロット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がスパ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コレセプターのいずれかを発現する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

10

20

30

40

50

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<sup>5</sup>/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ことを確認するために、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<sup>4</sup>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50TCID<sub>50</sub>/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に従って、P-ガラクトシダーゼ化学ルミネセンス試薬、ガラク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<sup>2</sup>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<sub>50</sub>とID<sub>90</sub>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	1IgG1b12	対照IgG
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	2G12	2F5	IgG1b12	対照IgG
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-IgG1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、2G1

2、2F5、およびIgG1b12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V I I

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 A c a d S c i I I I、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かを判定するために、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V I I I

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プラスチ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/T CD4M9(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の差はこのプロット

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、このプ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gp120gp41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(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 CDM9に結合し、効率はFLSC-R/Tのものと同様であり、17bエピトープがFLSC-R/T CDM9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g

p 1 2 0 - C D 4 分子である F L S C、F L S C - R / T、および F L S C - R / T C D M 9 が、適切に畳み込まれた g p 1 2 0 - C D 4 複合体を表すことを示している。

#### 実施例 X

本実施例では、C C R 5 - 特異的 H I V エンベロープ配列を含有する g p 1 2 0 - C D 4 キメラ分子の C C R 5 発現細胞への結合を示すデータが記載される。g p 1 2 0 - C D 4 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. V i r o l .、1993年(67)、p. 3978 ~ 3986)、M. A. ボディカ (V o d i c k a) ら、V i r o l .、1977年(233)、p. 193 ~ 198)。したがって、適切に畳み込まれた g p 1 2 0 - C D 4 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、C C R 5 コレセプターに結合する能力である。

10

#### 【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 g p 1 2 0 - C D 4 分子を、C C R 5 を発現するか、またはコレセプターを有さないいずれかのイヌ胸腺細胞、C f 2 T h と相互作用させた。簡単に言えば、g p 1 2 0 - C D 4 一本鎖キメラポリペプチド F L S C - R / T および F L S C - R / T C D M 9 分子を含有する上清を、p E F 6 で 2 9 3 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、C C R 5 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 - g p 1 2 0 M A b、A 3 2 で検出した後、蛍光分子、フィコエリトリンで標識された P E 標識ヤギ抗 - ヒト I g G によって検出した。結合蛍光のレベルは、F A C S キャリバー計器 (ベクトン・ディッキンソン (B e c t o n D i c k i n s o n)) を備えた蛍光活性化細胞選別装置 (F A C S) 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 1 5 に示されている結果は、F L S C - R / T C D 4 M 9 が、C C R 5 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 F L S C - R / T のものと同等であることを示す。

20

#### 実施例 X I

本実施例では、F L S C 接種マウスからの血清による一次 R 5 H I V - 1 (9 2 B R 0 2 0) の中和が記載される。C 5 8 7 B 1 / 6 マウスに対し、コレラ毒素 (C T) 1 0 μ g と混合したマウス 1 匹当たり 2 5 μ g の F L S C 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 1 4 日後、個々のマウスから血清を採集し、一次 R 5 H I V - 1 分離株 9 2 B R 0 2 0 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、5 0 T C I D<sub>50</sub> 感染用量のウイルス/ウェルおよび 1 0<sup>4</sup> U 3 7 3 / C D 4 / R 5 / M a G I 細胞/ウェルと混合した。2 4 時間後、血清、ウイルス、および培地を新鮮培地 2 0 0 μ l 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。H I V - 1 の増殖は、メーカーのプロトコールに従って、化学ルミネセンス試薬、ガラトスター (トロピックス (T r o p i x)) 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、V i c t o r<sup>2</sup> (E G & G ワラック (W a l l a c)) (メリーランド州ゲイサースバーク (G a i t h e r s b u r g, M D)) 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。F L S C 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。

30

40

#### 【0156】

図 1 7 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

50

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。

【 0 1 5 7 】

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

10

実施例 X I I

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ピス（スルホスシニミジル）スベリン酸（ピラス）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。

20

【 0 1 5 8 】

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によって認識されたエピトープは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。

30

実施例 X I I I

調製R/T FLSC-IgG1を0.5mMピス（スルホスシニミジル）スベリン酸（ピラス）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SEMBL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SEMBL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。

40

【 0 1 5 9 】

293個の細胞をpcDNA-HITCCR5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。

50

トランスフェクションした細胞 ( $10^5$  / ウェル) を  $37^\circ\text{C}$  下に 1 時間、指定濃度の R / T F L S C - I g G 1 とともにインキュベートした。結合 R / T F L S C - I g G 1 をフィコエリトリン接合抗 - ヒト I g G で検出し、F A C S によって分析した。図 20 は、R / T F L S C - I g G 1 がヒトとアカゲザルの C C R 5 に結合することを示す。

【産業上の利用可能性】

【0160】

C C R 5 を発現するイヌ胸腺細胞を  $3 \mu\text{g} / \text{mL}$  R / T F L S C - I g G 1 および指定濃度のケモカインとともに  $37^\circ\text{C}$  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 I g G を用いて結合 R / T F L S C - I g G 1 を検出し、F A C S によって分析した。R A N T E S は、C C R 5 - 特異的ケモカインであり、受容体に対して R / T F L S C - I g G 1 と競合することが予想される。S D F は、C X C R 4 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 F L S C - I g G 1 が、そのコレセプター、C C R 5 によって H I V - 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 (F L S C) キメラポリペプチドは、H I V g p 1 2 0 (B a L 株)、20 アミノ酸スペーサーポリペプチド、D 1 ドメインおよび D 2 ドメイン (D 1 D 2) を含む C D 4 ポリペプチド配列、および m y c ペプチド「標識」を含む。切断型一本鎖 (T s S C) キメラは、C 1 (不変領域 1)、V 1 (可変領域 1)、V 2、および C 5 における欠失を含有する。T c S c で示された欠失は、B a L g p 1 2 0 配列に従って番号付けされている。F L S C 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、g p 1 2 0 の c 末端で、R が T に変化している。F L S C R / T C D 4 M 9 キメラは、g p 1 2 0 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 C D 4 M 9 ペプチド配列を有する。

【図2】293 - S C 細胞によって発現された F L S C および T c S C 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。g p 1 2 0 (レーン 1 ~ 4) および C D 4 (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、g p 1 2 0 - C D 4 一本鎖 (一本鎖)、開裂 g p 1 2 0 (g p 1 2 0 フラグメント)、および開裂 C D 4 (C D 4 フラグメント) を示す。

【図3】293 - S C 細胞によって発現された g p 1 2 0 - C D 4 の分析を示す図であり、非架橋 g p 1 2 0 - C D 4 はレーン 1 にあり、架橋 g p 1 2 0 - C D 4 はレーン 2 にある。

【図4】架橋後の F L S C の免疫ブロット分析を示す図である。異なる F L S C 濃度 ( $1 \sim 0.03 \mu\text{M}$ ) 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% 172 kD; (B)、25% 302 kD; および (C)、10% 高位のオリゴマー。

【図5 A - 5 C】g p 1 2 0 - C D 4 キメラの結合分析を示す図である。(A)、架橋 g p 1 2 0 / r s C D 4 および非複合体形成 g p 1 2 0 と比較して、抗 g p 1 2 0 抗体 (17b、48d、A32、および C 1 1) でインキュベートした完全長一本鎖 (F L S C)。17b、48d、および A32 は、複合体形成 g p 1 2 0 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)、F L S C および T c S C におけるヒト抗 g p 1 2 0 モノクローナル抗体の相互半最大結合濃度 (E L I S A)。 (C)、g p 1 2 0 C D 4 結合ドメインと反応するモノクローナル抗体 I g G 1 b 1 2、F 9 1、

10

20

30

40

50

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つた(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<sub>2044</sub>(X4特異的分離株)およびHIV-Ba1(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<sub>2044</sub>に対するFLSCおよびTcSCのID<sub>90</sub>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プ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BaLgp120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と比較する免疫プ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。

10

20

30

40

50

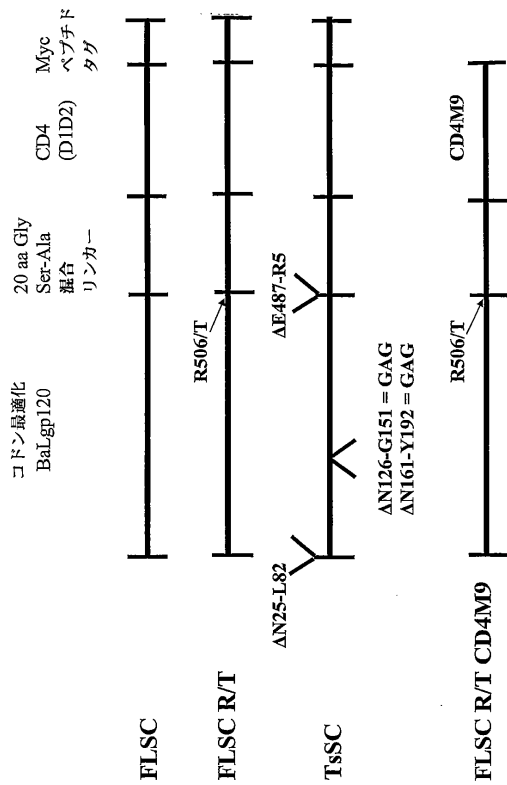
【図18】BaLgp120/sCD4複合体の共有架橋が、FLSC上に曝露されたエピトープを塞ぐことを示す図である。

【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。

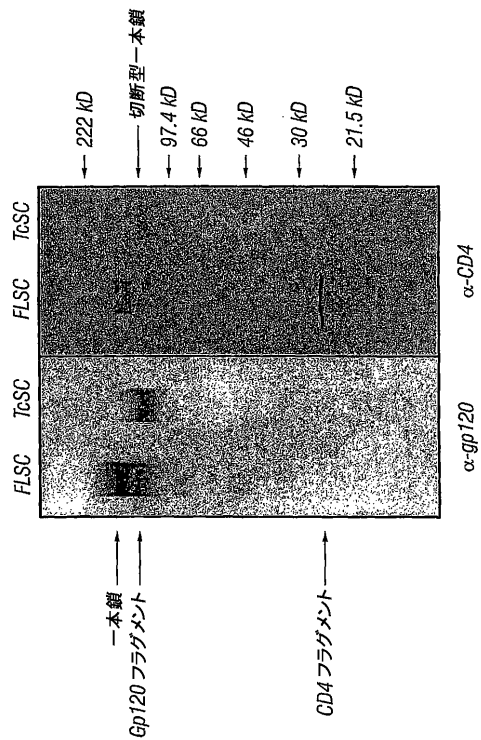
【図20】ヒトおよびアカゲザルCCR5へのR/T FLSC-IgG1の結合を示す図である。

【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。

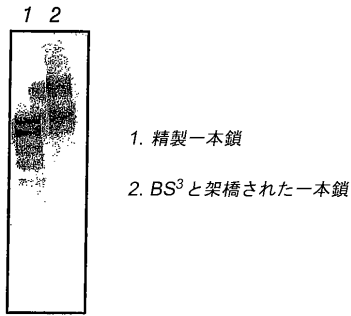
【図1】



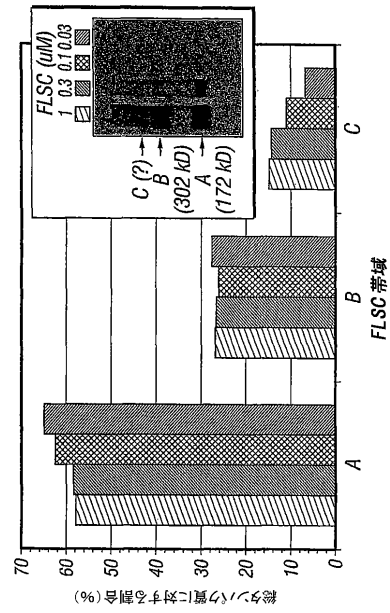
【図2】



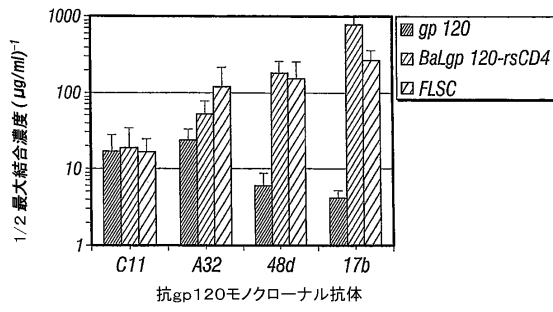
【 図 3 】



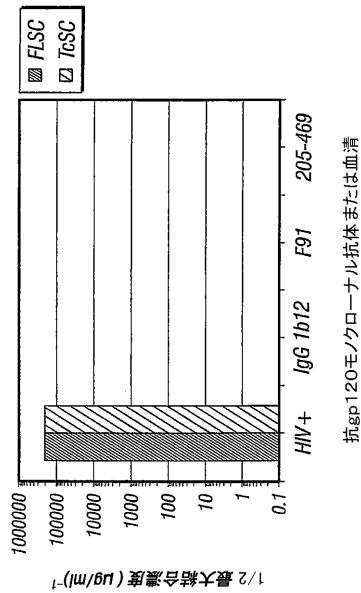
【 図 4 】



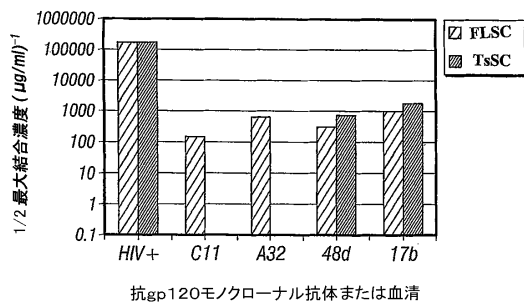
【 図 5 A 】



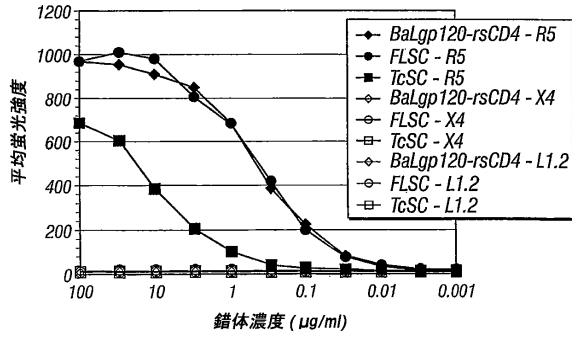
【 図 5 C 】



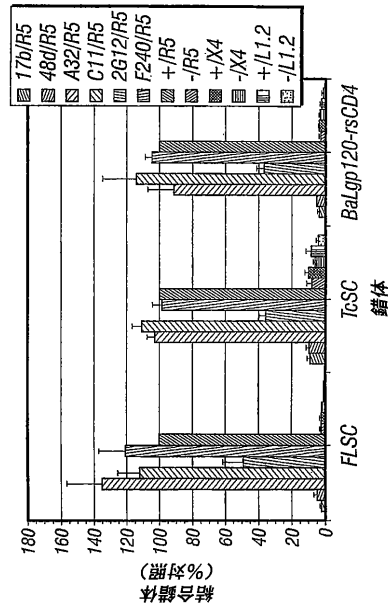
【 図 5 B 】



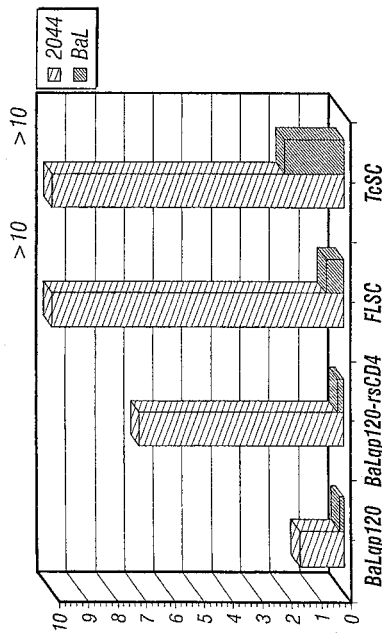
【 図 6 】



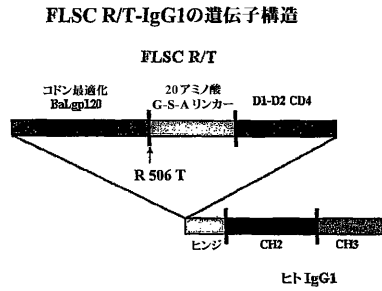
【 図 7 】



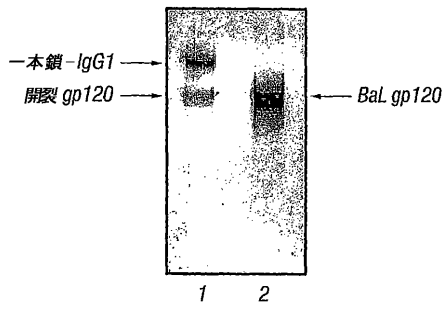
【 図 8 】



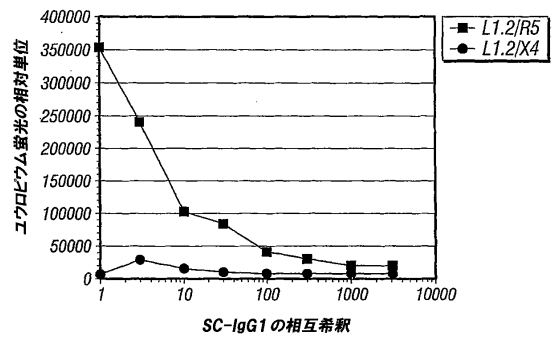
【 図 9 】



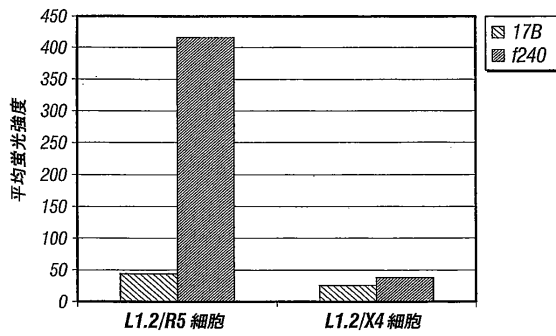
【図10】



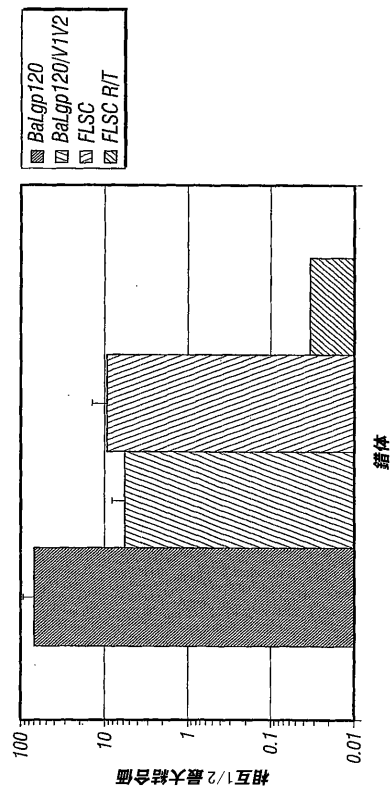
【図11】



【図12】

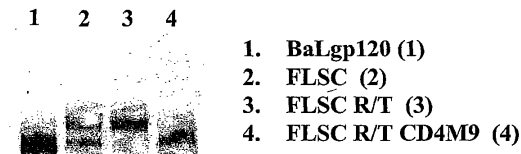


【図13】

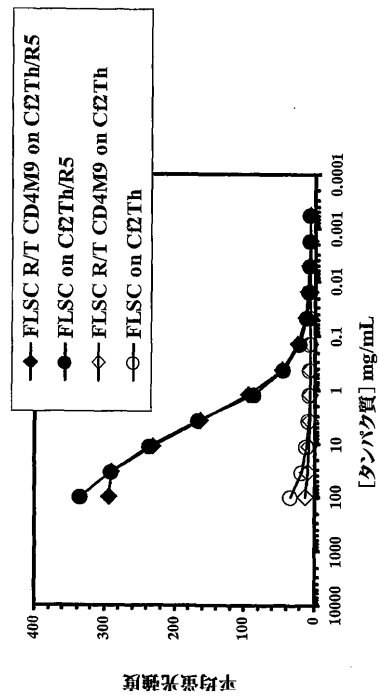


【 図 1 4 】

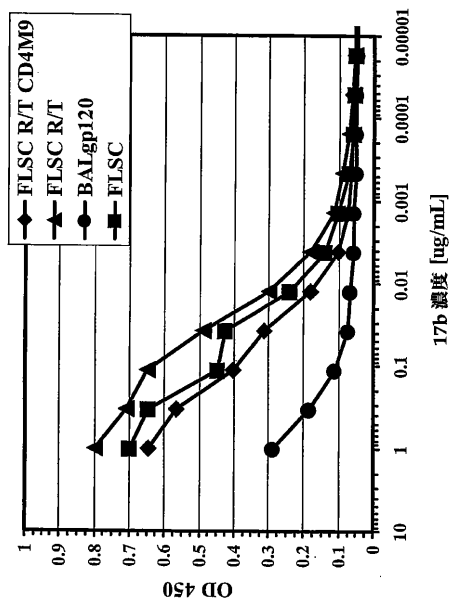
FLSC成分のイムノブロッティング



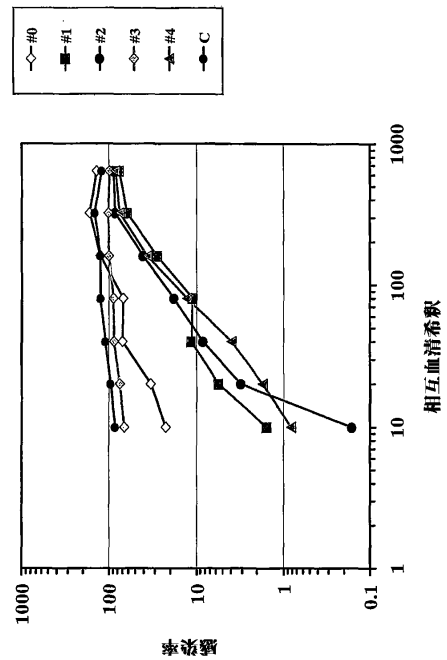
【 図 1 5 】



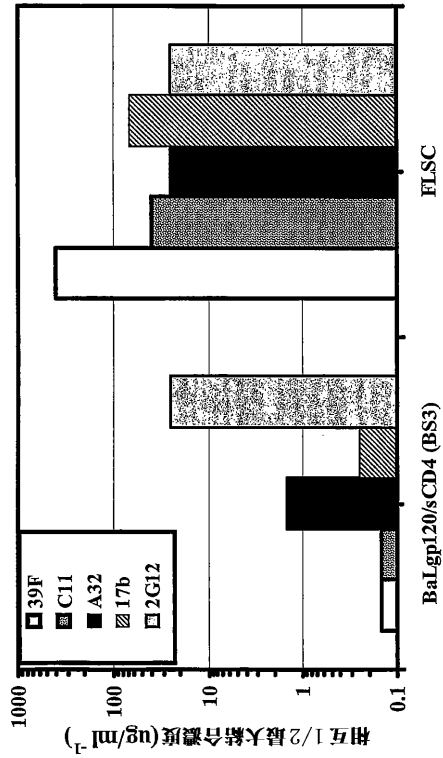
【 図 1 6 】



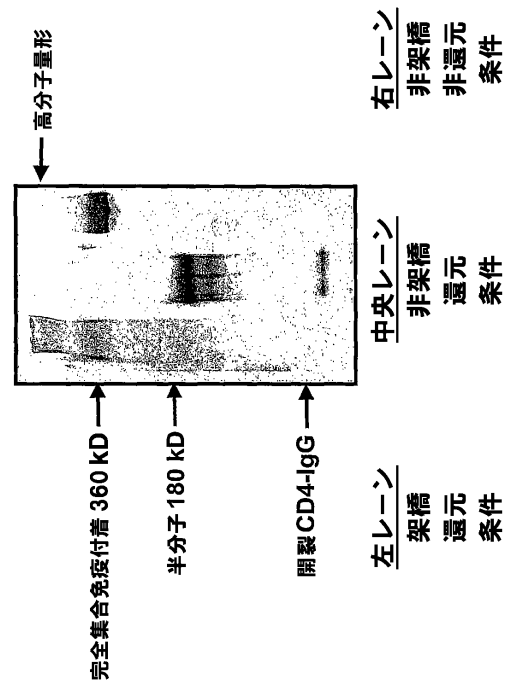
【 図 1 7 】



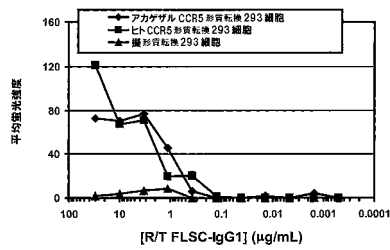
【 図 18 】



【 図 19 】

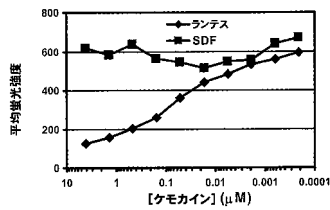


【 図 20 】



【 図 21 】

R/T FLSC-IgG1のCCR5への結合はランテス (RANTES) によって競合的に抑制される



【配列表】

0004500541000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K	39/21	(2006.01)	A 6 1 K 39/21
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18

- (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 2 2 3 0 4, アレクサンドリア, ピーコック アベニュー 4 5  
3 3
- (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 2 1 4 0 5, コロンビア, スワン ポイント ウェイ 7 5 2  
3
- (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 2 1 2 1 1, バルチモア, ローランド ハイツ アベニュー  
1 1 0 4

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 国際公開第01/027294 (WO, A1)  
Tetrahedron, 2000年, Vol.56, p.9451-9460  
J. Virol., 1993年, Vol.67, No.7, p.3978-3988  
FASEB J., 1993年, Vol.7, p.1185-1187  
J. Virol., 2000年, Vol.74, No.24, p.11427-11436  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999年, Vol.96, No.23, p.13091-13096

## (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 19/00  
C07K 14/15-14/16  
C07K 16/08-16/10  
C12N 15/48-15/49  
C12Q 1/68-1/70  
G01N 33/68  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
PubMed

特許名称(译)	病毒外壳蛋白/受体嵌合体和使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4500541B2</a>	公开(公告)日	2010-07-14
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		
当前申请(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 トウ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. トウスカン,ロバート,ジー.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/155 C07K14/705 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/21 A61P31/18 G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/12 C07K14/005 C07K14/16 C07K14/73 C07K16/08 C07K16/10 C07K16/28 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 C07K14/155 C07K14/705 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/21 A61P31/18		
代理人(译)	田中 克郎		
優先権	09/934060 2001-08-21 US		
其他公开文献	JP2005503147A JP2005503147A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

嵌合分子本发明涉及嵌合分子，其包含病毒外壳序列和能够彼此相互作用以形成能够结合共同受体的复合物的受体序列。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，并且可用作由于细胞上存在的共受体的占据而抑制细胞的病毒感染的物质。在某些实施方案中，嵌合多肽包括免疫缺陷病毒包膜多肽，例如HN，SN，FIV，FeL，V，FPV和疱疹病毒的病毒。适用于嵌合多肽的受体序列包括例如CD4 DID2和CD4M9序列。

受容体 (結合サブユニット) 免疫グロブリン様分子	ウイルス(科)	文献
VCAM-1 [CAM-1](第1ドメイン)	EMC-D(ヒコルナウイルス科) 大群 HRV, CAV 13, 18, および 21 (ヒコルナウイルス科)	フーバー(Huber)(1994年) コロノ(Colomo)ら(1986年) グリーブ(Greve)ら(1989年) スタウトン(Stanton)ら(1989年) トマシニ(Tomassin)ら(1989年)
PVR(第1ドメイン)	ポリオウイルス (ヒコルナウイルス科)	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	ダグレイシユ(Daigleish)ら(1984年); クラツマイム(Klatzmaim)ら(1984年); ルツソ(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)	ウィリアムズ(Williams)ら(1978年)
MHCI	セムリキ森林ウイルス (トガウイルス科) 乳酸脱素酵素ウイルス マウスサイトメガロウイルス (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	ヒスナウイルス (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 (ヒコルナウイルス科)	ベルゲルソン(Bergelson)ら (1992年, 1993年)
(RGD結合タンパク質)	FMDV (ヒコルナウイルス科)	フォックス(Fox)ら(1989年) メイソン(Mason)ら(1994年)
αvβ3(ヒプロネクチン)	CAV9, エコーウイルス1, 8 (ヒコルナウイルス科)	ロイハイネン(Rovainen)ら(1994年)
輸送タンパク質		
リン輸送 類似体	テナガザル白血病ウイルス (レトロウイルス科) 両種性ウイルス (レトロウイルス科)	ヨハン(Johann)ら(1992年) ミラー(Milel)ら(1994年)
陽イオン性アミノ酸 輸送体	エクトロピックマウス 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)