

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4282934号
(P4282934)

(45) 発行日 平成21年6月24日(2009.6.24)

(24) 登録日 平成21年3月27日(2009.3.27)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
C O 7 K	4/02	(2006.01)	C O 7 K 4/02
C O 7 K	14/16	(2006.01)	C O 7 K 14/16
C O 7 K	16/10	(2006.01)	C O 7 K 16/10

請求項の数 32 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-579818 (P2001-579818)
 (86) (22) 出願日 平成13年4月20日(2001.4.20)
 (65) 公表番号 特表2004-514406 (P2004-514406A)
 (43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/013031
 (87) 国際公開番号 W02001/082944
 (87) 国際公開日 平成13年11月8日(2001.11.8)
 審査請求日 平成20年4月18日(2008.4.18)
 (31) 優先権主張番号 09/561,366
 (32) 優先日 平成12年4月28日(2000.4.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502385975
 テイモン・エルエルシー
 アメリカ合衆国ニュージャージー州070
 78ショートヒルズ・ドリソンドライブ3
 O
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠武
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV-1 の増殖を減じる方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 R₁-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z_{1,2}-R₂ (配列番号8) のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体を含んで成る組成物

式中、Y₇は、Arg、Lys、SerおよびAsnから成る群から選択され；

X₉は、GluおよびAspから成る群から選択され；

Z_{1,2}は、LysおよびAsnから成る群から選択され；

R₁は、水素、低級アルキル、低級アルカノイル、1～5個のアミノ酸の配列、およびアミノ末端のアミノ酸上で低級アルキルまたは低級アルカノイルで置換された1～5個のアミノ酸の配列から成る群から選択され；

R₂は、遊離ヒドロキシル、アミド、1～5個のさらなるアミノ酸の配列、およびカルボキシ末端のアミノ酸上でアミドで置換された1～5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択され；そして、

上記2つの変異体の少なくとも1つにおいて、Y₇はArgであり、Z_{1,2}はLysであり、そして該2つの変異体の少なくとも第2において、Y₇はAsnであり、Z_{1,2}はAsnである。

【請求項2】

R₁がValであり、

配列 Val-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z_{1,2} (配列番号

号37)を生じる、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

R₁が、X₂-Pro-Valであり、ここでX₂がGluおよびAspから成る群から選択され、配列 X₂-Pro-Val-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z_{1,2} (配列番号38)、またはそのN末端のアミノ酸が低級アルキルまたは低級アルカノイルで置換された同様の配列を生じる、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

R₂が-His-Pro-Gly-Ser-であるか(配列番号16)、またはそのカルボキシ末端のアミノ酸がアミドで置換された同様の配列である、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項5】

少なくとも3個のアミノ酸配列を含んで成り、該配列が、
R₁-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R₂ (配列番号17)および
R₁-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R₂ (配列番号18)

そして、さらに：

R₁-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R₂ (配列番号19)

R₁-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R₂ (配列番号22)

20

R₁-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R₂ (配列番号20)

R₁-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R₂ (配列番号24)

R₁-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R₂ (配列番号21)および

R₁-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R₂ (配列番号23)

から成る群から選択される1以上の配列、
を含んで成る、請求項1に記載の組成物。

30

【請求項6】

さらに、上記アミノ酸配列の少なくとも7個を含んで成る、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

上記配列の8個すべてを含んで成る、請求項5に記載の組成物。

【請求項8】

上記ペプチドまたはポリペプチドが合成的に生成される、請求項1に記載の組成物。

【請求項9】

上記ペプチドまたはポリペプチドが組換え的に生成される、請求項1に記載の組成物。

【請求項10】

上記ペプチドの1以上が、キャリアタンパク質に結合した合成ペプチドとして発現する、請求項1に記載の組成物。

40

【請求項11】

上記ペプチドの1以上が、多抗原性ペプチドとして、またはキャリアタンパク質に結合した多抗原性ペプチドとして発現する、請求項1に記載の組成物。

【請求項12】

選択したペプチドの1以上が、組換え的に生産されたタンパク質内で発現する、またはキャリアタンパク質と枠内で融合した組換え的に生産されたタンパク質内で発現する、請求項1に記載の組成物。

【請求項13】

50

上記キャリアータンパク質が、大腸菌 DnaK タンパク質、GST タンパク質、マイコバクテリア熱ショックタンパク質 70、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、ガラクトキナーゼ、ユビキチン、 -接合因子、 -ガラクトシダーゼおよびインフルエンザ NS-1 タンパク質から成る群から選択される、請求項 10 ないし 12 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 14】

式 $R3 - Lys - X_{42} - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - R4$ (配列番号 5) の少なくとも 1 つのペプチドまたはポリペプチド：

式中、 X_{42} は、Gly または Ala から成る群から選択され；R3 は、水素、低級アルキル、低級アルカノイル、1 ~ 5 個のアミノ酸の配列、およびアミノ末端のアミノ酸が低級アルキルまたは低級アルカノイルで置換された 1 ~ 5 個のアミノ酸の配列から成る群から選択され；R4 は、遊離ヒドロキシル、アミド、1 ~ 5 個のさらなるアミノ酸の配列 (塩基性アミノ酸 - Lys - Arg - Arg - を除く)、およびカルボキシ末端のアミノ酸がアミドで置換された 1 ~ 5 個のさらなるアミノ酸の配列 (塩基性アミノ酸 - Lys - Arg - Arg - を除く) から成る群から選択される、をさらに含んで成る、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 15】

1 つの変異体が、 Y_7 が Asn であり、 X_9 が Asp であり、 Z_{12} が Asn である式を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 16】

請求項 1 ないし 15 のいずれかに記載の組成物、製薬学的に許容されるキャリアーおよびアジュバントを含んで成る医薬組成物。

20

【請求項 17】

請求項 1 または 16 に記載の組成物を含む、種々の HIV-1 株またはサブタイプに由来する HIV-1 Tat タンパク質と反応する抗体を誘導するために使用される医薬品。

【請求項 18】

式 $- Asp - Pro - Y_7 - Leu - X_9 - Pro - Trp - Z_{12} -$ (配列番号 9) のエピトープ：

式中、 Y_7 は Asn であり； X_9 は Asp であり； Z_{12} は Asn である、に特異的に結合する抗体。

30

【請求項 19】

単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、および抗体フラグメントから成る群から選択される、請求項 18 に記載の抗体。

【請求項 20】

請求項 18 に記載の抗体を少なくとも 1 つ含んで成る抗体組成物。

【請求項 21】

以下の (a) 及び (b) の抗体を含んで成る抗体組成物：

(a) 式 $R1 - Asp - Pro - Arg - Leu - X_9 - Pro - Trp - Lys - R2$ (配列番号 8) のペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する抗体：

式中、 X_9 は、Glu および Asp から成る群から選択され；R1 は、1 ~ 5 個のアミノ酸の配列であり；R2 は、1 ~ 5 個のさらなるアミノ酸の配列である；および

(b) 式 $R1 - Asp - Pro - Asn - Leu - X_9 - Pro - Trp - Asn - R2$ (配列番号 8) のペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する抗体。

40

【請求項 22】

多数の HIV-1 株に由来する HIV-1 Tat タンパク質エピトープに結合する別の抗体を含んで成る、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

上記抗体が、単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト

50

化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、抗体フラグメントおよびそれらの混合物から成る群から選択される、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

アミノ酸配列 $Lys - X_{4,2} - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys -$ (配列番号 10) (ここで $X_{4,2}$ は Gly および Ala から成る群から選択される) を有するエピトープに特異的に結合する抗体をさらに含んで成る、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

請求項 1 8 ~ 2 4 のいずれかに記載の抗体または抗体組成物、および製薬学的に許容されるキャリアーおよびアジュバントを含んで成る医薬組成物。

10

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の組成物を含む、HIV-1 のウイルスレベルを下げるための医薬品。

【請求項 2 7】

式 $R1 - Asp - Pro - Y_7 - Leu - X_9 - Pro - Trp - Z_{1,2} - R2$ (配列番号 8) のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも 2 つの変異体：

式中、 Y_7 は、 Arg 、 Lys 、 Ser および Asn から成る群から選択され； X_9 は、 $Gl u$ および Asp から成る群から選択され； $Z_{1,2}$ は、 Lys および Asn から成る群から選択され； $R1$ は、1 ~ 5 個のアミノ酸の配列であり； $R2$ は、1 ~ 5 個のさらなるアミノ酸の配列であり；そして、上記 2 つの変異体の少なくとも 1 つにおいて、 Y_7 は Arg であり、 $Z_{1,2}$ は Lys であり、該 2 つの変異体の少なくとも第 2 において、 Y_7 は Asn であり、 $Z_{1,2}$ は Asn である、
を連続的にコードする核酸配列を含んで成る合成遺伝子。

20

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の合成遺伝子および製薬学的に許容されるキャリアーを含んで成る、医薬組成物。

【請求項 2 9】

宿主細胞中で合成遺伝子産物の発現を支配しかつ制御する調節核酸配列に操作可能に連結された、請求項 2 7 に記載の合成遺伝子を含んで成る合成分子。

30

【請求項 3 0】

請求項 2 9 に記載の合成分子および製薬学的に許容されるキャリアーを含んで成る、医薬組成物。

【請求項 3 1】

請求項 2 7 に記載の合成遺伝子を含む、哺乳動物宿主細胞。

【請求項 3 2】

請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の組成物を形成するペプチドまたはポリペプチドに結合する種々の抗体の混合物を含んで成り、それぞれの抗体が異なる該ペプチドまたはポリペプチドに結合する、抗体組成物。

【発明の詳細な説明】

40

【0001】

(技術分野)

発明の分野

本発明は、一般に症候的または無症候的な感染患者において、ヒト免疫不全症ウイルス-1 (HIV-1) の増殖を阻害するために、ならびに以前に感染したことが無い個体において一次感染後の HIV-1 増殖を弱めるために有用な組成物および方法、すなわち AIDS への進行を最少とすることに関する。

発明の背景

1 型ヒト免疫不全症ウイルス (HIV-1) の処置に対する様々な取り組みは、ウイルスの転写に必須なタンパク質 (Tat) を生成する HIV-1 のトランス活性化 (tat) 遺伝子に集中し

50

た。このtat遺伝子およびそのタンパク質は配列決定され、そしてHIVの推薦された処置への関与が調査された [例えば、米国特許第5,158,877号;同第5,238,882号;および同第5,110,802号明細書;それぞれ1992年5月14日、1991年7月25日、1991年7月11日、そして1987年5月21日に出版された国際公開第92/07871号、同第91/10453号、同第91/09958号および同第87/02989号明細書を参照にされたい]。Tatタンパク質は細胞外に放出され、別の感染細胞に取り込まれて細胞中のHIV-1の転写を強化し、そして非感染細胞により宿主細胞の遺伝子の活性化を改変させることに利用できる。Tatは細胞をウイルスに感染され易くする。細胞によるTatの取り込みは大変強力であり、そしてタンパク質の短い塩基性配列により媒介されることが報告された [S.Fawell et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:664-668(1994)]。

10

【 0 0 0 2 】

有力なAIDSワクチンとしてHIV-1 Tatタンパク質を用いた免疫感作が盛んに調査されている。報告された研究ではHXB/LAV HIV-1 Tat配列は、組換えタンパク質 [A.Cafaro et al., Nat.Med.,5:643-650(1999)]、DNAワクチン [S.Calarota et al., Lancet.351:1320-5(1998)]、不活性化タンパク質 (Tat トキシド) [S.S.Cohen et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,96(19):10842-10847(1999);A.Gringeri et al., J.Hum.Virol.,1:293-8(1998)]、または不活性化Tatを発現するDNAワクチン [E.Caselli et al., J.Immunol.,162:5631-5638(1999)]のいずれかの免疫原として使用された。完全なTat配列を用いた免疫感作は、細胞性および体液性免疫の両方を誘導した。M.C.Rhe et al., J.Acquir Immune Defic.Syndr.Hum.Virol.10:408-416(1995);C.J.Li et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:8116-8120(1997); およびその他も参照にされたい]。

20

【 0 0 0 3 】

1992年9月3日に公開された国際公開第92/14755号明細書は、Tatタンパク質およびTatタンパク質に結合することができるインテグリン細胞表面レセプターに関する。インテグリンに結合する2つのTat配列が同定されている: -Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg- [配列番号1] ならびに-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro- [配列番号2]。これらの配列はインテグリンに関して優勢な結合部位である塩基性領域またはドメインである。この明細書はこれらのTat配列に対応する多数のペプチドおよび対応するインテグリンが、抗体が適当なインテグリンに対するように、インビトロで細胞のTatコートプレートへの結合を遮断することを示す。しかしこの明細書は、これらの試薬が細胞による機能的Tatの取り込みを遮断しないことと示し(国際公開第92/14755明細書の実施例9を参照にされたい)、すなわちHIV感染における治療的利益に関して提案された作用機作を無効にする。この国際出願に記載されるTat配列は、本発明のペプチド免疫原とは異なる。

30

【 0 0 0 4 】

Tatタンパク質に対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体は動物中で容易に生成され、そしてインビトロでTatタンパク質の取り込みを遮断することが示された [例えば、D.Brake et al., J.Virol.,64:962(1990);D.Mann et al., EMBO J.,10:1733(1991);J.Abraham et al. 同上;P.Auron et al, 同上;M.Jaye et al, 同上;G.Zauli et al, 同上を参照にされたい]。より最近の報告では、組織培養基に加えたTatタンパク質に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体が、インビトロのHIV-1感染を弱めることを示した [L.Steinaa et al., Arch.Virol.,139:263(1994);M.Re et al, 同上;およびG.Zauli et al., J.Acq. Imm.Def.Syndr.Hum.Retrovirol.,10:306(1995)]。

40

【 0 0 0 5 】

発明者が所有する公開 [G.Goldstein, Nature Med.,2:960(1996); および1995年11月30日に公開された国際公開第95/31999号明細書] は、感染細胞からのHIV-1 Tatタンパク質の分泌および感染および非感染細胞による取り込みがHIV-1の感染性に重要であったことを示す証拠を検討した。以前の研究では、Tatタンパク質に対する抗体がTatの取り込みをインビトロで遮断し、そしてインビトロの感染性を阻害することも示した。哺乳動物の能動免疫感作は、有力なAIDSワクチンとしてHIV-1 Tatタンパク質に対する抗体を誘導することを示唆した。G.Goldstein, et al, 「合成HIV-1 Tatペプチドで免疫感作し、そしてキメラ

50

サル/ヒト免疫不全症ウイルス (SHIV₃₃) を感染させたアカゲザルにおける慢性ウイルス血症の最少化 (Minimization of chronic plasma viremia in rhesus macaques immunized with synthetic HIV-1 Tat peptides and infected with a chimeric simian/human immunodeficiency virus (SHIV₃₃))」, Vaccine, 18:2789(2000)。

【 0 0 0 6 】

発明者による他の公開、1999年1月21日に公開された国際公開第99/02185号明細書および1999年4月6日に発効された米国特許第5,891,994号明細書(両方とも引用により本明細書に編入する)は、ウサギの免疫系によりエピトープと認識されたTat配列を使用したHIV-1感染の処置および防止における新たな概念を明らかにした。上記に検討したこれまでの開示とは異なり、これらの公開は、以下の:-Asp-Pro-X₇-Leu-Glu-Pro-[配列番号3]またはR¹-Val-Asp-Pro-X₇-Leu-Glu-Pro-R²[配列番号4](ここで、X₇はArg、Lys、SerまたはAsnである)のようなTatアミノ酸残基4(または5)から10に広がる「エピトープI」配列を含んで成る少なくとも2つの、そして好ましくは4つのすべてのTatペプチドまたはポリペプチドを必要とする治療用および免疫原の組み合わせに関する。そのような組成物は、ほとんどのHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を誘導し、そしてHIV-1の増殖を減じる。この公開によれば、式R3-Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R4[反応番号5](式中、X₄₂はGlyまたはAlaから成る群から選択される)のTatアミノ酸残基41-50に広がる「エピトープII」ペプチドまたはポリペプチドを含んで成るある種の他のTatタンパク質をこの組成物に加えることができる。あるいは式R5-Arg-Arg-X₅₈-Z₅₉-A₆₀-Y₆₁-Ser-R6[反応番号6](式中、X₅₈はAla、Pro、SerおよびGlnから成る群から選択され;式中、Y₆₁はAsp、Asn、GlyおよびSerから成る群から選択され;式中、Z₅₉はProおよびHisから成る群から選択され;式中、A₆₀はGlnおよびProから成る群から選択される)のTatアミノ酸残基56-62に広がる「エピトープIII」ペプチドまたはポリペプチドをこの組成物に加えることができる。さらに他には、式R7-Ser-Gln-X₆₄-His-Gln-Y₆₇-Ser-Leu-Ser-Lys-Gln-Pro-R8[反応番号7](式中、X₆₄はAsnおよびThrから成る群から選択され;式中、Y₆₇はAlaおよびValから成る群から選択される)のTat AA残基62-73に広がる「エピトープIV」ペプチドまたはポリペプチドをこの組成物に加えることができる。この組成物自体を、HIV-1の多数の変異体に特徴的な多数のTat配列に対する抗体を誘導するために使用することができる。この組成物または生成した抗体を、これらの多数の変異体に対するワクチンまたは予防的処置として使用する。

【 0 0 0 7 】

HIV-1疾患の進行に関して増大する知識にもかかわらず、当該技術分野には予防的および治療的の両方でHIV-1を処置するための組成物および方法を開発する必要性が存在し、これらはその後、多くは致命的なAIDS疾患の処置および可能であれば防止のために、HIV-1のウイルスレベルを下げるために有用である。

発明の要約

1つの観点では本発明は、式R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2[配列番号8](式中、Y₇は、Arg、Lys、SerおよびAsnから成る群から選択され;式中、X₉は、GluおよびAspから成る群から選択され;式中、Z₁₂は、LysおよびAsnから成る群から選択され;式中、R1は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよび低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1~約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され;式中、R2は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択される)のエピトープIのペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体を含んで成る組成物を提供する。この組成物において、2つの変異体の少なくとも1つは、Y₇がArgであり、そしてZ₁₂がLysである式を持たなければならない、そしてこの2つの変異体の少なくとも第2は、Y₇がAsnであり、そしてZ₁₂がAsnである式を持たなければならない。この組成物の各ペプチドは、HIV-1 Tat エピトープIとして霊長類の免疫系により認識される。この式は、種々のペプチドの組み合わせの構築および使用を可能とする。

【 0 0 0 8 】

10

20

30

40

50

別の観点では、上記組成物はHIV-1 Tatアミノ酸残基5からアミノ酸残基12に対応する他のアミノ酸配列を表す1以上のさらなるペプチドまたはポリペプチド(1つまたは複数)をさらに含む。これらの任意のアミノ酸配列を以下に詳細に記載する。これらの配列は好ましくはその位置にTatタンパク質変異体を含むHIV-1株に由来する。

【0009】

別の観点では、本発明は1以上のHIV-1 TatエピトープII、IIIおよび/またはIVと組み合わせ、霊長類により認識される少なくとも2つの必要なエピトープIペプチド(および好ましくはさらなるエピトープIペプチド)を含んで成るペプチドまたはポリペプチドを含む上記組成物を提供する。エピトープII、IIIおよびIVは、引用により本明細書に編入する国際公開第99/02185号明細書に記載されたHIV-1 Tatペプチドの式である。そのような組成物は適当なHIV-1 Tatペプチドと組み合わせ、すべての既知のHIV-1 Tatタンパク質の約95%より多くと反応性の抗体を誘導する組成物を提供することができる。

10

【0010】

さらなる観点では本発明は、式 R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2 [配列番号8] (式中、Y₇は、Arg、Lys、SerおよびAsnから成る群から選択され; 式中、X₉は、GluおよびAspから成る群から選択され; 式中、Z₁₂は、LysおよびAsnから成る群から選択され; 式中、R1は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよび低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1~約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され; 式中、R2は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択される)のペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する、好ましくは霊長類で生成される少なくとも1つの抗体を含んで成る抗体組成物を提供する。この抗体組成物は好ましくは少なくとも2つの抗体、すなわちY₇がArgであり、そしてZ₁₂がLysであるエピトープI変異体に結合する1つの抗体、およびY₇がAsnであり、そしてZ₁₂がAsnである第2のエピトープI変異体に結合する少なくとも第2の抗体を含んで成る。2つの特定した変異体以外の他の変異体に対する他の抗体も、この組成物に含むことができる。組成物中のこれらの抗体は霊長類の免疫系により認識されるエピトープI配列に結合し、このエピトープはHIV-1 Tat タンパク質の多数の変異体上に存在する。これらの抗体は以下に詳細に記載するモノクローナル抗体のような種々の抗体構築物を含む。

20

【0011】

さらに別の観点では、本発明はHIV Tatタンパク質の霊長類が認識するエピトープに特異的に結合する抗体、特にモノクローナル抗体を提供し、このエピトープはアミノ酸配列-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂- [配列番号9] (ここで、Y₇、X₉およびZ₁₂は上記定義の通りである)を含んで成る。

30

【0012】

さらに別の観点では、本発明は-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [配列番号11]のエピトープを認識するすでに記載した抗体とは異なるエピトープ、エピトープIIペプチド配列 -Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [配列番号10] (ここでX₄₂はGlyまたはAlaである)を認識する少なくとも1つの抗体を含んで成る抗体組成物を提供する。好ましくは組成物は、X₄₂がGlyであるペプチドおよびX₄₂がAlaであるペプチドの両方を認識する1つの抗体を含んで成る。これらの抗体は好ましくは霊長類で生成される。組成物中のこれらの抗体は霊長類の免疫系により認識されるエピトープII配列に結合し、このエピトープは、HIV-1 Tatタンパク質の多数の変異体上に存在する。これらの抗体は以下に詳細に記載するように種々の抗体構築物を含む。

40

【0013】

さらに別の観点では、本発明はすでに記載した抗体により認識される-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [配列番号11]のエピトープとは異なる、エピトープIIペプチド配列 -Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [配列番号10] (ここでX₄₂はGlyまたはAlaである)を認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体を提供する。

【0014】

50

さらなる観点では、本発明は上記定義の式 R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2 [配列番号 8] のエピトープIのペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体を含むペプチドまたはポリペプチドを連続的にコードする組換え体または合成遺伝子を提供する。この合成遺伝子において、2つの変異体の少なくとも1つは、Y₇がArgであり、そしてZ₁₂がLysである式を持たなければならず、そしてこの2つの変異体の少なくとも第2は、Y₇がAsnであり、そしてZ₁₂がAsnである式を持たなければならない。場合によりこの合成遺伝子は霊長類の免疫系により認識されるようなカルボキシ末端エピトープIIペプチドを含んで成る。あるいは組換え体または合成遺伝子は、以下に同定する7または8個の好適な霊長類が認識するエピトープIアミノ酸配列を含む。この合成遺伝子はスペーサー配列により分けられた各アミノ酸配列を含むことができ、あるいはキャリアタンパク質を含むオープンリーディングフレーム中に各ペプチド/ポリペプチドを発現することができる。合成遺伝子はスペーサーが霊長類により認識されたエピトープI配列に融合している場合、スペーサーによりキャリアタンパク質から分けることができ、組換えタンパク質のカルボキシ末端にエピトープII配列を残す。さらなる態様には一緒に融合し、そしてキャリアタンパク質に融合した上記式の多数のエピトープIペプチドを含む。

【 0 0 1 5 】

さらなる観点では、本発明は宿主細胞中で合成遺伝子産物の発現を支配し、そして制御する調節核酸配列に操作可能に連結された上記合成遺伝子を含んで成る合成分子、例えばベクターを提供する。

【 0 0 1 6 】

別の観点では、本発明は上記合成遺伝子または合成分子を含む組換え微生物、例えばウイルスまたは片利共生細菌を提供する。この微生物は宿主中で遺伝子または分子の産物の複数のコピーを発現することができる

本発明のさらに別の観点は、多数の既知のHIV-1 Tatタンパク質、例えば約95%より多く、好ましくは99%より多くの既知のTatタンパク質と反応する抗体を誘導するために有用な医薬組成物である。これらの誘導された抗体は、HIV-1の増殖を減じることができる。医薬組成物は少なくとも1つの上記の組換えまたは合成ペプチド/ポリペプチド組成物；または上記の合成遺伝子/分子；または上記組換え微生物を製薬学的に許容されるキャリアー中に含んで成る。

【 0 0 1 7 】

本発明のさらなる観点は、HIV-1の増殖を減じるのに有用な医薬組成物であり、この組成物は上記抗体組成物またはモノクローナル抗体組成物を含む。

【 0 0 1 8 】

本発明のさらに別の観点では、HIV-1のウイルスレベルを下げるための方法には、ヒトまたは他の霊長類を上記の抗体を誘導する医薬組成物に暴露し、ほとんどのHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を活発に誘導し、そしてインビボでウイルスの増殖を減じることを含む。

【 0 0 1 9 】

この方法はコンピテントな免疫系(competent immune system)を持つHIV-1感染個体に、あるいは感染していないか、または慢性的に感染しているが無症候性の個体に適当である。この方法はHIV-1 Tatタンパク質と反応し、そしてHIV-1による初期の急性感染中にウイルス増殖を下げ、そしてさらにAIDSを導く慢性ウイルス血症を最少にする抗体を誘導する。

【 0 0 2 0 】

さらに別の観点では、本発明はHIV-1による感染に対する効果的な、または迅速な免疫応答を形成することができないヒトに、上記の抗体組成物を含有する医薬組成物を投与することにより、HIV-1のウイルスレベルを減じる方法を提供する。この方法は、長期に組成物を投与することを含むことができる。

【 0 0 2 1 】

本発明の別の観点は、上記組成物の調製法およびそのような組成物でトランスフェクトした宿主細胞を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

本発明の別の観点は、上記組成物を用いた免疫感作により誘導される抗体の力価および特異性の測定および検出に有用なキットである。本発明のキットは好ましくは上記2つの必要なエピトープIペプチド、ならびに霊長類により認識されるエピトープIのさらなるペプチド、そしてエピトープIIからIVの可能なさらなるペプチド、およびコートされた固体支持体、これらの抗体のペプチドへの抗体の結合を検出するための標識試薬、および多種雑多な基質および標識により提供されるシグナルを引き出すか、または検出する装置、ならびに血液サンプル、適当なウイルスまたは他の診断アッセイ成分を採取するための通例の装置を含む。

【 0 0 2 3 】

さらなる観点では、本発明は本発明の組成物で免疫感作した個体中の抗体の力価および反応パターンを検出する方法を提供する。本発明は個体の生物学的流体、例えば血清の希釈物を、本発明のエピトープI配列および場合によりエピトープIIからIVの1以上のペプチドを結合したプレートまたはビーズとインキュベーションし、非結合生物材料を洗い出し、そして標識試薬、例えば酵素が付随した抗-ヒト免疫グロブリンを含むペプチドへの抗体の結合を測定する工程を含む。使用する標識の種類に依存して、標識により生成されるシグナルは、酵素と反応するさらに付加する基質により生成することができる(例えば色の変化を生じる)。他の通例の標識も本アッセイの計画に包含してよい。

【 0 0 2 4 】

本発明の他の観点および利点は、以下の詳細な説明およびそれらの好適な態様でさらに記載する。

発明の詳細な説明

本発明は、免疫原に対する免疫応答を上げる(mounting)ことができる非感染または初期のHIV-1感染個体に抗体を誘導するさらなる組成物を提供することにより、上記の問題の解決を提供し、この抗体は多数の既知のHIV-1 Tatタンパク質変異体(すなわち95%より多い、好ましくは99%より多い)と反応する。用語「Tat配列(またはタンパク質)変異体」は、Tatタンパク質アミノ酸残基を含有するポリペプチドまたはペプチド、すなわち表1[配列番号15]のコンセンサス配列と実質的に同じである別のHIV-1株 Tatタンパク質に由来する配列を意味する。各変異体はエピトープIからIVについて目的の残基中の少なくとも1つのアミノ酸変化により、コンセンサス配列および/または別の変異体とは異なり得る。この変化は、本発明の組成物に加えた時にその特定のTatエピトープに対して同じか、または異なる抗原性特異性を提供することができる。

【 0 0 2 5 】

本発明の組成物により誘導される抗体はHIV-1の増殖を阻害することができ、これにより疾患がさらにAIDSへ進行することを防止する。抗体組成物は、HIV-1感染に対する効果的または迅速な免疫応答を上げることができない感染または非感染のヒトに使用するためにも提供することができる。これらの組成物は多数のTatタンパク質と反応することができ、これによりHIV-1のウイルスレベルを下げる。これらの抗体は、感染で免疫学的に異なるTatタンパク質を生成するHIV-1に暴露されるか、または感染した大きな集団において、AIDSの発症を制御するために、治療的および予防的内容の両方に有用である。

【 0 0 2 6 】

本発明の組成物には霊長類が抗体を生成するHIV-1 Tatタンパク質のエピトープにより提供されるペプチドに基づくペプチドまたはタンパク質、あるいは霊長類においてTatに対する抗体を誘導するペプチドおよびポリペプチドをコードする核酸配列を含む。次にこれらの誘導された抗体はHIV-1の増殖を減じる。

【 0 0 2 7 】

HIV-1 Tatタンパク質は2つのエキソンから生成される;エキソン1は、スプライシング無しで、またはエキソン2によりコードされる約15~32アミノ酸残を含むスプライシングされて発現され得る72アミノ酸(AA)タンパク質をコードする。HIV-1 Tat エキソンI配列は表1に表し、そして共通するBサブタイプ[NIHロスアラモスデータベース]に見い

10

20

30

40

50

だされる31の既知のHIV-1株のTatタンパク質配列に基づくコンセンサス配列である。変異体が現れるアミノ酸位置は、ロアーケースの文字である。表I [配列番号15]で、73位のアミノ酸残基はHIV-1 Tatのエキソン2の最初のProである。エキソン1の72アミノ酸産物は、細胞性の取り込みおよび活性化を単独で行うことができるので、これは抗体が72アミノ酸ペプチドと反応し、細胞内の取り込みを阻止することに必須である。HIV-1 Tatは、Cys₂₁とCys₃₇との間に1つの共有結合を持つエキソン1 [配列番号15]のAA位22と37の間にシステイン-リッチ領域を含み、複雑な3次構造を生じる。科学文献は、この領域が免疫原性ではないらしいことを示した。Tatに対する主な抗体は、AA62-73に対して報告されたさらなる抗体とともに、直線状のN-末端Pro-リッチ領域(AA1-21)および直線状塩基性領域(AA44-65)に対するものである。

10

【0028】

本発明者は以前にエピトープ、すなわちTat変異体のエキソン1 [配列番号15]のN-末端直線状の配列1-21 (22AA)中のウサギ抗体(抗原性配列)により認識される領域を同定し、そしてHIV-1 Tat中の4つのB細胞エピトープを定めた。国際公開第99/02185号明細書に以前に記載したように、このより大きな配列の免疫原性領域は、ウサギの免疫系により認識された。これらの領域は以下の表Iでエキソン1のコンセンサス配列中に同定された：エピトープIは、エキソン1のAA位2-10の9個のアミノ酸配列としてウサギ抗体により同定された。エピトープIIは、エキソン1のAA位43-50の8個のアミノ酸配列として同定された。エピトープIIIは、エキソン1のAA位56-62の7個のアミノ酸配列として同定された。エピトープIVは、TatのAA位62-73の12個のアミノ酸配列として同定され、エキソン2の最初のPro(AA73)およびエピトープIIIの重複Ser62を含んだ。

20

【0029】

【表1】

表 I -コンセンサスTat配列

1	10	20
Met glu Pro <u>Val asp pro arg Leu Glu Pro Trp lys</u> His Pro Gly Ser Gln Pro lys thr		
	30	40
ala cys thr asn Cys Tyr Cys Lys lys Cys Cys phe his Cys gln val Cys Phe ile thr		
	50	60
<u>Lys gly Leu gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg arg arg ala pro gln</u>		
	70	
asp Ser gln thr his Gln val ser Leu ser Lys gln [配列番号:15]		

30

【0030】

しかし本発明では、発明者は霊長類のB細胞により特に認識されるエピトープIのアミノ酸配列に驚くべきシフトを検出した。表Iでは霊長類が認識するエピトープIおよびII配列に下線を付す。霊長類が認識するエピトープIは、Tatアミノ酸残基5~12に広がる。霊長類のB細胞により認識されるエピトープIIの配列は、アミノ酸41~50に広がる。エピトープIIIおよびIVは、引用により本明細書に編入する国際公開第99/02185号明細書に報告されるように、ウサギで認識されるエピトープと同じである。

40

A. 霊長類が認識するエピトープIの免疫原性組成物

1つの態様では、本発明は霊長類の免疫系により認識され、そしてインビボでその配列に暴露された霊長類に特異的な体液性免疫応答(本発明の目的に関する)を誘導する少なくとも2つのペプチドまたはポリペプチド変異体を含む組成物を提供する。これらの霊

50

長類が認識するエピトープIアミノ酸配列は、多数の“Tat配列変異体”に由来する表IのTatコンセンサス配列〔配列番号15〕のアミノ酸残基5～12に対応する。霊長類が認識するエピトープIは、一般式：R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2 配列番号8（式中、Y₇は、Arg、Lys、SerまたはAsnであり；X₉は、GluまたはAspであり；そしてZ₁₂は、LysまたはAsnである）のペプチドと定める。この式は種々の変異体哺乳動物エピトープIペプチドを可能にする。本発明の組成物は、Y₇はArgであり、そしてZ₁₂はLysである少なくとも1つのペプチド変異体、およびY₇はAsnであり、そしてZ₁₂はAsnである少なくとも第2のペプチド変異体を含まなければならない。

【0031】

上記の霊長類が認識するエピトープIの式において現れる特定のアミノ酸は、最少反応性の霊長類エピトープI配列である。最少エピトープI配列に対する抗体を生じるために、本発明の方法に使用される式により定められる各免疫原は、より大きなアミノ酸配列であることができる。例えば最少エピトープIアミノ酸は、全エピトープI免疫原性配列が8から約25の間のアミノ酸長となるように、別のアミノ酸により挟まれる。挟むアミノ酸の同一性はエピトープI免疫原の生物学的機能に必須ではない。特に霊長類が認識するエピトープI配列のN-末端上のさらなるアミノ酸は、免疫原性に影響しない。すなわち、霊長類が認識する各エピトープIペプチドについて、N-末端R1は非修飾N末端アミノ酸上の遊離水素、あるいは低級アルキル（例えばC1-C10アルキル）、またはアセチル基のような低級C1-C10アルカノイルであることができる。R1は、低級アルキルまたは低級アルカノイルの場合により置換された1から約5の間のアミノ酸の配列も含んでよい。好ましくはR1は2アミノ酸を表す。1つの態様では、R1がValであり、配列 Val-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂〔配列番号37〕（ここでX₇、X₉およびZ₁₂は上記定義の通りである）を生じる。別の態様では、R1がX₂-Pro-Valであり、配列 X₂-Pro-Val-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂〔配列番号38〕（ここでX₂がGluまたはAspであり；ここでX₇、X₉およびZ₁₂は上記定義の通りである）を生じる。好ましくはR1は3アミノ酸を表す。

【0032】

霊長類が認識するエピトープIの最少配列のC-末端上のさらなるアミノ酸は、抗体力価を強化することができる。C-末端R2はC末端アミノ酸上の単なる遊離ヒドロキシル基であることができるが、それはまたC末端アミドであることもできる。しかし力価を強化するために、R2は好ましくは1から約14個の間、好ましくはカルボキシル末端がアミド化された約4個のさらなるアミノ酸の配列である。好適な態様では、R2は-His-Pro-Gly-Ser-アミドであり、配列Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-His-Pro-Gly-Ser-〔配列番号16〕（ここでX₇、X₉およびZ₁₂は上記定義の通りである）を生じる。

【0033】

好ましくは本発明の組成物は、上記に同定した2つの必要なペプチドに加えて、霊長類が認識するエピトープIの式の少なくとも5または6個の異なる変異アミノ酸配列を含む。最も好ましくは、組成物は直ぐ下に同定する7または8個の変異アミノ酸配列を含んで成る。この組成物は、各々が異なるX₉、Y₇およびZ₁₂の組み合わせを含む他のペプチドまたはポリペプチド配列を含んでもよい。以下の実施例で示すように、霊長類が認識するエピトープI中で抗原可変性の3つの部位を用いて、本発明の好適な組成物は既知のすべてのBクレードおよび非-BクレードHIV-1 Tat変異体の95%を含むための2つの「必要な」ペプチド：

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列番号17および

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 配列番号18

ならびに以下のさらなるエピトープIペプチド：

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列番号19

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列番号20

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列番号21

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 配列番号22および

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2 配列番号23

の1～5個、ならびにさらに場合により稀な変異体 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [配列番号24]を含むことにより、霊長類が認識するエピトープIの十分なペプチドを含むことができる。

【0034】

本発明の霊長類が認識するエピトープIの組成物は、配列番号15のAA5からAA12の間のアミノ酸残基に相当するが、霊長類が認識するエピトープI組成物に対する抗体とは十分に交差反応しない他のTat変異体に由来する他の配列を含むさらに多数のペプチドまたはポリペプチドを含んでもよい。本発明のエピトープIの組成物は、5以上の異なるエピトープIペプチドの複数のコピーを任意の順序で含むことができる。1つの態様では、上記の[配列番号17～24]の7またはすべての8つのアミノ酸配列の少なくとも1コピーが存在する。

10

【0035】

本発明のこれらのペプチドまたはポリペプチドは、合成的または組換え的に生成される。任意のアミノ酸(例えば-Gly-Ser-)または他のアミノ酸または化学的化合物のスペーサーをペプチドと一緒に、またはキャリアーに連結する目的でペプチドの末端に含むことができる。この組成物はキャリアータンパク質に結合した合成ペプチドとして発現する1以上の上記ペプチドの状態を取ることにもできる。あるいは組成物は多数のエピトープIペプチドを含んでもよく、多抗原性ペプチドとして発現した各々を、場合によりキャリアータンパク質に結合する。あるいは選択したペプチドは連続的に連結し、そして組換え的に生産されるタンパク質中に発現させることができる。1つの態様として、上記の8つの特異的に特定された配列をその間にスペーサーアミノ酸を用いて、または用いずに連続的に連結してより大きな組換えタンパク質を形成する。あるいは組換えタンパク質はキャリアータンパク質と枠内で融合することができる。これらの霊長類エピトープI組成物は、HIV-1 Bおよび非-BクレードのTatタンパク質を含むHIV-1 Tatタンパク質の既知の変異体の95%より多くと反応性の抗体を誘導するように設計される。

20

【0036】

霊長類が認識するエピトープI組成物は、免疫感作した、免疫的にコンピテントな(immune competent)霊長類、すなわち非-感染ヒト、または無症候性の感染したヒトに、HIV-1のTatタンパク質の既知の変異体の95%より多く、そして好ましくは99%より多くに対して向けられた活性な体液性免疫応答(すなわち抗体)を誘導する生物活性を示す。そのような処置の最終結果は、急性感染後のHIV-1の増殖を損なうことである。この減損は、AIDSへの進行に関係するHIV-1の高いポスト-血清変換血漿レベルを防止する。HIV感染の無症状期における抗体の活発な誘導は、ウイルスの増殖を減少させ、血漿ウイルス負荷量を下げ、そして同様にAIDSへの進行を減少させる。少なくとも2つの必要な霊長類が認識するエピトープI免疫原、そして好ましくは7または8個のそれらエピトープI配列[例えば配列番号17～24]を含む組成物は、HIV-1の共通のBサブタイプの294の既知のTat配列、およびすでに配列決定された56種の非-B HIV-1サブタイプのすべてのTatタンパク質の約95%に対して免疫応答を誘導することができる[Esther Guzman博士の好意による、ロスアラモス NIAID HIVデータベース; GeneBank データベース]。

30

B. さらなるエピトープを含有する免疫原組成物

40

別の態様では、本発明は少なくとも1つのエピトープII配列および場合により1以上のエピトープIIIまたはIVペプチドと組み合わせた、霊長類が認識する2以上のエピトープI配列を使用する他の組成物を提供する。ウサギの免疫系により認識されるこれらHIV-1 TatエピトープII、IIIおよびIVは、本明細書に編入する国際公開第99/02185号明細書に詳細に記載されている。

【0037】

簡単に説明すると、エピトープII配列はインビボでエピトープII配列に暴露された霊長類に、特異的な体液性の免疫応答を誘導する。霊長類により認識されるエピトープIIは、式 R3-Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R4 [配列番号5] (ここでX₄₂はGlyまたはAlaである)のペプチドと定める。霊長類の免疫系により認識される最少エピトープは

50

、式、すなわち-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- (配列番号15のアミノ酸41~50)の特異的に同定されたアミノ酸である。これはまた、エピトープIIの現在好適な免疫原の配列でもある。X₄₂がGlyであるこの免疫原は、X₄₂がAlaである配列と交差反応性の抗体を誘導する。これは既知のHIV-1 Tatタンパク質の95%より多くと反応/交差反応する。このエピトープII配列は多数の既知のHIV-1 Tat変異体中の抗原可変性をもたない。N末端のR3は非修飾N末端アミノ酸Lys上の水素を表すか、またはR3はLys上の置換基である低級アルキルまたはアセチル基のような低級アルカノイルであることができる。またR3は、低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1から5個の間のアミノ酸の配列を含んでもよい。C末端のR4は、C末端アミノ酸の遊離ヒドロキシルを表すか、またはR4はそのC末端アミノ酸上のアミドでもよい。R4はスペーサーのようなさらなる非極性アミノ酸を含んでもよい。スペーサーの例としてgly-ser-gly-ser-を使用することができ、配列 Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Gly-Ser-Gly-Ser [配列番号25] (ここでX₄₂はGlyまたはAlaである)を生じる。しかしR4はエピトープIIの式中の最後のアミノ酸後にTat配列中に自然に存在する塩基性アミノ酸-Lys-Arg-Arg-であることはできない。294BクレードTat変異体中に見いだされるエピトープII配列は、霊長類により認識される(国際公開第99/02185号明細書に報告されているように、ウサギの免疫系は配列番号15のAA43-50に由来するエピトープを認識する)。

【0038】

エピトープIIは他の配列中に存在する時、それほど免疫原性ではない。すなわち最適な免疫原性には、この配列をキャリアータンパク質に融合または結合した合成ペプチドとして、あるいは場合によりキャリアータンパク質に結合した多数の抗原性ペプチドとして調製する。あるいはエピトープIIを組換えタンパク質のC末端配列として発現させることができ、これは場合によりそのアミノ末端配列でキャリアータンパク質に枠内融合される。本発明の組成物では、エピトープIIペプチドは好ましくは単独、または1以上の霊長類が認識するエピトープIペプチドと組み合わせて提示される。

【0039】

エピトープIIIは簡単に記載すると、そして国際公開第99/02185号明細書に同定されているように、式 R5-Arg-Arg-X₅₈-Z₅₉-A₆₀-Y₆₁-Ser-R6 [配列番号6] (式中、X₅₈はAla、Pro、SerまたはGlnであることができ; Y₆₁はAsp、Asn、GlyまたはSerであることができ; Z₅₉はProまたはHisであることができ; そしてA₆₀はGlnまたはProであることができる)のペプチドと定める。エピトープIVは式:R7-Ser-Gln-X₆₄-His-Gln-Y₆₇-Ser-Leu-Ser-Lys-Gln-Pro-R8 [配列番号7] (式中、X₆₄はAsnまたはThrであることができ;そしてY₆₇はAlaまたはValであることができる)のペプチドと定める。

【0040】

このように本発明の組成物、すなわち上記に同定したアミノ酸配列を含有するペプチド/ポリペプチドは、ヒト個体に提供した時、ほとんどのHIV-1株の細胞外Tatタンパク質の免疫学的阻止に有用である。これらの組成物はウイルスの長期の増殖を極めて下げるように機能し、そしてウイルスの効果的な免疫防御を可能とする。

【0041】

各エピトープの免疫原は好ましくは、各エピトープの自然に存在する変異体の最高群と反応性の抗体を誘導するように設計する。霊長類が認識するエピトープIのようなエピトープには、免疫原の多数のコピーを合成または組換え免疫原に包含させて免疫原性を強化し、そしてより高力価の抗体を生成することができる。さらに、各エピトープの配列における変異は独立して生じるので、2以上のエピトープに関する免疫原を組み合わせて範囲を広げることができる。すなわち1例として、本発明の組成物は霊長類が認識する2つの必要なエピトープIペプチドならびにキャリアータンパク質に結合される末端上にCysを用いて上記のように特異的に同定される4または5の他のエピトープIペプチドを含む。あるいは場合によりキャリアータンパク質に結合された多数の抗原性ペプチドを調製し、そして本発明の組成物を形成するために合わせることもできる。あるいは2以上の免疫原の混合物を使用することができる。

10

20

30

40

50

【0042】

任意のエピトープII、IIIもしくはIVまたは他の任意の免疫原を含むか、または含まない本発明の霊長類が認識するエピトープI免疫原は、例えば化学的に合成された、または組換えペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質または融合ペプチドとして様々な状態に調製し、そして免疫原性組成物中に使用することができる。

1. キャリアーに結合した組換えまたは合成ペプチド/タンパク質

1つの態様として、本発明の組成物は霊長類が認識する少なくとも2つの必要なエピトープI免疫原性アミノ酸配列(ならびにさらなる他のエピトープI配列)を含有し、そしてまた選択したキャリアータンパク質に結合された1以上のエピトープII/III/IV免疫原性アミノ酸配列を含有する合成または組換えで生成されるペプチドであることができる。本発明の組成物のこの態様では、フランキング配列を含むか、または含まない、多数の上記の霊長類が認識するエピトープIアミノ酸配列をポリペプチドに連続して連結し、そして同じキャリアーに結合することができる。あるいはエピトープI、II、IIIまたはIV免疫原をペプチドとして個別に同じかまたは異なるキャリアータンパク質に結合し、そして生成した免疫原キャリアー構築物を一緒に混合して、1つの組成物を形成することができる。そのような配列は化学合成の常法により合成的に、またはこれもまた現在では通例の手段により選択した宿主細胞中での発現により組換え的に作ることができる。

【0043】

この態様に関して、キャリアータンパク質は望ましくは選択した免疫原の免疫原性を強化することができるタンパク質または他の分子である。そのようなキャリアーは、アジュバント効果を有するより大きな分子でよい。通例のタンパク質キャリアーの例には限定するわけではないが、大腸菌(*E. coli*) DnaKタンパク質、ガラクトキナーゼ(*galK*、これは細菌におけるガラクトース代謝の第1段階を触媒する)、ユビキチン、 γ -接合因子、 γ -ガラクトシダーゼおよびインフルエンザ NS-1タンパク質を含む。ジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドのようなトキソイド(すなわち毒性活性を排除するために十分に修飾した自然に存在するトキシンをコードする配列)もキャリアーとして使用することができる。同様に種々の細菌の熱ショックタンパク質、例えばマイコバクテリアhsp-70を使用することができる。グルタチオンレダクターゼ(*GST*)は別の有用なキャリアーである。当業者は、適当なキャリアーを容易に選択することができる。

【0044】

特に望ましい免疫原-キャリアータンパク質構築物では、2つの必要なエピトープI免疫原および霊長類が認識する3~6個のさらなるエピトープI免疫原および場合により免疫原性ペプチド/ポリペプチドを、マイコバクテリアの大腸菌(*E. coli*)熱ショックタンパク質70(*hsp70*)に共有的に連結することができる[K. Suzue et al., *J. Immunol.*, 156:873(1996)]。別の望ましい態様では、組成物は免疫原を含有するペプチドまたはポリペプチド配列をジフテリアトキソイドに共有的に連結することにより形成される。

2. 多抗原性ペプチド

さらに別の態様では、ペプチドまたはポリペプチドエピトープ免疫原および選択された任意の免疫原は多抗原性ペプチド("MAP"、または8量体リシンコアペプチドとも呼ぶ)構築物の状態であることができる。そのような構築物は、Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5409-5413(1988)により記載されているMAP系を使用して設計することができる。この系は記載されているように本発明の霊長類が認識する同じエピトープIの多数のコピーが中に合成されるリシン残基のコアマトリックスを使用する[D. Posnett et al., *J. Biol. Chem.*, 263(4):1719-1725(1988); J. Tam, 「化学的に定めた合成免疫原および多抗原ペプチド法によるワクチン(Chemically Defined Synthetic Immunogens and Vaccines by the Multiple Antigen Peptide Approach)」、ワクチンの研究開発(*Vaccine Research and Developments*)、第1巻、W. Koff and H. Six編集、pp51-87(マーセル デブラウ(Marcel Deblau)社、ニューヨーク、1992)]。各MAPは唯一のペプチドの多数のコピーを含む。したがってMAPを含有する組成物は少なくとも2つ、そして好ましくは約7個のMAPを含むだろう。1つのMAPは各リシンコアに結合した必要とされる第1のペプチドまたはポリペプチドエピ

10

20

30

40

50

トープI免疫原を含み；第2のMAPはMAPは各リシンコアに結合した必要とされる第2のペプチドまたはポリペプチドエピトープI免疫原を有するだろう。さらに、各々が上記で同定した霊長類により認識される異なるエピトープIアミノ酸配列を含む他のMAPも含むことができる。多数の異なるMAPは、エピトープI、II、IIIまたはIV配列の所望する組み合わせを得るために使用することができる。好ましくはこれらのMAP構築物は他のT細胞刺激配列を付随するか、または医薬組成物として既知のアジュバントのようなT細胞刺激剤と併せて投与される。

3. スペース

上記組成物のいずれにおいても、例えばペプチド/ポリペプチド-キャリアー構築物またはMAPとして、各ペプチド/ポリペプチド免疫原または免疫原中の各アミノ酸配列は、場合により「スペース」と呼ばれる任意のアミノ酸配列により分けることができる。スペースは、2つの配列の間に挟まれて免疫原の3次元構造に悪影響を及ぼすことなくそれらの間の連結を可能とする1~約4個の間のアミノ酸配列である。スペースは所望する場合、制限エンドヌクレアーゼ開裂部位を含んでスペースの分離を可能とすることができる。適当なスペースまたはリンカーは当業者に知られており、そして容易に設計および選択され得る。好適なスペースは、Glyおよび/またはSerアミノ酸を含有する配列である。

10

F. 合成または組換え的に生成した遺伝子を含有する本発明の核酸組成物

本発明の他の態様には、上記組成物のペプチドおよびポリペプチド免疫原を含み、そしてキャリアータンパク質に融合したそれらペプチドおよびポリペプチドを含む、上記の霊長類が認識するエピトープIペプチド/ポリペプチド組成物をコードする核酸配列を含む。核酸配列はキャリアータンパク質をコードする配列も含むことができる。

20

【0045】

このように本発明の1つの好適な態様は、霊長類が認識する少なくとも2つの必要なエピトープI免疫原ペプチド/ポリペプチドを連続的にコードする「合成遺伝子」である。遺伝子は「合成」と言うが、これは所望により化学的合成または組換え手段により設計することに注目されたい。合成遺伝子は好ましくは、特異的に同定される霊長類が認識するエピトープIアミノ酸配列 [配列番号 17 ~ 24] の7またはすべての8個をコードする。また合成遺伝子は、エピトープIIまたはIIIペプチドが霊長類が認識するエピトープI配列のC末端に融合され、そしてそれが持つC末端でさらに修飾されないならば、場合により選択したエピトープIIまたはIII免疫原をコードすることもできる。合成遺伝子は2つの必要なエピトープIアミノ酸配列の複数のコピー、あるいはさらなる多数の異なる免疫原またはアミノ酸配列のコピー、あるいは多数の異なる免疫原またはアミノ酸配列の多数のコピーをコードすることができる。合成遺伝子は選択したアミノ酸配列を、キャリアータンパク質をコードする核酸配列を含む、または融合するオープンリーディングフレーム内にコードする合成遺伝子であることができる。さらに合成遺伝子の特徴は、それが免疫原をコードする各配列間に、かつ/または免疫原をコードする配列とキャリアータンパク質をコードする配列の間にスペースをコードすることである。

30

【0046】

本発明の合成遺伝子は、合成または組換え分子の一部でもよい。合成分子は、プロモーター、終止シグナル等のような調節要素をコードする核酸配列の操作的制御下に、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質または融合ペプチドをコードする合成遺伝子を含むベクターまたはプラスミドのような核酸構築物でよい。そのような合成分子は、ポリペプチド/ペプチド免疫原組成物を組換え的に生成するために使用することができる。合成遺伝子または合成分子は、化学合成法または好ましくは組換え技法の使用により調製することができる。例えば、合成遺伝子または分子は、示す宿主細胞種について特定の好ましいコドンを含むことができる。

40

【0047】

好ましくはDNAの状態の合成遺伝子または分子は、種々の方法で使用することができる。例えばこれらの合成核酸配列は、宿主細胞培養においてインビトロで本発明のペプチド/

50

ポリペプチドを発現するために使用することができる。発現した免疫原は、適当な精製後、医薬試薬またはワクチンに包含することができる。あるいは本発明の合成遺伝子または合成分子は、哺乳動物、好ましくはヒトにいわゆる「裸のDNA」として直接投与して、患者内にてインピボでタンパク質/ペプチド免疫原を発現することができる。例えば、J.Cohen, *Science*, 259:1691-1692 (1993年3月19日); E.Fynan et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90:11478-11482(1993年12月); およびJ.A.Wolff, et al., *Biotechniques*, 11:474-485(1992)を参照にされたい(すべては引用により本明細書に編入する)。合成分子、例えばベクターまたはプラスミドは、哺乳動物宿主に直接注射するために使用することができる。これは宿主細胞によるタンパク質の発現、そして続いてインピボで抗体形成を誘導するために免疫系に対する提示をもたらす。

10

G. 合成遺伝子を発現する微生物

本発明のさらに別の観点では、本発明の合成遺伝子または分子を非-病原性微生物に取り込むことができる。生成した微生物は哺乳動物宿主に投与した時に発現し、そしてインピボで本発明の発現した組成物を複製して、特異的な抗体形成を誘導する。例えば本発明の組成物または合成遺伝子を運び、そして哺乳動物患者へ投与するために有用な非-病原性の組換えウイルスまたは片利共生細菌は、通例の方法により調製され、そして既知の非-病原性微生物の中から選択することができる。

【0048】

合成分子を患者に外から送達するために、かつ/または合成遺伝子を患者のインピボに運ぶために有用であり得る片利共生細菌には、限定するわけではないが、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、例えばS.ゴルドニー (*gordonii*)、または大腸菌 (*E.coli*)、バチルス (*Bacillus*)、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) およびサッカロミセス (*Saccharomyces*) の種々の株を含む。

20

【0049】

合成遺伝子を宿主の細胞に運ぶために工作できる適当な非病原性ウイルスは、ワクシニアのようなボックスウイルス、アデノウイルス、アデノ-随伴ウイルス、カナリア痘ウイルス、レトロウイルス等を含む。そのような多数の非-病原性ウイルスは通常、ヒトの遺伝子療法に、そして他のワクチン剤のキャリアーとして使用され、そして当業者には既知であり、そして選択可能である。

H. 本発明の組成物の調製または製造

30

本発明の組成物、および本発明の霊長類が認識するエピトープI免疫原および場合により1以上のエピトープII、IIIまたはIVを含有する個々のポリペプチド/ペプチド、本発明の合成遺伝子および合成分子は、Merrifield, *J.Amer.Chem.Soc.*, 85:2149-2154(1963)に記載されるように、既知の化学合成技法により通常に調製することができる。あるいは本発明の組成物は、任意の他の免疫原および任意のキャリアータンパク質を含む霊長類が認識する少なくとも2つの必要なエピトープI配列を含むペプチド/ポリペプチドをコードする配列を持つDNAフラグメントをクローニングし、そして宿主微生物または細胞内で発現させることにより、既知の組換えDNA法により調製することができる。エピトープIおよび任意の免疫原のコード配列は、合成的に調製することができるか [W.P.C.Stemmer et al., *Gene*, 164:49(1995)]、または既知の技法によりウイルスRNAから、または利用できるcDNA-を含有するプラスミドから誘導することができる。

40

【0050】

これらの技法の組み合わせを使用してもよい。例えば通常の方法による連続的な免疫原の集成は合成遺伝子の生成に使用することができ、そして部位特異的突然変異誘発法を使用して所望の免疫原の配列を提供することができる。次いで合成遺伝子の産物を組換え的に生産する。これらの操作のすべては、通例の技法により行うことができる。

【0051】

合成遺伝子または分子を使用した本発明のペプチド/ポリペプチド組成物のクローニングおよび発現に関する系には、組換え法で周知な種々の微生物および細胞の使用を含む。これらには例えば、大腸菌 (*E.coli*)、バチルス (*Bacillus*)、ストレプトマイセス (*Stre*

50

ptomyces) およびサッカロミセス (Saccharomyces) の種々の株、ならびに哺乳動物、酵母および昆虫細胞を含む。それらに適当なベクターは既知であり、そして私的および公的な研究室および寄託機関ならびに市販の売り主から入手することができる。現在、最も好適な宿主は、チャイニーズハムスター卵母細胞 (CHO) またはCOS-1細胞のような哺乳動物細胞である。これらの宿主はワクシニアまたはブタボックスのようなボックスウイルスベクターと一緒に使用することができる。形質転換、培養、増幅、スクリーニングおよび産物の生産および精製のための他の適当な宿主細胞および方法の選択は、既知の技法を参照にすることにより当業者により行うことができる。例えば、中でもGething and Sambrook, *Nature*, 293:620-625(1981)を参照にされたい。他の好適な系には、バキュロウイルス発現系およびベクターを含む。

10

【0052】

通例の組換え手段により生成した時、本発明の組成物、すなわち霊長類が認識するエピトープI免疫原および任意の免疫原の示したコピーを含むポリペプチド/ペプチドは、細胞の内容物から通例の溶解技法により、またはクロマトグラフィーのような通例の方法によりいずれかで細胞媒質から単離することができる。例えばSambrook et al., *モレキュラークローニング。ア ラボラトリーマニュアル (Molecular Cloning. A Laboratory Manual)*, 第2版、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(1989)を参照にされたい。DNAワクチンとしてペプチド/ポリペプチドのいずれかの成分の生産に使用する適当なプラスミドおよびウイルスベクターは当業者には周知であり、そして本発明を限定するものではない。タンパク質の生産についてはSambrook et al. 同上および上記の技術文献を参照にされたい。または1994年1月20日に公開された国際公開第94/01139号明細書も参照にされたい。簡単に説明すると、選択したペプチド/ポリペプチドをコードするDNAを、他の任意のランキング配列、プロモーター、mRNAリーダー配列、開始部位およびインビボまたはインビトロでその配列の増幅および発現を支配することができる他の調節配列を含むベクターまたはプラスミドに挿入する。これらのベクターは患者の細胞の感染およびインビボで合成遺伝子配列のタンパク質/ペプチドとしての発現、またはインビトロで融合タンパク質/ペプチドとしてその発現を可能とする。

20

【0053】

調製した組成物は、任意の数の免疫原を含む霊長類が認識するエピトープI組成物に配合し、そしてインビボアッセイにより効力をスクリーニングすることができる。そのようなアッセイは、動物、例えばサルを組成物で免疫感作し、そしてHIV-1のTatタンパク質または変異体Tat配列に対応する合成の検出体 (detector) ペプチドに対する抗体の力価の評価を使用する (以下の実施例で示すように)。

30

I. 本発明の抗体組成物

本発明の抗体組成物またはリガンド-結合組成物は、式 $-Asp-Pro-Y_7-Leu-X_9-Pro-Trp-Z_{12}$ - [配列番号9] (式中、 Y_7 は、Arg、Lys、SerおよびAsnから成る群から選択され；式中、 X_9 は、GluおよびAspから成る群から選択され；式中、 Z_{12} は、LysおよびAsnから成る群から選択される) のエピトープIに特異的に結合する少なくとも1つの抗体を包含する。好ましくはそのような抗体組成物は、本明細書で定める少なくとも2つの必要なエピトープI配列に特異的に結合する少なくとも2以上の異なる抗体またはリガンドを含む。抗体 (または他の結合リガンド) は、エピトープIの2つの必要な配列 R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [配列番号17] ; および R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [配列番号18] に対して生成される。組成物の抗体はこのようにHIV-1 Tatタンパク質の多数の変異体上に存在するHIV Tatタンパク質に結合する。さらに上記のエピトープIの式内に入る (falling) 他の配列に対する抗体またはリガンドを生成する。

40

【0054】

1つの態様では、上記のように本発明のエピトープIペプチドまたはポリペプチドに結合するように向けられた単離された抗体も本発明の観点の中にある。そのようなポリクローナル抗体は、典型的には哺乳動物、好ましくは霊長類を上記の2つの必要なエピトープI

50

免疫原、ならびに霊長類が認識する他のエピトープI免疫原および任意の免疫原の寄せ集めを含有するペプチド/ポリペプチド組成物で免疫感作することにより生成される。特に免疫原として望ましいのは、以下の実施例3に記載する合成遺伝子または融合タンパク質のような7個の霊長類が認識するエピトープI免疫原(すなわち稀な変異体無し)または8個の免疫原、および/または一価のエピトープII免疫原(すなわち場合によりキャリアに結合した単一のエピトープIIペプチド)である。霊長類で生成することに加えて、そのような抗体はいわゆる「ヒト化」トランスジェニックマウスを含むトランスジェニック動物でも生成することができる。しかし本発明の組成物に対してポリクローナル抗体を生じるために望ましい宿主にはヒトを含む。エピトープI組成物に対して暴露された哺乳動物で生成するようなポリクローナル抗体の力価は、酵素-結合免疫吸着アッセイを用いるような標準的な技法により監視することができる。所望により、抗体分子は哺乳動物から、例えば全血、血漿または血清から単離することができ、そしてさらに通例の技法により免疫感作した哺乳動物の血漿または血清から精製することができる。通例の回収法には、中でも血漿瀉血、プロテインAクロマトグラフィーを含む。そのようなポリクローナル抗体組成物は、それら自体で本発明の医薬組成物として使用することができる。

【0055】

あるいは抗体生産細胞を哺乳動物から得、そして他の形態の抗体およびリガンド、例えばモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイ(phage display)をスクリーニングすることにより生成されるリガンド、それらの抗体フラグメントおよび混合物、および合成抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および完全なヒト抗体を調製することができる。これらの種類のリガンドを生成する調製的技法は既知であり、そしてリガンド自体は霊長類が認識するエピトープIおよび任意の免疫原の開示されたアミノ酸配列を使用して生成することができる。例えばKohler and Milstein (1975) *Nature*, 256:495-497; Kozbor et al., (1983) *Immunol. Today*, 4:72; Cole et al., 1985, *モノクローナル抗体および癌療法 (Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)*、アラン R. リス(Alan R. Liss)社、第77-96頁; Harlow et al., *抗体: アラボラトリーマニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)*、コールドスプリングハーバーラボラトリー、(1988); Queen et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10032(1989); Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421(1991); 国際特許出願PCT/GB91/01554号、国際公開第92/04381号明細書、および国際特許出願PCT/GB93/00725号、国際公開第93/20210号明細書を参照にされたい]。

【0056】

例えば別の態様ではモノクローナル抗体は、上記に定める可変アミノ酸およびR基を含むエピトープIの式により定められる任意のより大きな免疫原を含んで成るHIV Tatタンパク質の-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂- [配列番号9]により定められる最小のエピトープI配列に特異的に結合する。1つの態様として、モノクローナル抗体はアミノ酸配列-Asp-Pro-Asn-Leu-X₉-Pro-Trp-Asn- [配列番号26] (ここでX₉はGluまたはAspである)に特異的に結合する。さらに上記式により定められる最小のエピトープI配列に特異的に結合する他のモノクローナル抗体は、本発明の一部である。

【0057】

本発明の別の態様ではモノクローナル抗体は、すでに記載した抗体により認識される-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [配列番号11]のエピトープとは異なるエピトープとして、アミノ酸配列-Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [配列番号10] (ここでX₄₂はGluまたはAlaである)を含んで成る最小エピトープII配列に特異的に結合する。好ましくは抗体組成物は、X₄₂がGlyであるペプチドおよびX₄₂がAlaであるペプチドの両方に交差反応性である1つの抗体を含んで成る。これらの抗体は好ましくは霊長類で生成される。上記式により定める最小エピトープII配列に特異的に結合するさらに別のモノクローナル抗体は、本発明の一部である。

【0058】

他の抗-Tat抗体は、HIV-1 Tatに結合する免疫グロブリンライブラリーの員を単離するた

10

20

30

40

50

めに、本発明の霊長類が認識するHIV-1 Tatエピトープを用いて組換え組み合わせ免疫グロブリンライブラリー（例えば抗体展示ファージ）をスクリーニングすることにより開発することができる [W.D.Huse et al., *Science*, 246:1275-1281(1988)]。ファージディスプレイライブラリーの作成およびスクリーニングに関するキットは販売されており、例えばファルマシア (Pharmacia) の組換えファージ抗体系、カタログ番号27-9400-01; ストラテジーン (Stratagene) 展示ファージキット等。例えば米国特許第5,223,409号明細書、国際公開第92/09690号、同第90/02809号明細書等を参照にされたい。キメラ抗体も既知の技法を使用して同様に開発することができる [中でもMorrison et al., (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81:6851; Takeda et al., *Nature*, 313:452(1984)]。キメラ抗体は異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。単鎖抗体は本発明により生成されるポリクローナルまたはモノクローナル抗体の可変部分を使用して、通例の方法 [例えば米国特許第4,946,778号および第4,704,692号明細書] により調製することもできる。Fab、F(ab')₂ およびFvフラグメントのような抗体フラグメントおよびそれらのライブラリーも、本発明の様々な観点で使用することができる。

10

【 0 0 5 9 】

これらの抗体/リガンド組成物は、望ましくはほとんどの既知のHIV-1 Tatタンパク質変異体（例えば既知のTatタンパク質変異体の95%より多く、そして好ましくは99%より多い）に結合し、そしてさらにTatタンパク質によるHIV-1増殖の支持を防止する。そのような組成物はHIV-1の多数の株に由来するHIV-1 Tatタンパク質のエピトープ配列に結合する多数の異なる抗体の混合物を含むことができる。すなわちこれらの抗体は以下に記載する製薬的方法および製剤に有用である。

20

J. 本発明の医薬組成物

本発明の別の観点で、既知のHIV-1 Tatタンパク質のほとんど（例えば95%より多く、そして好ましくは99%より多い）と反応し、そしてHIV-1の増殖を減じる抗体を誘導するために有用な医薬組成物は、その活性剤として霊長類が認識する本発明の少なくとも2つの必要なエピトープIペプチドまたはポリペプチド、および好ましくはさらなるエピトープIペプチドを含んで成ることができる。幾つかの望ましい組成物には、以下の上記成分を含む：

(a) 少なくとも2つの必要な、そしてより好ましくは少なくとも7つの霊長類が認識するエピトープIアミノ酸配列 [配列番号 1 7 ~ 2 4] を含むペプチド/ポリペプチド免疫原；

30

(b) さらに任意のエピトープII、IIIまたはIVのアミノ酸配列、好ましくは一価のエピトープII免疫原を含む (a) のペプチド/ポリペプチド免疫原；

(c) 霊長類が認識する2つの必要なエピトープI配列、および好ましくはエピトープI配列 [配列番号 1 7 ~ 2 4] の7つおよび上記の任意の配列をコードする合成または組換え的に生成した遺伝子；

(f) (c) の合成遺伝子を含む合成分子；

(g) 合成遺伝子または上記の分子を持つ組換えウイルス；および

(h) 合成遺伝子または上記の分子を持つ片利共生細菌。

40

【 0 0 6 0 】

選択した活性成分（1つまたは複数）は製薬学的に許容されるキャリアー中に存在し、そして組成物はさらなる材料を含んでもよい。本発明の組成物を含有する医薬製剤は、タンパク質/ペプチド組成物にMAPのT細胞刺激剤、アジュバントおよびIL-12のような免疫刺激サイトカイン、および他の周知のサイトカインのような他の活性剤を含むことができる。これらすべての医薬組成物は、哺乳動物のウイルスレベルを下げるために作動することができる。

【 0 0 6 1 】

医薬組成物として、霊長類が認識するエピトープIペプチドまたは核酸配列および任意の免疫原配列を含んで成る組成物は、ウイルス感染の予防または処置のための哺乳動物への投与に適する製薬学的に許容される賦形剤と混合する。タンパク質/ペプチドは投与のた

50

めの単一の医薬調製物中で合わせることができる。本発明の免疫原性タンパク質様組成物で使用するために適当な製薬学的に許容されるキャリアーは、当業者には周知である。そのようなキャリアーには例えば塩水、緩衝化塩水、水酸化アルミニウムおよびマグネシウムの水性懸濁液のような選択したアジュバント、リポソーム、水中油型乳液およびその他を含む。適当なアジュバントは、本発明のタンパク質-含有組成物中に使用することができる。DNA、プラスミド核酸または組換えベクターの投与に適当な賦形剤には、限定するわけではないが、塩水またはシュクロース、プロタミン、ポリブレン、ポリリシン、ポリカチオン、タンパク質、CaPO₄またはスペルミジンを含む。例えば国際公開第94/01139号明細書および上記に引用した技術文献を参照にされたい。ペプチド/ポリペプチド組成物および合成遺伝子または分子はインビボで、免疫感作した宿主の哺乳動物、例えばヒトに

10

【0062】

HIV-1の増殖を減損するために有用なさらに別の医薬組成物は、上に詳細に記載した1以上の抗体を含有する抗体組成物を含んで成る。医薬組成物では、抗体は塩水溶液または他の適当なキャリアー中で運ばれる。抗体組成物は即座の、外から提供されるTatの阻止を提供することができる。

【0063】

本発明は通例の生理学的に許容されるキャリアー、アジュバント、または上記の種類

20

K. 本発明の方法 - HIV-1増殖の減損

本発明により、HIV-1のウイルスレベルを減少させる方法には、ヒトを上記のTat抗体 - 誘導医薬組成物に暴露し、多数のHIV-1 Tatタンパク質（例えば既知の95%より多く、そして好ましくは99%より多い）と反応する抗体を活発に誘導し、そしてインビボでウイルスの増殖を減じることを含む。この方法はコンピテントな免疫系を持つHIV-1に感染した個体に、あるいは非感染個体の能動免疫感作に相当である。この方法は、HIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を誘導し、HIV-1の初期の急性感染中にウイルス増殖を減少させ、そしてAIDSを導く慢性のウイルス血症を最小とする。またこの方法は、感染した個体の慢性的なウイルス増殖も下げ、ここでもAIDSへの進行を最小とする。これらの方法の使用は慢性のHIV-1感染を防御し、耐性の発生に供することなく新規な処置のメカニズムを提供する。細胞外Tatタンパク質はウイルス複製部分とは関係しないので、Tatに対する抗体は、生成されているTatとは無関係にHIV-1 準種 (quasispecies) の複製を阻害する。よってどのメカニズムによりTat抗体が非反応性のエスケープTat変異体に関する選択圧を生じることができたのかは明らかではない。

30

【0064】

この方法により、医薬組成物は好ましくはペプチド/ポリペプチド組成物、合成遺伝子または分子、組換えウイルスまたは片利共生細菌を含む。好ましくは組成物は7価の合成遺伝子または融合タンパク質（エピトープIの稀な変異体無しで）、あるいは実施例3の8価の合成遺伝子または融合タンパク質および任意に1価のエピトープIIペプチドを含む。医薬組成物のこれらの活性成分の各々は、感染細胞から他の感染または非感染細胞へのTatの輸送を遮断する抗-Tat抗体の形成を暴露したヒト中で活発に誘導する。この作用は感染の多重度を下げ、そしてHIV-1 ウイルス拡大のバーストを遮断し、すなわちウイルスレベルを下げる。すでに感染した患者では、このウイルスレベルの低下法は慢性ウイルス血症およびAIDSへの進行を下げるることができる。非感染のヒトでは、本発明の組成物の投与は急性の感染を減じることができ、すなわち慢性ウイルス血症およびAIDSへの進行を最小にする。

40

【0065】

50

さらに本発明の別の観点は、HIV-1による感染に対して効果的または迅速な免疫応答を上げることができないヒトに、上記の抗体組成物を含有する医薬組成物を投与することにより、HIV-1のウイルスレベルを下げる方法である。この方法は組成物を長期に投与することを含むことができる。中でもこの方法を用いた処置に適するような患者は、疾患により免疫抑制になり、そして強力な免疫応答を上げることができないHIV-1感染患者である。HIV-1感染の後期では、疾患に付随する免疫傷害により抗体の効果的な力価生成の見込みは低い。また中でもそのような患者は、HIV-1に感染した妊婦、感染した母親から生まれた新生児、および暴露されたと推定される非免疫感作患者である（例えば、HIV-1感染したヒトにより使用された針で偶然「刺された」ヒト）。

【0066】

そのような患者に関して、本発明の方法は好ましくは医薬組成物として本発明の抗体組成物を使用する。抗体組成物には他の哺乳動物、好ましくは正常なヒトで調製されたポリクローナル抗体組成物、あるいは上記の他の抗体形態、例えばモノクローナル等を含む。これらの抗体組成物は、受動免疫療法として投与してウイルス増殖を阻害し、そしてウイルス負荷量を下げる。HIV-1に由来する多数の既知のTatタンパク質と反応する外因性抗体は患者内に、ウイルス感染した細胞からのTatを他の感染または非感染細胞へ輸送することを直ちに阻止することを提供する。この方法により、患者は長期の処置養生中、抗体組成物で長期に処置することができる。

【0067】

上記の各方法では、本発明の組成物を適当な経路、例えば皮下、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、鼻内または吸入経路により投与する。現在好適な投与経路は、免疫感作（能動誘導）組成物には筋肉内であり、そして抗体（受動療法）組成物には静脈内（i.v.）、皮下（s.c.）または筋肉内（i.m.）である。組換えウイルスベクターまたは裸のDNAは好ましくは筋肉内に投与される；しかし他の特定の組換えウイルスベクターおよび/または生きている片利共生細菌を経口的に送達してもよい。

【0068】

各ワクチン用量中に存在する本発明のタンパク質、ペプチドまたは核酸配列の量は、患者の年齢、体重、性別、一般的な身体状態等を考慮して選択される。免疫応答、好ましくは防御応答を誘導するために、あるいは重大な副作用無しに患者に外因的効果を生じるために必要な活性成分の量は、使用する医薬組成物およびアジュバントの任意の存在（例えばタンパク質を含有する組成物について）に依存して変動する。

【0069】

一般に、タンパク質/ペプチド、融合タンパク質、MAPまたは結合したタンパク質を含有する組成物、あるいは抗体組成物について、各々の用量は1mLの滅菌溶液あたり約50 μ g～約20mgの間のペプチド/ポリペプチド免疫原を含んで成るだろう。より好適な投薬用量は、約500 μ gの免疫原である。他の投薬用量範囲も、当業者により企図される。初期用量は場合により望む場合は追加免疫により繰り返される。

【0070】

本発明の抗体組成物は、針により刺されたり、または材料の感染により急性感染の危険性がある個体の長期処置に使用することができる。そのような「急性」感染に関する投薬頻度は、約6週間にわたり毎日の投薬から1週に1または2回のi.v.、s.c.またはi.m.の範囲でよい。本発明の抗体組成物は感染患者、または進行したHIV患者の長期の処置に使用することができる。感染患者では、長期投与の頻度は毎日の投薬から1カ月に1または2回のi.v.、s.c.またはi.m.の範囲でよく、そして免疫原の半減期（例えば約7～21日）に依存するだろう。しかしそのような感染した患者の長期的処置の期間は定まらず、しかし長期になると思われる。

【0071】

あるいは本発明の組成物は、「裸のDNA」として本発明の合成遺伝子または分子の直接投与を設計することができる。タンパク質免疫原組成物のように、DNAおよびベクター組成物中の成分の量および投与様式（例えば注射または鼻内）は、当業者により選択され、そ

10

20

30

40

50

して調整され得る。一般に各用量は1 mLの滅菌溶液あたり約50 μ gから約1 mgの間の免疫原をコードするDNAを含んで成る。

【0072】

合成遺伝子または分子を含有する組換えウイルスについては、用量は約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ pfu/mlの本発明の組換えウイルスの濃度を含有する約20から約50mlの塩溶液の範囲であり得る。好適なヒトへの投薬用量は、上記濃度で約20mlの塩溶液である。しかし当業者はそのような投薬用量が宿主に送達される組換えウイルスの独自性および免疫原の作りに依存して変わり得ると理解している。

【0073】

患者に送達される合成遺伝子または分子を運ぶ片利共生細菌の量は、一般に約 10^3 から 10^{12} 細胞/kgの間の範囲である。これらの投薬用量は、使用する細菌および生きている細菌により送達されるエピトープおよび任意の免疫原を含有する特定の組成物に依存して、当業者により変えることができる。

【0074】

このよう本発明の組成物は、選択したウイルスによる非感染哺乳動物、例えばヒトの感染を遅らせるか、または最小にするように設計する。そのような組成物は、このようにワクチンとしての用途を有する。抗-Tatタンパク質抗体は、感染後の血清変換を検出するために診断アッセイに使用されるHIV-1タンパク質と反応性ではない。すなわち本発明の組成物で処置された個体は、HIV-1感染について疑陽性試験の烙印を押されず、そして処置した患者がHIV-1に感染するようになった場合、血清変換を検出する可能性を残す。

【0075】

たとえタンパク質/ペプチドを含有する組成物として、または免疫原をコードする新規核酸配列の投与によるいずれでも、哺乳動物に本発明の組成物を提供すると、これは望ましくはHIV-1の既知のTatタンパク質変異体の約95%より多く、そして好ましくは約99%より多くの生物学的阻止によりウイルスレベルを下げるのが可能となり、HIV-1の多重度を下げるので、根本的に異なる方法のAIDS予防接種を可能とする。

【0076】

Tat免疫原を含有する組成物の使用は、そのようなウイルスに対して使用される他の処置および予防法とは対照的に、特に望ましい利点を有する。細胞外でのTatタンパク質の阻止は、すべてのHIV準種または株の増幅を無差別に障害するので、突然変異体ウイルス変異体の選択について親のウイルス自体に関する選択圧を生じない。すなわち、患者の細胞によるTatタンパク質の取り込みの遮断は、ウイルス血症のレベルを減少するだけでなく、「エスケープ変異体」の選択を排除する様式でもウイルス血症のレベルを減少する。

【0077】

さらに疾患の経過中、細胞外Tタンパク質はHIV-1感染のその段階で存在する持続的感染および免疫異常に寄与するので、本発明はウイルス血症の無症状HIV-1感染患者を活発に処置する方法を含んで成る。本発明に従い免疫感作により誘導される抗体による細胞外Tタンパク質の阻止は、より効果的な免疫防御でウイルス血症を低下させ、そしてAIDSへの進行の遅れまたは防止をもたらす。

【0078】

上記の本発明のメカニズムは、ウイルス感染の過程を妨げ、そして望ましい臨床結果を生じる。より具体的には、本発明の組成物は非感染細胞によるTatタンパク質のさらなる取り込みを遮断することにより、ウイルスにすでに感染した患者のウイルス血症を減少することができる。単独またはHIV感染患者のための他の治療的処方と一緒に使用される本発明の組成物は、ウイルス血症の減少および臨床的な悪化の防止を補助すると思われる。

【0079】

そのような治療的使用については、投与の製剤および様式は上記に具体的に記載したものと実質的に同一であり、具体的なウイルス感染について他の通例の治療と同時 (concurrently or simultaneously) に投与することができる。治療的使用または予防的使用のために、1年後の追加免疫または他の間隔の追加免疫のような免疫感作組成物の繰り返し投与

10

20

30

40

50

が望ましいかもしれない。

L. 本発明の診断キット

上記のペプチドおよびポリペプチドは、上記組成物の予防接種により誘導される抗体の力価および特異性を測定および検出するために有用なキットの試薬としても使用することができる。本発明のキットは上記に同定した少なくとも2つの必要なエピトープIペプチド、および好ましくは2以上の霊長類が認識するエピトープIおよび任意の免疫原を含むことができる。1つの態様では、各ペプチドはそのN末端にタンパク質ビオチンおよびスペーサー、例えば-Ser-Gly-Ser-Gly-[配列番号27]を有する。あるいは、ペプチドはそのC末端にスペーサー、例えば-Gly-Ser-Gly-Ser-[配列番号39]およびタンパク質ビオチンを有する。これらの態様で、ペプチドがアビジン-コート固体支持体、例えばプレートまたはビーズに結合できるようになる。診断アッセイ分野で当業者に既知の他の結合剤は、同じ目的に使用することができる。またキットに提供されるのは、ヤギ抗-ヒト免疫グロブリン等のような固定化エピトープペプチドへの抗体の結合を検出する標識試薬である。試薬上の標識は、放射性化合物、蛍光化合物およびタンパク質、発色酵素等のような多くの既知の診断標識から選択することができる。キットはまた、標識を読むための種々雑多の試薬および装置、例えば発色シグナルを生成するために、このように酵素標識と相互作用する特定の基質、例えば血液サンプルを採取する装置ならびに適当なバイアルおよび他の診断アッセイ部品を含む。当業者はこのキットのために他の通例の診断成分も容易に選択することができる。

【0080】

そのようなキットおよび試薬は本発明の組成物で予防接種した個体中の抗体の力価および反応性パターンを検出する方法に使用することができる。Tat免疫原に対する免疫感作により誘導される抗体の存在およびまたは力価を測定する方法には、免疫感作した個体由来する生物サンプル(例えば体液、好ましくは血液、血清または血漿、しかしまた尿、唾液および他の流体または組織も可能)を、好ましくはプレートまたはビーズのような固体支持体上に固定化された霊長類が認識するエピトープIおよび任意の免疫原の1以上の結合配列と接触させる工程を含む。この方法で使用する霊長類が認識するエピトープIおよび任意の結合配列は、非修飾の最小エピトープ結合領域である。

【0081】

いったん生物サンプルを固定化されたペプチドに十分な時間暴露したら、支持体を洗浄してペプチドに結合しない生物サンプルからのいかなる材料も排除する。そのような洗浄工程は診断アッセイでは通例であり、そして塩水を用いて行われる。エピトープIおよび任意の免疫原またはそれらの組み合わせに対する抗体が上記の処置により個体に誘導されれば、固定化されたペプチドは生物サンプル由来する抗体に結合した。その後、標識試薬を支持体上の材料に加えて、支持体上のペプチドと該生物サンプル中の抗体との間の結合を検出する。好ましくはそのような試薬はヤギ抗-ヒト免疫グロブリンのような抗-ヒト免疫グロブリンである。この標識は、上記に検討したような通常使用される診断用標識の広い配列から選択される。1つの態様では、標識は基質と接触すると検出可能な色のシグナルを生成する発色酵素であることができる。色の存在および/または強度は、処置した個体中の抗体の誘導の証明を提供する。このアッセイは免疫感作の効力を測定するために、ならびに患者の免疫状態を監視するために使用することができる。

【0082】

特定のアッセイ工程ならびに種々の検出可能な標識系の選択は、当該技術の範囲内である。そのような選択は日常的であり、そして本発明を限定しない。

M. 本発明の利点

本発明の組成物の利点の1つは、共通するBサブタイプのHIV-1の既知のTatタンパク質変異体の95から99%より多くと交差反応させるために、本発明の組成物に包含するために必要な少数の免疫原である。以下の実施例で具体的に説明するように、2つの必要な霊長類が認識するエピトープIアミノ酸配列ならびに6個のさらなるエピトープI配列を含む霊長類が認識するエピトープI免疫原性組成物は、共通するBサブタイプのHIV-1の95%のTat

10

20

30

40

50

タンパク質ならびにHIV-1の少ない非-Bサブタイプに由来するすべての56個のTatタンパク質配列と交差反応する。このように1つの組成物は、遭遇し得るほとんどのHIV-1株により引き起こされる感染に対して保護し、そして処置するために有用に使用され得る。

【0083】

さらに結合が望まれるTatの正確なエピトープが同定されれば（すなわち、配列番号15のAA5-12）、本明細書に記載した方法を使用して新しく発生したHIV-1株または新たに発見された株に由来する新しい望ましいTatペプチド免疫原を容易に同定し、そしてこの組成物に含めることができる。この柔軟性により、本発明の組成物を将来同定される任意の新規HIV-1株（1つまたは複数）に対して予防的に有用とすることができる。本明細書に教示する観点において、当業者はTat免疫原（およびそれらをコードする核酸構築物）の新規組み合わせを組成物に容易に包含できると予想される。

10

【0084】

例えば、PCRおよび高密度オリゴヌクレオチド配列 [M.J.Kozal et al, *Nature Med.*, 2:753 (1996)] のような通例の技法を使用して、当該技術分野の技術の1つでHIV-1株およびサブタイプの臨床的単離物の変異体を表すHIV-1 Tatタンパク質の大きな列のアミノ酸配列が得られるようになる。そのような技法の使用により、HIV-1 Bサブタイプの他の変異体ならびに今日までそれほど徹底的に研究されていない発展途上国での他のサブタイプの決定が可能となる。新規Tat配列の決定により、免疫原として対応するペプチドを本発明の組成物に直ちに含めることができ、他の稀なHIV-1のTatタンパク質に対する抗体応答の誘導を可能とする。

20

【0085】

各Tat変異体に対応する合成ペプチドに対して生じる抗体との交差反応性の実験を使用して、配列の変化が免疫学的にサイレントなTat変異体を用いた免疫感作の必要性を排除することができる（これらのペプチドはコンセンサス配列または他の変異体に対する抗体により強力に結合するので）。

【0086】

以下の実施例は、本発明の組成物を調製し、そしてこれら組成物を使用して免疫感作された宿主中のウイルスのTatタンパク質に対する抗体を誘導する好適な方法を具体的に説明する。これらの実施例は具体的説明のみであり、本発明の範囲を限定しない。

【0087】

【実施例】

実施例1 - HIV-1 Tatタンパク質中の霊長類が認識するエピトープIに関する抗体に結合するために必要な最小Tatタンパク質アミノ酸配列に関する免疫学的研究。配列変異およびこれらの配列に対する抗血清の免疫学的交差反応性

30

A. 合成ペプチドおよび結合物

合成ペプチドは固相合成により誘導化したポリエチレン支持体上で合成した [R.M.Valerio et al., *Int.J.Peptide Res.*, 44:158-165(1994)]。免疫感作するペプチドはキャリアータンパク質に結合し易くするために含めるアミノ末端Cysおよびアミド化C-末端を用いて合成した。検出体ペプチドはアミノ末端ピオチン-Ser-Gly-Ser-Gly-配列 [配列番号7] および反応性および交差反応性を検出するためのELISAアッセイに使用するC-末端での遊離酸官能基を用いて合成した。ジフテリアトキソイド (DT) キャリアータンパク質にシステインの側鎖を介して結合した、5~8のペプチド-キャリアー比を有する免疫感作ペプチド [A.C.J.Lee et al., *Molec.Immunol.*, 17:749(1980)] は、高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) により、分析用HPLCおよび質量分析で95%より高い純度に精製し、検出体ペプチドは50%より高い純度で使用した。

40

B. 免疫感作

ペプチド結合体は精製水に溶解し、そして完全フロインドアジュバント (CFA) または不完全フロインドアジュバント (IFA) で1:1に乳化した [抗体-ア ラボラトリー マニュアル (ANTIBODIES-A LABORATORY MANUAL)、E.Harlow and P.Lane編集、コールドスプリングハーバーラボラトリー (1998)]。霊長類あたりの総容量は1mlであり、これはDTに結

50

合した100 µgのペプチドを含んだ。

【0088】

ウイルス対抗実験の一部であったアカゲザルは、IFA/CFA中の抗原で以下のように免疫感作した。免疫感作ペプチドには数匹の霊長類を使用し、最初にCFA中の結合体で初期筋肉内(IM)注射、そして続いてIFA中の結合体を用いて2週目にIMで追加免疫した。前血液は最初の注射前に採取し、そしてより大量の血液は追加免疫注射から3および5週間後に採取した。

C. ELISA力価

ELISAアッセイは、H.M.Geysen et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81:3998(1983)に記載されているように行った。抗体力価はバックグラウンドより高い1.00Dの吸収を生じる血清希釈物の逆数である。2~3血清の幾何平均力価(GMT)を各応答について計算するか、または1つの血清のみを数匹のサルに免疫感作に利用した。

10

【0089】

ウサギ対サルにおけるこのアッセイに関するELISAの結果を、それぞれ図1Aおよび1Bに示す。ELISAの結果はエピトープIを包含する免疫原に対する霊長類の抗体が、配列 -Asp-Pro-Arg₇-Leu-Glu₉-Pro-Trp-Lys₁₂ [配列番号15のAA5~12]と反応していたことを示した。以下に検討するように、7、9および12位は、霊長類により認識されるこのエピトープIペプチドの共通する変異を表す。

D. エピトープ内のアミノ酸配列多様性の分析

HIV-1 Tatの第1エクソン配列はGeneBankおよびロスアラモスのヒトレトロウイルスおよびAIDSデータベース[ニューメキシコ州、ロスアラモスのロスアラモス国立研究所の理論生物学および生物物理学グループにより公開された、ヒトレトロウイルスおよびAIDS 1996 (HUMAN RETROVIRUSES and AIDS 1996)、およびロスアラモス研究所のEsther Guzmanの好意によりGeneBankから得たさらなる配列]から引き出した。フレームシフトを導く不完全配列および終結コドンまたは塩基欠失を持つ配列は、同じ単離物からの明らかな同一反復配列であったので削除した。エピトープ中のその位置でのアミノ酸の変化を記録し、そして表にした。

20

E. 変異体間の抗原の交差反応性

エピトープのコンセンサス配列に対する抗血清は、コンセンサス配列および共通アミノ酸変異体を含む配列でELISAにより滴定して、抗原性に対するアミノ酸多形性の効果を決定した。

30

F. 配列の変化

霊長類が認識するエピトープIコンセンサス配列は、最大頻度および霊長類の抗体による認識について評価した。294個のBクレード(I)ウイルスに由来するHIV-1 Tatタンパク質および56個の非-Bクレード(II)ウイルスに由来するHIV-1 Tatタンパク質中の抗原性および配列保存をエピトープについて評価し、そして結果を以下の表IIからIVにまとめた。

【0090】

表IIおよびIIIの上列は、最大頻度のコンセンサス配列を示す。中列は複数の場合に各位置で5%より高い配列に見いだされるアミノ酸の発生率を含む。各表の下列は複数の場合に5%より高い配列が生じるアミノ酸を含む総発生率である。表II中のこれらの選択のすべて; およびアミノ酸4に入る場合を除いて表IIIにおけるこの選択のすべてが抗原的に際立つエピトープ(<25%交差反応性)を生成する。

40

【0091】

【表2】

表Ⅱ
 エピトープⅠ-294個のBクレード

Val ₄	Asp ₅	Pro ₆	Arg ₇	Leu ₈	Glu ₉	Pro ₁₀	Trp ₁₁	Lys ₁₂
			Arg (73)					Lys (96)
			Lys (12)					Asn (2)
			Ser (11)					
			Asn (4)					
100%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

10

【 0 0 9 2 】

【 表 3 】

表Ⅲ
 エピトープⅠ-56個の非Bクレード

Val ₄	Asp ₅	Pro ₆	Asn ₇	Leu ₈	Glu ₉	Pro ₁₀	Trp ₁₁	Asn ₁₂
Val (89)			Asn (79)		Glu (86)			Asn (87)
Ile (11)			Lys (14)		Asp (14)			Lys (13)
			Ser (5)					
100%	100%	100%	98%	96%	100%	98%	100%	100%

20

【 0 0 9 3 】

表ⅡおよびⅢに示すように、霊長類が認識するエピトープⅠは有力な16倍の抗原性多形を有するが、Bクレードに関しては1つの主要抗原が存在し、そして非-Bクレードに関しては別の主要抗原が存在する。5個の他の変異体は、既知のTat変異体の95%より多くの要因である。表ⅣおよびⅤを参照にされたい；アスタリスクで示す配列は、Bおよび非-Bクレードの両方で表される。

30

【 0 0 9 4 】

【 表 1 】

表IV-Bクレート(294配列)

霊長類のエピトープ配列	配列番号	発生	発生率
ValAspProArgLeuGluProTrpLys	配列番号15のAA4-12	220	75
ValAspProLysLeuGluProTrpLys*	配列番号12のAA185-193	35	12
ValAspProSerLeuGluProTrpLys	配列番号12のAA120-127	20	7
ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*	配列番号12のAA55-63	7	2
		合計:282	合計:96
ValAspProArgLeuGluProTrpAsn	28	1	<1

10

20

【0095】

【表5】

表V-非-Bクレート(56配列)

霊長類のエピトープ配列	配列番号	発生	発生率
ValAspProAsnLeuGluProTrpAsn	配列番号13のAA227-235	36	64
ValAspProLysLeuGluProTrpAsn	配列番号13のAA344-352	8	14
ValAspProAsnLeuAspProTrpAsn	29	6	11
ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*	配列番号13のAA55-63	3	5
ValAspProLysLeuGluProTrpLys*	配列番号12のAA185-193	1	2
		合計:53	合計:95
ValAspProSerLeuGluProTrpAsn	配列番号13のAA279-287	1	2
ValAspProSerLeuAspProTrpAsn	30	1	2
ValAspProAsnLeuAspProTrpLys	31	1	2

30

40

【0096】

表VIは、エピトープIの位置7の変異体の悪い抗原交差反応性、位置9の変異体の抗原的特徴、および位置7および12の両方に変異を含むGluProValAspProArg₇LeuGlu₉ProTrpLys₁₂ [配列番号15のAA2~12]を含むGluProValAspProAsn₇LeuGlu₉ProTrpAsn₁₂ [配列番号13のAA225-235]に対する抗血清の極端に欠けた交差反応性を示す。これはさらにGlu9

50

およびAsp9変異体の抗原的特徴を示す。

【0097】

表VI - Tatアミノ酸7、9および12位に変異を有する検出体ペプチドに関するエピトープI
免疫原に対するサル抗血清のELISA反応性

【0098】

【表6】

免疫原のエピトープ配列	検出体ペプチドのエピトープ配列力価 (自己ペプチドの力価%)			
GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号12の AA53-63]	GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号12の AA53-63] 119,000 (100)	GluProVal AspProArg, LeuGlu ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号15の AA2-12] 25,000 (21)	GluProVal AspProLys, LeuGlu ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号12の AA183-193] 24,000 (20)	GluProVal AspProSer, LeuGlu ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号12の AA105-115] 24,000 (20)
GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₉ Pro TrpAsn ₁₂ [配列番号13の AA225-235]	GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₉ Pro TrpAsn ₁₂ [配列番号13の AA225-235] 157,000 (100)	GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号12の AA53-63] 23,000 (15)	GluProVal AspProArg, LeuGlu ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号15の AA2-12] 2000 (1)	
GluProVal AspProAsn LeuGlu ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号12の AA53-63]	GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号12の AA53-63] 163,000 (100)	GluProVal AspProAsn, LeuAsp ₉ Pro TrpLys ₁₂ [配列番号32] 6000 (4)		

【0099】

実施例2 - HIV-1 Tatタンパク質中の霊長類が認識するエピトープIIに関する抗体への結合に必要な最小Tatタンパク質アミノ酸配列に関する免疫学的研究。配列変異およびこれらの配列に対する抗血清の免疫学的交差反応性

実施例1に概説した手順と同じ手順を使用して、294種のB細胞および56種の非-Bクレード HIV-1 Tat配列に関するアミノ酸配列変異の発生率を、サルにおける抗体結合のエピトープII境界内で定めた。結果を表VIIおよびVIIIに報告する。表の上段は、コンセンサス配列を含む。中段は多数ある場合に、各位置で5%より多い配列が見られるアミノ酸の発生率を含む。下段は多数ある場合に、5%より多い配列で発生するアミノ酸を含む全発生

10

20

30

40

50

率を示す。Tat42位でのアミノ酸変異は、抗原的に交差反応性であった。

【0100】

【表7】

表VII

エピトープII-294Bクレード

Lys ₄₁	Gly ₄₂	Leu ₄₃	Gly ₄₄	Ile ₄₅	Ser ₄₆	Tyr ₄₇	Gly ₄₈	Arg ₄₉	Lys ₅₀
	Gly (72)								
	Ala (28)								
100%	100%	99%	99%	100%	98%	99%	100%	99%	100%

10

【0101】

【表8】

表VIII

エピトープII-56非-Bクレード

Lys ₄₁	Gly ₄₂	Leu ₄₃	Gly ₄₄	Ile ₄₅	Ser ₄₆	Tyr ₄₇	Gly ₄₈	Arg ₄₉	Lys ₅₀
100%	100%	100%	99%	100%	95%	100%	100%	98%	100%

20

【0102】

表VIIおよびVIIIに示すように、エピトープIIはほとんど完全な抗原性の保存を示した。

【0103】

検出体配列内にTat Gly₄₂またはAla₄₂(変異体)を含む検出体ペプチドに関して、エピトープII免疫原に対するサルの抗血清のELISA反応性を測定し、そして以下の表IXに報告する。ウサギ対サルを対象とした結果のグラフ的比較に関しては、それぞれ図2Aおよび2Bを参照にされたい。

【0104】

【表9】

30

表IX

免疫原のエピトープ配列	検出体ペプチドのエピトープ配列力価 (自己ペプチドに対する%)	
LysGlyLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys [配列番号15のAA41-50]	LysGlyLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys [配列番号15のAA41-50]	LysAlaLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys [配列番号33]
	25,000 (100%)	19,000 (76%)

40

【0105】

実施例3：無症候性HIV-1感染に関するヒトモノクローナル抗体処置の開発

市販されているヒト化された抗体はマウスを、ジフテリアトキソイドキャリアータンパク質に結合させた適当量のエピトープII免疫原：Cys-Gly-Ser-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-アミド [配列番号34] で免疫感作する。ハイブリドーマは、ストレプトアビジンをコートしたプレート上で、ビオチン-Ser-Gly-Ser-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-G

50

ly-Arg-Lys-OH [配列番号 3 5] およびナノモル以下の結合親和性を有するIgGモノクローナル抗体でスクリーニングし、そして相補的レセプターに対して結合しないものを選択する。特異性は組換えHIV-1 Tatタンパク質で確認する。

【 0 1 0 6 】

モノクローナル抗体は非-自己抗原に向けられるので、通例の前-臨床生産、精製および自己試験が予想される。内部のCD3で徹底的に消費されるマウスモノクローナル抗体であるOKT3の18時間の半減期に対して、ヒトモノクローナル抗体はヒトで20日の半減期を有する。毎日5mgのOKT3の用量は、ヒトで約1マイクログラム/mlまでのトラフレベル(trough level)を維持する。すなわち5mgの抗-Tatモノクローナル抗体の隔週の用量は、同様なトラフレベルを維持するために十分であり、感染した患者中のHIV-1 Tatタンパク質につ

10

【 0 1 0 7 】

血漿ウイルス負荷量の対照は、今、HIV-1処置に関して許容される効力の基準である。抗-Tatモノクローナル抗体の効力は、最初の4週間の処置で無症候性HIV-1感染個体で迅速に決定することができる。このプロトコールは未処置患者、特に様々な理由からHAARTプロトコールで失敗した患者、またはHAART療法で管理されている患者に有用であり、この治療を4週間で離脱する(ウイルス負荷量はHAARTを止めれば急速にリバウンドする)。LOD(50ウイルスRNAコピー/mL)未満までの血漿ウイルス負荷量における2~3log減少は、長期間にわたり評価されるモノクローナル抗体での単独療法を支持する。1log(90%)

20

実施例4 - 個体のAIDSへの進行を防止するための汎用的ワクチンの開発

A . 合成遺伝子の構築

図3Aは、ウサギの抗体応答について検出されるエピトープIの各4つの多形の4つのコピーに加えて、大腸菌(*E. coli*) DnaK(HSP70)を含む線状融合タンパク質として大腸菌(*E. coli*)中で発現するエピトープIIの4つのコピーをコードする合成遺伝子を具体的に説明する。この発現タンパク質は、エピトープ特異的ウサギ血清を用いたELISAで試験した時に、すべての抗原性ペプチドを含んだ。しかしウサギまたはサルで免疫感作するために使用した時、すべてのエピトープI変異体は免疫原性であるが、エピトープIIは免疫原性ではなかった。すなわちエピトープIIは適当なキャリアータンパク質と結合した合成ペプチド結合体として最も良く使用される。

30

【 0 1 0 8 】

図3Bは、霊長類で認識されるエピトープI境界内の多形性に基づき、霊長類が認識する8つのエピトープI多形を枠内に含むように構築された新規な8個の合成遺伝子を具体的に説明する：

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列番号 1 7
 R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列番号 1 9
 R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 配列番号 2 2
 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列番号 2 0
 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 配列番号 2 4
 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列番号 2 1
 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 配列番号 1 8 および
 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2 配列番号 2 3。

40

【 0 1 0 9 】

エピトープI配列は、Glyおよび/またはSer残基を含有するジペプチドスペーサーにより分けられている。この遺伝子はW.P.C.Stemmer et al., *Gene*, 164:49(1995)に記載されているように集成した。簡単に説明すると、上鎖の60-merオリゴヌクレオチド(オリゴ)および20ヌクレオチド(nt)を持つ底鎖オリゴの重複を、2つの末端50-merと一緒に合成する。60merをハイブリダイゼーション条件下で一緒にインキュベーションし、そしてポリメ

50

ラーゼ連鎖反応 (PCR) を使用して配列を埋め、そしてそれを増幅する。ついで末端の50-merを付加し、そして集成体をPCRにより完成し、その完全長遺伝子をアガロースゲルで単離する。遺伝子を配列決定し、そして実際のエピトープ内に正しい配列を有することが分かる。類似の7個の遺伝子は、稀な変異体 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [配列番号24] を排除することにより構築することができる。

B. 融合タンパク質の発現

上に記載の遺伝子を次いで制限酵素により切り出し、そして枠内にジフテリアトキソイド (HSP70) の配列を含有する適当な発現ベクターに挿入する。大腸菌 (*E. coli*) をトランスフェクトし、そしてタンパク質を発現するコロニーを単離する。単離したコロニーを成長させ、そして発現を誘導する。融合タンパク質を発現しているコロニーに由来するタンパク質を同定する。生成したタンパク質は、常法を使用して精製する。

【0110】

図3Cは、類似の技術を使用してジフテリアトキソイドのようなキャリアータンパク質を持つ合成ペプチドの結合物として任意に調製した一価のエピトープII免疫原を具体的に説明する。

C. 融合タンパク質内で正しいエピトープの発現および抗-Tat抗体の誘導における効力を評価するためのアッセイ

エピトープI (ここでY₇はArg、Asn、LysまたはSerのいずれかであり、そしてX₉はGluであり、そしてZ₉はLysである) の4つの変異体、およびエピトープIIの両変異体は合成遺伝子中で構築し、そしてAおよびB章に記載したように融合タンパク質として発現させる。各エピトープが霊長類の抗血清により認識され得る状態の融合タンパク質で発現するかどうかを決定するために、エピトープI配列に対応する合成ペプチドに対して生成した霊長類の抗血清を、常法を使用してELISAにより試験する。最初にプレートを融合タンパク質で直接コートし、ついでエピトープIおよびIIに反応性であることが知られている100 μg/mlの抗血清溶液 (例えばウサギ抗血清) に暴露する。変異体のエピトープ配列は、各エピトープに関して32,000よりも大きな力価により示されるように、対応する合成ペプチドに対する抗体により認識される配列で発現される。

【0111】

多価免疫原の免疫原性を評価するために、サルをIFA中の融合タンパク質を用いて免疫感作した。サルの抗血清をエピトープIおよびIIの合成ペプチドで評価した。有意な力価がエピトープI変異体で発生し、すなわちエピトープI (Y₇がArgであり、そしてZ₁₂がLysである) に対して28,000の力価；エピトープI (Y₇がAsnであり、そしてZ₁₂がLysである) に対して16,000の力価；エピトープI (Y₇がLysであり、そしてZ₁₂がLysである) に対して37,000の力価；そしてエピトープI (Y₇がSerであり、Z₁₂がLysである) に対して4,000の力価。エピトープIIに対する力価は700であり、このエピトープが免疫感作に関してキャリアータンパク質に結合される合成ペプチドとして最高であることを表す。

実施例5：予防接種により誘導された抗体の力価および特異性を検出するための方法およびキット

本発明のワクチンを用いて免疫感作した後に誘導された抗体の力価および特異性を追跡するために、アッセイ法を使用することができる。そのようなアッセイ法の1態様では、実施例1で報告した霊長類が認識するエピトープI配列を含有するペプチド (免疫感作ワクチンの組成物による) を使用して、予防接種した個体中の抗体の力価および反応性パターンを測定するキットを開発する。

【0112】

これらのペプチドは、N-末端にビオチン-Ser-Gly-Ser-Gly- [配列番号36] を用いて合成する。各ペプチドは、関連する配列がアビジンのビオチン結合ポケットの外であることを確実にするために、スペーサーとして役立つ配列-Ser-Gly-Ser-Glu- [配列番号27] を用いて、別々のアビジンコートプレートに塗布する。次いでプレートを試験血清の希釈物とインキュベーションし、洗浄し、そして酵素で直接標識したヒト免疫グロブリン (例えばヤギ抗-ヒト免疫グロブリン) に対する試薬を用いて抗体結合を測定する。試薬は

酵素と反応するように採用され、そして発色シグナルを生成する（R & Dキット インサート）。

【0113】

本発明の多数の修飾および変更は、上記に同定された明細書に含まれ、そして当業者には明白であると期待される。本発明の組成物および方法に対するそのような修飾および変更は、前記特許請求の範囲に包含されると考える。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1Aは、短縮化された検出体ペプチドでのより大きな直線状エピトープIペプチドに対するウサギ抗血清のELISA力価のグラフであり、大きなペプチドに対する最大結合の割合として表す。対応する検出体ペプチドのN-またはC-末端アミノ酸を、1文字暗号で各カラムの下に示す。

10

図1Bは、短縮化された検出体ペプチドでのより大きな直線状エピトープIペプチドに対する霊長類抗血清のELISA力価のグラフであり、大きなペプチドに対する最大結合の割合として表す。対応する検出体ペプチドのN-またはC-末端アミノ酸を、1文字暗号で各カラムの下に示す。

【図2】 図2Aは、短縮化された検出体ペプチドでのより大きな直線状エピトープIIペプチドに対するウサギ抗血清のELISA力価のグラフであり、大きなペプチドに対する最大結合の割合として表す。対応する検出体ペプチドのN-またはC-末端アミノ酸を、1文字暗号で各カラムの下に示す。

図2Bは、短縮化された検出体ペプチドでのより大きな直線状エピトープIIペプチドに対する霊長類抗血清のELISA力価のグラフであり、大きなペプチドに対する最大結合の割合として表す。対応する検出体ペプチドのN-またはC-末端アミノ酸を、1文字暗号で各カラムの下に示す。

20

【図3】 図3Aは、5価のエピトープI/エピトープII HIV-1 Tat免疫原性構築物の設計を3文字アミノ酸暗号で具体的に説明する[配列番号12]。

図3Bは、8価の汎用的エピトープIの設計を3文字アミノ酸暗号で具体的に説明する[配列番号13]。

図3Cは、1価の汎用的エピトープII免疫原性構築物の設計を3文字アミノ酸暗号で具体的に説明する[配列番号14]。

【配列表】

30

SEQUENCE LISTING

<110> Thymon L.L.C.
 Goldstein, Gideon

<120> Methods and Compositions for Impairing Multiplication of HIV-1

<130> GGP3APCT

<150> US 09/561,366
 <151> 2000-04-28

<160> 39

<170> PatentIn version 3.0 10

<210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 1

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5

<210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1 20

<400> 2

Gly Arg Gly Asp Ser Pro
 1 5

<210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn 30

<400> 3

Asp Pro Xaa Leu Glu Pro
 1 5

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Val can be optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Pro is optionally amidated

<400> 4

Val Asp Pro Xaa Leu Glu Pro
 1 5

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Lys is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be Gly or Ala

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Lys is optionally amidated

<400> 5

Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Arg is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be Ala, Pro, Ser or Gln

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be Pro or His

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be Gln or Pro

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be Asp, Asn, Gly or Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser can be optionally amidated

<400> 6

30

Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ser is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be Asn or Thr

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be Ala or Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Pro is optionally amidated

<400> 7

Ser Gln Xaa His Gln Xaa Ser Leu Ser Lys Gln Pro
 1 5 10

20

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)

<223> Xaa can be Glu or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be Lys or Asn and can be optionally amidated

<400> 8

Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be Glu or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be Lys or Asn

<400> 9

Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be Gly or Ala

10

20

30

<400> 10

Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
1 5 10

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 11

Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
1 5

10

<210> 12

<211> 260

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Glu is attached to DnaK (HSP70)

<400> 12

Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val
1 5 10 15

20

Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg
20 25 30

Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro
35 40 45

Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly
50 55 60

Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro
65 70 75 80

Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
85 90 95

30

Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu
100 105 110

Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys
115 120 125

Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu
 130 135 140

Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp
 145 150 155 160

Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu
 165 170 175

Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp
 180 185 190

Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser
 195 200 205

Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu
 210 215 220

Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser
 225 230 235 240

Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg
 245 250 255

Lys Ser Gly Ser
 260

10

<210> 13
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Glu is attached to DnaK (HSP70)

<400> 13

Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val
 1 5 10 15

Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg
 20 25 30

Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro
 35 40 45

Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly
 50 55 60

30

Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro
65 70 75 80

Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Trp Lys Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu
115 120 125

Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys
130 135 140

Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu
145 150 155 160

Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp
165 170 175

Pro Asn Leu Ala Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu
180 185 190

Ala Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Ala Pro Trp
195 200 205

Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Ala Pro Trp Asn Gly Ser
210 215 220

Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val
225 230 235 240

Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn
245 250 255

Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro
260 265 270

Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly
275 280 285

Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro
290 295 300

Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
305 310 315 320

Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu
325 330 335

10

20

30

Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn
340 345 350

Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu
355 360 365

Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser
370 375 380

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cys is conjugated with Diphtheria toxoid

10

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Lys is attached to an amide.

<400> 14

Cys Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
1 5 10

20

<210> 15
<211> 72
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 15

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

30

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Pro Gln Asp Ser Gln Thr
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln
65 70

<210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be Glu or Asp

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be Lys or Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Ser is attached to an amide

<400> 16

20

Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa His Pro Gly Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Lys is optionally amidated

<400> 17

Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys
 1 5

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Asn is optionally amidated

<400> 18

Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn
 1 5

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Lys is optionally amidated

<400> 19

30

Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys
 1 5

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys is optionally amidated

<400> 20

10

Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys

1

5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys is optionally amidated

<400> 21

Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys

1

5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Asn is optionally amidated

<400> 22

Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn
 1 5

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Asn is optionally amidated

<400> 23

20

Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Asn
 1 5

<210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Asn is optionally amidated

30

<400> 24

Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn
1 5

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Lys can be optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa can be Gly or Ala

10

<400> 25

Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

20

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be Glu or Asp

<400> 26

Asp Pro Asn Leu Xaa Pro Trp Asn
1 5

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

30

<400> 27

Ser Gly Ser Gly
1

<210> 28

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 28

Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Asn
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 29

10

Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Asn
 1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 30

Val Asp Pro Ser Leu Asp Pro Trp Asn
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 31

20

Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Lys
 1 5

<210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 32

30

Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Lys
 1 5 10

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 33

Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
1 5 10

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> C terminal Lys is amidated

10

<400> 34

Cys Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
1 5 10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> biotin is attached to N-terminal Ser

20

<400> 35

Ser Gly Ser Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
1 5 10

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Biotin is attached to Ser

30

<400> 36

Ser Gly Ser Gly
1

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be Glu or Asp

10

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Xaa can be Lys or Asn and can be optionally amidated

<400> 37

Val Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa
1 5

20

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be Glu or Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

30

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Xaa can be Glu or Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Xaa can be Lys or Asn and can be optionally amidated

<400> 38

40

Xaa Pro Val Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa
1 5 10

<210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 39

Gly Ser Gly Ser
1

【 図 1 A - B 】

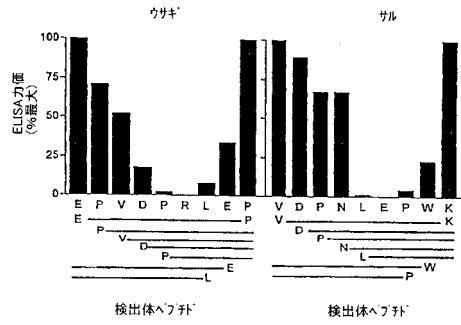


Fig. 1A

Fig. 1B

【 図 2 A - B 】

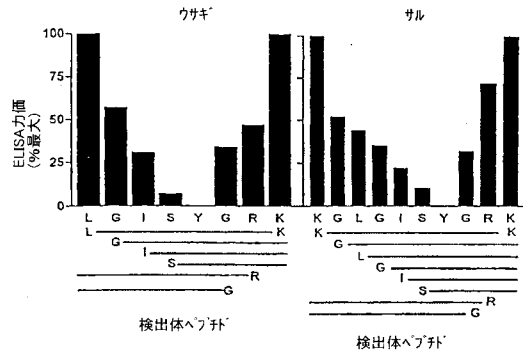


Fig. 2A

Fig. 2B

【 図 3 A - C 】

FIG. 3A [配列番号:12]

DnaK (HSP70)- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Ser-Gly-Ser)₄

FIG. 3B [配列番号:13]

DnaK (HSP70)- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Ala-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)₄

Fig. 3C [配列番号:14]

-Cys-Gly-Ser-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-アミノ酸に結合したジフテリア毒素結合体

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	B
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	J
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	S
		A 6 1 K 48/00	
		A 6 1 P 31/18	
		C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100113309

弁理士 野 崎 久子

(72)発明者 ゴールドスタイン, ギデオ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 0 7 8 ショートヒルズ・ドリソンドライブ 3 0

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 0 2 1 8 5 (WO , A 1)

国際公開第 0 0 / 0 2 6 4 1 6 (WO , A 1)

Nat. Med., 1996, 1(9), p.960-964

Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.AAF03416, [retrieved on 13 Jun 2008]

, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?6090969:NCBI:1870387>> 10-APR-2000 up
loaded, Definition: tat protein [Human immunodeficiency virus type 1]

Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.AAB68437, [retrieved on 13 Jun 2008]

, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=1899081>> 03-SEP-1997 u
ploaded, Definition: tat protein [Human immunodeficiency virus type 1]

Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.AAD17172, [retrieved on 13 Jun 2008]

, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?4324908:OLD02:234523>> 03-MAR-1999 up
loaded, Definition: Tat [Human immunodeficiency virus type 1]

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

C07K 4/00-4/12

C07K 14/00-14/825

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)

UniProt/GeneSeq

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	用于减少HIV-1增殖的方法和组合物		
公开(公告)号	JP4282934B2	公开(公告)日	2009-06-24
申请号	JP2001579818	申请日	2001-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	西蒙有限公司		
申请(专利权)人(译)	Teimon LLC		
当前申请(专利权)人(译)	Teimon LLC		
[标]发明人	ゴールドスタインギデオ		
发明人	ゴールドスタイン,ギデオ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/10 C07K4/02 C07K14/16 C07K16/10 C07K19/00 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/18 C12P21/08 G01N33/50 A61K35/76 A61K38/08 A61K38/10 A61K39/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K16/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/005 A61K38/08 A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/6037 A61K2039/6043 C07K7/06 C07K16/1045 C07K16/1072 C07K2317/21 C07K2317/34 C12N2740/16322 G01N33/56988 G01N2333/163 G01N2469/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C07K4/02 C07K14/16 C07K16/10 C07K19/00 A61K37/02 A61K39/395.B A61K39/395.D A61K39/395.J A61K39/395.S A61K48/00 A61P31/18 C12P21/08		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
审查员(译)	三原贤治		
优先权	09/561366 2000-04-28 US		
其他公开文献	JP2004514406A5 JP2004514406A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

诱导针对大多数 (例如超过95%) 已知的HIV-1的B和非B进化枝的Tat蛋白突变体的抗体的组合物具有式R1-Asp-Pro-Y 7含有至少两个Leu-X 9-Pro-Trp-Z 12-R 2的肽或多肽的突变体[SEQ ID NO : 8]。根据该式, Y 7是Arg, Lys, Ser或Asn; X 9是Glu或Asp; Z 12 Lys或Asn; R1是1至约5个氨基酸的氨基酸序列, 任选被氢, 氢, 低级烷基, 低级链烷酰基或低级烷基或低级链烷酰基取代; R2是任选被游离羟基, 酰胺或酰胺取代的1或至多约5个额外氨基酸的序列。在该组合物中, 两种变体中的至少一种在Y 7处含有Arg, 在Z 12处含有Lys并且至少包含2, Y 7是Asn, Z 12是Asn。疫苗和药物组合物可以与多种抗原肽结合, 或者可以包含一种或多种与载体蛋白相关的肽作为重组蛋白之一。向该组合中添加任何其他免疫原可用于诱导与多种菌株和HIV-1 Tat蛋白的突变体交叉反应的灵长类动物抗Tat抗体。疫苗和药物组合物可包括衍生自肽组合物的灵长类动物抗体, 用于被动疗法。诊断组合物和用途描述了对接种个体的免疫状态的评估。

Val ₁	Asp ₅	Pro ₆	Asn ₇	Leu ₉	Glu ₉	Pro ₁₀	Trp ₁₁	Asn ₁₂
Val (89)			Asn (79)		Glu (86)			Asn (87)
Ile (11)			Lys (14)		Asp (14)			Lys (13)
			Ser (5)					
100%	100%	100%	98%	96%	100%	98%	100%	100%