

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 522948

(P2003 - 522948A)

(43)公表日 平成15年7月29日(2003.7.29)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド* (参考)
G 0 1 N 33/569	ZNA	G 0 1 N 33/569	ZNA H 2 G 0 4 5
33/15		33/15	Z 4 B 0 6 3
33/50		33/50	Z
33/53		33/53	V
// C 1 2 Q 1/70		C 1 2 Q 1/70	
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 82数)			

(21)出願番号 特願2001 - 558736(P2001 - 558736)

(86) (22)出願日 平成13年2月9日(2001.2.9)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月12日(2002.8.12)

(86)国際出願番号 PCT/US01/04030

(87)国際公開番号 W001/059457

(87)国際公開日 平成13年8月16日(2001.8.16)

(31)優先権主張番号 60/181,543

(32)優先日 平成12年2月10日(2000.2.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/235,901

(32)優先日 平成12年9月28日(2000.9.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 パナコス ファーマシューティカルズ,
インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 メリーランド 20877,ゲ
イザーズバーグ,ペリー パークウェイ 2
09

(72)発明者 カール・ティ・ワイルド
アメリカ合衆国20879メリーランド州ゲイザ
ーズバーグ、オックスカート・プレイス19
008番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外 3 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウイルス融合インヒビターの検出のための分析

(57)【要約】

本発明は、H I V - 1等のエンベロープウイルスによる細胞の感染を阻害または予防する化合物の、これら細胞とのウイルス融合に必要なウイルス膜タンパク質における立体構造変化を阻止または破壊することによる同定方法、およびそのような同定方法によって発見された化合物に関する。本発明はさらに、ウイルスに感染した人においてウイルス侵入過程を阻害する抗体を検出するための診断的分析として、これら分析方法の使用を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウイルス侵入および/または融合の立体構造中間体の形成に対する化合物の効果を測定するための方法であって、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質を誘発剤および候補化合物と接触させて混合物を形成した後、該候補化合物が該立体構造中間体の形成に対して有する効果を測定することを含む方法。

【請求項2】 前記立体構造中間体の形成に対して候補化合物が有する前記効果が、該前記立体構造中間体に対する抗体の結合によって測定される、請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記立体構造中間体の形成に対して試験化合物が有する前記効果を、前記混合物を特異的な抗体とインキュベーションして、ウイルス侵入の立体構造中間体に対して結合する抗体の量が、試験化合物の存在に起因して増加するかまたは減少するかを決定することにより測定される、請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記立体構造中間体の形成に対して有する候補化合物の前記効果が、誘発剤と接触させる前に存在するように、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質に結合する抗体によって測定される、請求項1記載の方法。

【請求項5】 ウイルス侵入および/または融合の立体構造中間体の形成に対する試験化合物の効果を測定するための方法であって、

a . 水性緩衝溶液中で

i . 脂質二重層と会合した、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質であって、該エンベロープタンパク質または糖タンパク質はインタクトなウイルスにおけるウイルス侵入に必要且つ十分なものであり、該エンベロープタンパク質または糖タンパク質はウイルス許容細胞における1またはそれ以上のレセプターと相互作用することができる；

i i . 1またはそれ以上のウイルス許容細胞、該ウイルス許容細胞由来の1またはそれ以上の不溶性または可溶性レセプター、またはその組合せ；および

i i i . 試験化合物

を混合すること；および

b．ウイルス許容細胞へのウイルス侵入に必要な1またはそれ以上の侵入関連構造または立体構造の形成に対する試験化合物の効果を測定することを含む方法。

【請求項6】 工程bが、ウイルス侵入事象における立体構造または構造中間体に存在するエピトープに優先的に結合する、1またはそれ以上の、場合により検出可能なように標識された抗体を加えることにより行われる、請求項5記載の方法。

【請求項7】 工程bが、ウイルス膜タンパク質または糖タンパク質であって、誘発剤と接触していないウイルス膜タンパク質または糖タンパク質に存在しているエピトープに優先的に結合する、1またはそれ以上の、場合により検出可能なように標識された抗体を加えること；および結合した抗体の量を測定することにより行われる、請求項5記載の方法。

【請求項8】 結合した抗体の測定された量を標準値と比較することをさらに含む、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】 ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質が、HIV-1、HIV-2、HTLV-I、HTLV-II、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、パラインフルエンザウイルス3型(HPIV-3)、ニューカッスル病ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ヒトインフルエンザウイルスまたは麻疹ウイルスに由来する、請求項5に記載の方法。

【請求項10】 前記脂質二重層が、細胞、ビリオン、偽ビリオン、膜小胞またはリポソームの形態で提供される、請求項5に記載の方法。

【請求項11】 試薬iiが1またはそれ以上のリンパ球細胞である、請求項5に記載の方法。

【請求項12】 試薬iiが1またはそれ以上の可溶性CD4レセプター、不溶性CD4レセプター、ケモカインレセプターまたはその混合物である、請求項5に記載の方法。

【請求項13】 HIV-1ウイルスおよび/または融合の立体構造中間体

の形成に対する試験化合物の効果を測定するための方法であって、

a . 水性緩衝液中で、

i . 脂質二重層と会合したH I V - 1エンベロープ糖タンパク質 g p 1 2 0 / g p 4 1 またはその断片

i i . 1 またはそれ以上のリンパ球、該リンパ球由来の 1 またはそれ以上の不溶性または可溶性レセプター、またはその組合せ ; および

i i i . 試験化合物

を混合すること ; および

b . ウイルス許容細胞へのウイルス侵入に必要な、 1 またはそれ以上の侵入関連構造または立体構造に対する試験化合物の効果を測定すること

を含む方法。

【請求項 1 4】 前記脂質二重層が、細胞、ビリオン、偽ビリオン、膜小胞またはリポソームの形態で提供される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】 試薬 i i が 1 またはそれ以上の可溶性 C D 4 レセプター、不溶性 C D 4 レセプター、ケモカインレセプターまたはその混合物である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】 前記 H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 1 2 0 / g p 4 1 またはその断片が非感染性ウイルス粒子の形態で提供される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】 前記測定工程が、
ウイルス侵入事象における構造または立体構造中間体であるエピトープに結合する 1 またはそれ以上の、場合により検出可能なように標識された抗体を加えること ; および

結合した抗体の量を測定すること

によって行われる、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】 前記測定工程が、
ウイルス膜タンパク質または糖タンパク質であって、誘発剤と接触していないウイルス膜タンパク質または糖タンパク質に存在するエピトープに優先的に結合し、 1 またはそれ以上の、場合により検出可能なように標識された抗体を加えるこ

と；および

結合した抗体の結合を測定すること

によって行われる、請求項13に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

発明の背景

本発明は、H I V - 1等のエンベロープウイルスによる細胞の感染を阻害または予防する化合物の同定方法、およびそのような方法によって発見された化合物に関する。本発明は、さらに、ウイルス感染した人におけるウイルスの侵入過程を阻害する抗体を検出するための診断的分析として、これら方法を使用することを含む。

【0002】

従来技術

H I V - 1エンベロープ糖タンパク質は、160 k D aの糖タンパク質であり、開裂して膜貫通(T M)サブユニットであるg p 4 1を形成し、これは表面(S U)サブユニットであるg p 1 2 0に非共有的に会合する(Allan J. S., et al., Science 228 : 1091-1094 (1985) ; Veronese F. D., et al., Science 229 : 1402-1405 (1985))。近年の努力によって、H I V - 1エンベロープ系の構成要素に関する理解がより明確になった。そのような努力として、g p 1 2 0およびg p 4 1両方のクリティカルな部分の結晶構造解析が挙げられる(Kwong, P. D., et al., Nature (London) 393 : 648-659 (1998) ; Chan, D. C., et al., Cell 89 : 263-273 (1997) ; Weissenhorn, W., et al., Nature 387 : 426-430 (1997))。

【0003】

表面サブユニットは、細胞受容体C D 4 (アミノ酸残基1 ~ 1 8 1を含むN末端ドメイン1および2)の可溶型に結合したS Uタンパク質(可変ループが存在しないg p 1 2 0コア)と、ケモカインレセプター結合をブロックする中和抗体の抗原結合フラグメント(17 bモノクローナル抗体の軽鎖のアミノ酸残基1 ~ 2 1 3および重鎖の1 ~ 2 2 9)からなる複数の構成要素の複合体部分として特徴付けられている(Kwong, P. D., et al., Nature (London) 393 : 648-659 (1998))。結晶構造解析により、ケモカインレセプターに対する保存的な結合部位、C D 4誘発エピトープ、および空洞を有するC D 4 - g p 1 2 0インターフェ

ースを含む、gp120の融合活性型においてのみ存在すると考えられているいくつかのエンベロープ構成要素が明らかとなった。これは、CD4で誘発されるgp120の構造変化に関する、それまでの観察結果を裏付けるものである。

【0004】

gp120/gp41複合体は、ウイルスの接着と融合を媒介するビリオン表面で三量体として存在する。HIV-1複製は、細胞レセプターCD4に対するgp120の高い親和性の結合によって開始され、この受容体の発現は、*in vivo*でのHIV-1の細胞親和性の第1の決定因子である(Dalglish, A. G., et al., Nature 312 : 763-767 (1984) ; Lifson, J. D., et al., Nature 323 : 725-728 (1986) ; Lifson, J. D., et al., Science 232 : 1123-1127 (1986) ; McDougal, J. S., et al., Science 231 : 382-385 (1986))。CD4のgp120結合部位は、この4ドメインタンパク質のN末端V1ドメインのCDR2領域に位置している(Arthos, J., et al., Cell 5 : 469-481 (1989))。gp120のCD4結合部位は、C2、C3およびC4ドメインを含むgp120の不連続な領域に位置している(Olshevsky, U., et al., Virology 64 : 5701-5707 (1990) ; Kwong, P. D., et al., Nature (London) 393 : 648-659 (1998))。CD4への接着の後、ウイルスは、融合過程を開始するために、ケモカインレセプターのような「第2の」レセプターと相互作用しなければならない。最近、研究者たちによって、HIVの侵入におけるケモカインレセプターファミリーの一員の重要な役割が同定された(McDougal J. S., et al., Science 231 : 382-385 (1986) ; Feng Y., et al., Science 272 : 872-877 (1996) ; Alkhatib G., et al., Science 272 : 1955-1958 (1996) ; Doranz B. J., et al., Cell 85 : 1149-1158 (1996) ; Deng H., et al., Nature 381 : 661-666 (1996) ; Dragic T., et al., Nature 381 : 667-673 (1996) ; Choe H., et al., Cell 85 : 1135-1148 (1996) ; Dimitrov D. S., Nat. Med. 2 : 640-641 (1996) ; Broder, C. C. and Dimitrov, D. S., Pathobiology 64 : 171-179 (1996))。CCR5は、マクロファージ親和性で、多くのT細胞親和性HIV-1初代単離株が利用するケモカインレセプターである。大部分のT細胞系に適した株はCXCR4を利用するが、多くのT細胞親和性単離株はデュアル

トロピックであり、CCR5とCXCR4の両方を利用することができる。

【0005】

CD4およびケモカインレセプターに対するgp120の結合によって、HIVエンベロープ系内の一連の構造変化が開始される(Eiden, L. E. and Lifson, J. D., *Immunol. Today* 13 : 201-206 (1992) ; Sattentau, Q. J. and Moore J. P., *J. Exp. Med.* 174 : 407-415 (1991) ; Allan J. S., et al., *AIDS Res Hum Retroviruses* 8 : 2011-2020 (1992) ; Clapham, P. R., et al., *J. Virol.* 66 : 3531-3537 (1992))。これらの変化は、表面サブユニットと膜貫通サブユニットの両方において起こり、ウイルス進入に必要なエンベロープ構造の形成をもたらす。gp41とgp120の機能は、膜融合が促進されるようなウイルスと細胞膜を近づける位置取りに関係しているようである(Bosch M. L., et al., *Science* 244 : 694-697 (1989) ; Slepushkin, V. A. et al., *AIDS Res Hum Retroviruses* 8 : 9-18 (1992) ; Freed E. O. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 4650-4654 (1990))。

【0006】

多くの構造の情報が、HIV-1膜貫通糖タンパク質(gp41)に関して入手できる。このタンパク質は、数多くのよく特徴付けられた機能的な領域を含んでいる。FIG. 3を参照。例えば、N末端領域は、標的細胞膜への挿入とその破壊によって機能すると考えられている、融合ペプチドと呼ばれる、グリシンに富む配列からなる(Bosch, M. L., et al., *Science* 244 : 694-697 (1989) ; Slepushkin, V. A., et al., *AIDS Res. Hum. Retrovirus* 8 : 9-18 (1992) ; Freed, E. O., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 4650-4654 (1990) ; Moore, J. P., et al., "The HIV-cell Fusion Reaction," in *Viral Fusion Mechanism*, Bentz, J., ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL)。ジスルフィド結合したシステイン残基の存在によって特徴付けられる別の領域は、免疫優性(immunodominant)であることが示されており、表面(gp120)および膜貫通糖タンパク質のための接触部位として示唆されている(Gnann, J. W., Jr., et al., *J. Virol.* 61 : 2639-2641 (1987) ; Norrby, E., et al., *Nature* 329 : 2482-50 (1987) ; Xu, J. Y., et al., *J. Virol.* 65 : 4832-4838 (1991))。gp4

1 外部ドメインの他の領域は、中和の回避 (Klasse, P. J., et al., *Virology* 196 : 332-337 (1993) ; Thali, M., et al., *J. Virol.* 68 : 674-680 (1994) ; Stern, T. L., et al., *J. Virol.* 69 : 1860-1867 (1995))、免疫抑制 (Cianciolo, G. J., et al., *Immunol. Lett.* 19 : 7-13 (1988) ; Ruegg, C. L., et al., *J. Virol.* 63 : 3257-3260 (1989))、および標的細胞の結合 (Qureshi, N. M., et al., *AIDS* 4 : 553-558 (1990) ; Ebenbichler, C. F., et al., *AIDS* 7 : 489-495 (1993) ; Henderson, L. A. and Qureshi, M. N., *J. Biol. Chem.* 268 : 15291-15297 (1993)) に関係している。

【0007】

最近の研究によって、HIV-1 膜貫通糖タンパク質の構造成分の知見は増したが、gp41の免疫原性の性質については、依然としてほとんど理解されていない。HIV-1 エンベロープ複合体に存在する2つの主要抗原領域のうちの1つは、gp41に存在することが知られている (Xu, J. Y., et al., *J. Virol.* 65 : 4832-4838 (1991))。この領域 (TM残基597~613) は、多くのHIV+の人における、強力であるが中和はしない、体液性応答に関連している。

【0008】

gp41の外部ドメインの2つの領域が、ウイルス侵入に重要であることが示されている。一次配列の解析から、これらの領域 (N-ヘリックス (HIV_{LA1} 配列の残基558~595) およびC-ヘリックス (HIV_{LA1} 配列の残基643~678) と呼ばれる) は、ヘリックス型二次構造を形成すると予想された。以前の合成ペプチド模倣体の構造研究に端を発する実験的努力によって、配列解析による予想は一般に正確であることが確立された (Wild, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 10537-10541 (1992) ; Wild, C. T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 9770-9774 (1994) ; Gallaher, W. R., et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5 : 431-440 (1989) ; Delwart, E. L., et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6 : 703-704 (1990))。その後の構造解析によって、膜貫通タンパク質のこれらの領域は、三量体の6個ヘリックス束 (six-helix bundle) として特徴づけられる高次構造を形成する、特定の様式で相互作用することが決定付けられた (Chan, D. C., et al., *Ce*

II 89 : 263-273 (1997) ; Weissenhorn, W., et al., Nature 387 : 426-430 (1997))。この三量体構造は、内部の平行のコイルドコイル三量体コア (領域1、Nヘリックス) からなり、そのコイルドコイル三量体の表面で疎水性の溝に逆向きに平行して斜めに束なった3つの同一のヘリックス (領域2、C-ヘリックス) と会合している。この疎水性の自己構築性ドメインは、gp41のコア構造を構成していると考えられている。FIG. 4Aおよび4B参照。膜貫通タンパク質のN-およびC-ヘリックス領域は、HIV-1の侵入に重要であることが示されている。6個ヘリックス束のコア構造を形成するこれら2つの領域の会合は、gp41の非フソジェニックから融合活性型への遷移する間に起きること、そしてこのコア構造の形成は、ウイルスと標的細胞表面とを架橋して近づけることにより、膜融合を促進すると提案されている (Chan, D. C. and Kim, P. S., Cell 93 : 681-684 (1998) ; FIG.1) 。これが正しければ、6個ヘリックス束の形成はウイルスの進入におけるクリティカルな段階であり、その形成を妨害する因子はその侵入事象を破壊し得る。数多くのウイルスは、HIV膜貫通タンパク質のN-およびC-ヘリックス領域に類似した糖タンパク質の構造を共有している (Lambert et al., Proc. Nat. Acad Sci. 93 : 2186-2191 (1996))。PCT出願公開WO96/19495も参照。

【0009】

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染の処置のための承認されている薬物はすべて、ウイルス逆転写酵素 (RT) かまたはプロテアーゼ活性を標的とするものである。これら薬物の特定の組合せはウイルス複製の抑制において高い効果を有することが分かっているが、複雑な投与レジメおよび耐性ウイルス単離株に対する選択に関わる問題は、更なる治療法の開発の必要性が依然として存在する。組合せ治療において、これらの効果を最大限にするために、これらの新しい薬物は、RTまたはプロテアーゼ以外の標的を利用すべきである。

【0010】

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) に対する単独 (mono-) または複合 (bi-) 治療は、主に、ウイルスの薬物耐性のために一次的に有効であるに過ぎない。抗ウイルス治療の持続した恩恵を得るために、現在のガイドラインでは、

少なくとも3つの薬物の組合せ、またはいわゆる高活性抗レトロウイルス治療 (H A A R T) が推奨されている。これらの進歩にもかかわらず、現在可能な薬物レジメに関わる問題が依然として存在する。その薬物の多くは、重大な毒性を示すかまたは複雑な投与スケジュールを必要とし、コンプライアンスを低下させ効力が制限される。H I Vの耐性株は、H A A R Tレジメにあっても長期間にわたり存在するのが通常である。

【0011】

これらのおよびその他の理由のために、更なる抗H I V薬の開発の必要性が依然としてある。理想的には、これらは、(組合せ治療のための設備に加えて) ウイルスの生活環における異なった段階を標的とし、最小限の毒性を示し、製造コストが低いものである。H I V進入の小分子インヒビターは、これらの課題の解決にかなり役立つであろう。

【0012】

D P - 1 0 7およびD P - 1 7 8ペプチドは、6個ヘリックス束の形成をネガティブドミナント的に破壊することによりH I V - 1複製を阻害することが提唱されている (F I G . 2)。ウイルス進入をブロックするH I Vインヒビターの新しいクラスのプロトタイプとして、これらの化合物は、単独で、またはウイルス複製における他の段階を標的とする薬物と組み合わせて使用するための、さらなる治療の選択肢を提供する。しかしながら、タンパク質中心の治療に関する場合に多いように、これらのペプチドは経口バイオアベイラビリティ、in vivo安定性および製造コストの問題から、決して理想的な薬物候補とはいえない。

【0013】

g p 4 1配列E L D K W A Sを示す単離株から得られた2 F 5モノクローナル抗体は、g p 4 1を標的とする中和抗体である (Muster, T., et al.. J. Virol. 67 : 6642-6647 (1993), and Muster, T., et al., J. Virol. 68 : 4031-4034 (1994))。この抗体は、H I V - 1単離株に72%に保存されているエピトープであるg p 4 1の外部ドメインの線状アミノ酸配列G l u - L e u - A s p - L y s - T r p - A l a (E L D K W A) に位置付けられる。この抗体は線状の決定因子をマップしているが、競合実験では2 F 5エピトープは、自然状態では立体構造であ

ると示唆される。

【0014】

モノクローナル抗体NC-1は、融合活性型gp41の6個ヘリックス束に結合することが示されている(Jiang, S., et al., J. Virol. 72 : 10213-10217 (1998))。NC-1は、gp41のN-およびC-ヘリックスドメインをモデル化したペプチドの混合物で免疫したマウスから産生しクローニングした。NC-1は、gp41のヘリックス(N-ヘリックス)コアドメインおよびオリゴマー形態の両方に特異的に結合する。この立体構造依存性の反応性は、6個ヘリックス束の形成を妨げるgp41のN-末端コイルドコイル領域内のポイントミューテーションによって劇的に減少する。NC-1は、可溶性CD4の存在下でのみ、HIV-1感染細胞の表面に結合する。

【0015】

ホルムアルデヒド固定した、融合活性な全細胞調製物(トランスジェニックマウスにおける)を用いて、様々な地域から得られた、遺伝的クレードA~Eの初代HIV単離株24のうちの23を中和することが可能な抗血清が作製された(LaCasse, R. A., et al., Science 283 : 357-362 (1999))。これらの融合コンピテント免疫原は、HIV結合および融合の間に生じる一過性のエンベロップ-CD4-コレセプター構造を捕らえることができる。

【0016】

発明の要約

数多くのウイルスは、ウイルスの融合および許容細胞への進入のメカニズムに関与する類似したタンパク質/糖タンパク質構造を共有している。本発明は、ウイルス融合および/または許容細胞中への侵入を阻害する化合物をスクリーニングする方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、試験化合物の存在下で細胞表面で発現したウイルスエンベロップにおける1またはそれ以上のクリティカルな侵入中間体の形成を選択的な誘発を図ること、およびそのような中間体の形成または形成の欠如について検証することを含む。これは、本明細書中に記載されたように達成することができる。

【0017】

本発明の特定の態様は、クリティカルな gp 41 構造およびウイルス進入に必要な立体構造の形成を破壊して、HIV 侵入をブロックするような化合物を決定するための方法に関する。CD4 / gp 120 結合に応答して形成する gp 41 の6個ヘリックス束は、そのようなクリティカルな侵入構造の1つを構成する。6個ヘリックス束に特異的な抗体は、その形成をブロックする小分子の能力を測定するために使用される。本発明の方法は、膜貫通タンパク質または糖タンパク質形成が HIV - 2、HTLV - I、HTLV - II、呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、ヒトインフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス3型 (HPIV - 3)、ニューカッスル病ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス (FIV) および麻疹ウイルスが含まれるがこれに限定されないウイルス侵入に関わる構造および複合体を形成するような他のウイルスに適用することができる。

【0018】

本発明はさらに、これらの方法によって同定された、小分子、ペプチド、タンパク質、抗体および抗体断片またはそれらの誘導体であり得る、新規のインヒビターに関する。これらのインヒビターは、HIV - 1 および / または上記の他のウイルスを含む様々なウイルスによる感染を阻害または予防するのに適当である。これらのインヒビターは、HIV - 1 またはその他のウイルスに感染したヒトを処置するために使用できるかまたは、HIV - 1 またはその他のウイルスによる感染を予防するために使用することができる。本発明はさらに、適当な医薬組成物中のインヒビターを包含する。

【0019】

本発明の分析において阻害活性を示す化合物は、膜融合をもたらすウイルスエンベロープ糖タンパク質における立体構造変化につながる、または関連する、いくつかの段階のいずれかに作用し得る。例えば、これらは、エンベロープ糖タンパク質の立体構造変化を引き起こす引金である、エンベロープ糖タンパク質とそのレセプターとの間の相互作用 (例えば、HIV - 1 の場合、gp 120 と CD または CCR 5 もしくは CXCR 4 ケモカインレセプターとの間の相互作用) を阻害し得る。あるいは、これらは、例えばこれらの構造の一部である膜貫通タンパク質のヘリックスドメインの会合を阻止することによって (例えば、HIV

- 1の場合、6個ヘリックス束の形成につながるN-およびC-ヘリックスドメインの会合をブロックすることによって)、融合活性型構造の形成を直接阻害し得る。この分析はまた、まだ完全には解明されていない過程における、他の段階のインヒビターを発見することが可能である。

【0020】

本発明において発見された阻害化合物の作用機序をより詳細に解析するためにさらなる分析を行うことができる。これら分析のための方法は、当業者によく知られている。例えば、CD4またはケモカインレセプターに対するHIV-1 gp120の相互作用のインヒビターを試験するための分析は、Dragic, T., et al., Nature 381 : 667-673 (1996) and Donzella, G. A., et al., Nature Medicine 4 : 72-77 (1998)に記載されている。HIV-1 gp41の6個ヘリックス束のインヒビターを試験するための分析は、Jiang S. et al., J Virol. Methods 80: 85-96 (1999)に記載されている。

【0021】

本発明はさらに、ウイルスに感染した人またはウイルスに感染した体液もしくは組織における、1またはそれ以上のウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質の侵入に関連する立体構造変化を阻害する抗体を検出するための診断的分析として、上記分析の使用を包含する。感染した人または試料におけるそのような抗体の存在は、予後の上で価値あるものである。

【0022】

好ましい態様の詳細な記載

本発明は、ウイルス侵入構造形成のインヒビターをスクリーニングする方法に関する。本発明は、侵入関連構造およびウイルス許容細胞へのウイルス侵入に必要な立体構造の形成を破壊する化合物をスクリーニングする方法を提供する。本スクリーニング方法は、細胞表面発現したウイルスエンベロープにおける1またはそれ以上のクリティカルな侵入中間体の形成を選択的に誘発することおよびその形成を検証することを含む。これは本明細書に記載するように達成することができる。

【0023】

第1の態様では、本発明は、ウイルス侵入および/または融合の立体構造中間体の形成に対する候補化合物の効果の測定を伴う、阻害化合物のスクリーニング分析に関する。特に、本方法は、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質を誘発剤および候補化合物と接触させ、該立体構造中間体の形成に対する候補化合物の効果測定を含む。

【0024】

立体構造中間体の形成に対する候補化合物の効果は、これらの立体構造中間体に結合する抗体によって測定することができる。これは、混合物を特異的な抗体とインキュベーションし、ウイルス侵入および/または融合の立体構造中間体に結合した抗体の量が、その候補化合物の存在によって増加するかまたは減少するかを測定することによって行われる。あるいは、立体構造中間体の形成に対する候補化合物の効果は、誘発剤と接触させる前に存在しているウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質に結合した抗体によって測定することができる。本分析において使用する抗体は、特許請求された発明の重要な構成要件である。1つの態様では、1またはそれ以上の侵入関連構造または立体構造（立体構造中間体）に存在するエピトープに結合する検出抗体は、（誘発剤に接触させる前の）非誘発状態のウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質の領域に実質的に結合してはならない。あるいは、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質に存在するエピトープに結合する検出抗体は、1またはそれ以上の侵入関連構造または立体構造（立体構造中間体）に存在するエピトープに実質的に結合してはならない。

【0025】

本発明の好ましい方法は以下の工程を含む：

- a . 水性緩衝液中で、
 - i . 脂質二重層に会合しているウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質であって、インタクトなウイルスにおけるウイルス進入に必要であり且つ十分であり、ウイルス許容細胞上の1またはそれ以上のレセプターと相互作用することが可能なウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質；
 - i i . 1またはそれ以上のウイルス許容細胞、該許容細胞に由来する1またはそ

れ以上の不溶性または可溶性受容体、またはその組合せ；および

i i i . 試験化合物；

を混合すること、

b . ウイルス許容細胞中へのウイルス侵入に必要な、1またはそれ以上の侵入関連構造または立体構造の形成に対する試験化合物の効果を測定すること。

【0026】

本発明の1つの態様では、工程bは、

ウイルス侵入の事象において立体構造的なまたは構造的な中間体に存在するエピトープに優先的に結合する、場合により検出可能なように標識された1またはそれ以上の抗体を加えること；および

結合した抗体の量を測定すること

によって行われる。

【0027】

本発明の別の態様では、工程bは、

誘発剤と接触していないウイルス膜タンパク質または糖タンパク質に存在するエピトープに優先的に結合する、場合により検出可能なように標識された、1またはそれ以上の抗体を加えること；および

結合した抗体の量を測定すること

によって行われる。

【0028】

いずれの態様においても、本方法は、場合により、さらに、以下の工程：測定された結合した抗体の量を標準値と比較することを含む。

【0029】

好ましくは、工程aは、試薬iと試薬i i iを約10～約120分間、より好ましくは約45分間～約90分間インキュベーションすることを含む。試験化合物の有用な濃度範囲には、約0.1 μg/mL～約100 μg/mLが含まれる。ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質の有用な濃度範囲は広い範囲にわたり、そのウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質が以下に記

述するとおりに提供される様式に依存し得る。

【0030】

有用なウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質は、ウイルス許容細胞中へのウイルスの侵入事象に関わる1またはそれ以上のドメインを有する、これらのタンパク質および/または糖タンパク質である。例えば、HIV-1は、エンベロープ糖タンパク質gp120/gp41を含む。エンベロープタンパク質gp41は、HIV融合およびHIV許容細胞(例えば、リンパ球)への侵入に必要な侵入関連中間体構造の形成に関わるN-ヘリックスドメインおよびC-ヘリックスドメインを含む。RSV、パラインフルエンザウイルス3型(HPIV-3)、麻疹ウイルス、およびインフルエンザウイルスなどの他のウイルスは、ウイルスの融合および侵入を媒介する中間体の構造および立体構造を形成する、機能上類似したエンベロープ糖タンパク質の一次および二次構造を含む。このタンパク質または糖タンパク質は、適当な脂質二重層の系と会合する。

【0031】

本発明の目的に関して、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質は、そのタンパク質または糖タンパク質がネイティブな状態で存在する立体構造に類似した、1またはそれ以上の立体構造でそのウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質が存在するかぎり、数多くの異なる様式で脂質二重層と会合することができる。本発明では、このタンパク質または糖タンパク質が、そのタンパク質または糖タンパク質が、本明細書において定義された「侵入関連」構造および立体構造を形成することが可能な状態にあることが重要である。

【0032】

有用な脂質二重層系には、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質のいずれかを「発現する」、細胞、ビリオン、偽ビリオンまたはその他の適当な膜小胞またはリポソームが含まれる。エンベロープウイルスタンパク質または糖タンパク質は、典型的には、1またはそれ以上の膜会合ドメインおよび1またはそれ以上の膜貫通ドメインを有する。本発明の方法における試薬iの例としては、次が挙げられる：細胞が膜会合エンベロープタンパク質または糖タンパク質を表面で発現するようにトランスフェクトされた細胞、複製欠損ウイルス粒子で

感染した細胞および表面で発現する膜会合エンベロープタンパク質または糖タンパク質、不活化されたウイルス粒子および偽ビリオン。

【0033】

本発明の方法は、膜貫通タンパク質または糖タンパク質が、HIV-1、HIV-2、HTLV-I、HTLV-II、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、パラインフルエンザウイルス3型(HPIV-3)ニューカッスル病ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ヒトインフルエンザウイルスおよび麻疹ウイルスが含まれるがこれに限定されないウイルスの侵入に関与する構造、立体構造および複合体を形成するウイルスに適用することができる。

【0034】

本発明の方法は誘発剤を必要とする。誘発剤は、脂質二重層/膜会合エンベロープタンパク質または糖タンパク質の系と相互作用して、ウイルスエンベロープ系の膜貫通または融合タンパク質における侵入関連構造または立体構造変化を誘導する。上記方法における試薬iiは、誘発剤として供する。特定のウイルスのウイルス融合および侵入のための誘発剤は、典型的にはウイルス許容細胞、該細胞由来の不溶性または可溶性レセプターまたは該レセプターの機能的断片である。本発明の目的に関して、「ウイルス許容細胞」は、典型的に、特定のウイルスが侵入して感染することができる細胞である。

【0035】

有用なウイルス許容細胞または該ウイルス許容細胞由来の不溶性もしくは可溶性レセプターは、特定のウイルスおよび特定のウイルスの融合および進入に許容性である宿主細胞によって記述される。例えば、HIV-1に関しては、許容細胞にはリンパ球が含まれる。リンパ球における可溶性および不溶性のCD4レセプターもまた、誘発剤として本発明において有用であり、CCR5、CXCR4またはその混合物などの特定のケモカインレセプターあるいはCD4を有する細胞へのHIV-1融合を促進することが示されているその他のケモカインレセプターなどの特定のケモカインレセプターも同様に有用である。いくつかのHIV株については、CD4に対する結合は、侵入関連構造および立体構造の形成を誘発するには十分であるが、他のHIV株については、第2のレセプター(通常C

C R 5 または C X C R 4 ケモカインレセプター) への結合が必要である。

【0036】

他のウイルスに対する有用な誘発剤には、特定のウイルスに対する許容細胞系が含まれる。R S V に対しては、H E p 2 細胞が有用な許容細胞である。麻疹ウイルスに対しては、V e r o 細胞が有用な許容細胞である。H I P V - 3 に対しては、H E p 2 が有用な許容細胞である。これら細胞由来の可溶性および不溶性レセプターもまた利用することができる。

【0037】

誘発剤の有用な濃度は、誘発剤が細胞として提供されるかまたは可溶性もしくは不溶性レセプターとして提供されるかによって変わる。さらに、濃度は、特定のウイルスおよびそれに対応するレセプターまたは誘発剤によって変わる。一般に、試薬 i i についての有用な濃度範囲は、レセプタータンパク質にして約 0 . 1 μ g / mL ~ 約 1 0 0 μ g / mL であり、好ましくは約 0 . 1 μ g / mL ~ 約 1 0 μ g / mL である。濃度は、レセプタータンパク質に関して表現する。そのような濃度は、当業者に知られている方法によって測定することができる。誘発剤は、好ましくは、誘発剤を、試験化合物の混合物およびウイルスエンベロープタンパク質もしくは糖タンパク質と約 1 0 分間 ~ 約 1 2 0 分間、好ましくは約 3 0 ~ 約 9 0 分間インキュベーションする。

【0038】

インヒビターの非存在下では、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質と誘発剤とのインキュベーションによって、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質が、ウイルス融合およびウイルス許容細胞中への侵入に必要な 1 またはそれ以上の構造中間体を通じて立体構造の変化を受けらるであろう。

【0039】

1 つの態様では、工程 b で加える抗体は、1 またはそれ以上の中間体構造 (構造的または立体構造的エピトープ) に実質的に結合することが可能である。抗体はさらに、誘発剤の非存在下での、ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質上のエピトープに対する結合の実質的な減少によって特徴づけられる。

有用な抗体には、侵入関連エンベロープ決定因子を正しく形作る、ペプチド、および組換えタンパク質およびタンパク質およびタンパク質断片の組合せに対して惹起された抗体が含まれる。これら抗体を製造する方法およびそれらの結合を測定する方法は以下に記載する。

【0040】

別の態様では、有用な抗体は、(a) 誘発剤と接触させる前にウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質上に存在し、(b) ウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質と誘発剤とを接触させた後に消失する、エピトープに結合する抗体である。これらの抗体を製造する方法およびこれらの結合を測定する方法は以下に記載する。

【0041】

本発明の方法において抗体の結合を検出するために、免疫沈降分析、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡検査法、または蛍光光度法を含む、いくつかの方法を使用することができる。さらに、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)およびラジオイムノアッセイ(RIA)を用いることができる。

【0042】

抗体は、場合により、検出可能な標識で標識する。適当な標識は当業者に知られており、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびグルコースオキシダーゼ等の酵素標識、ヨウ素(^{125}I 、 ^{121}I)、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、三重水素(^3H)、インジウム(^{112}In)およびテクネチウム($^{99\text{m}}\text{Tc}$)等の放射性同位元素、およびフルオレセインおよびローダミン等の蛍光標識が含まれる。あるいは、抗体は、別途添加した標識によって認識される部分、例えばビオチン、で誘導体化することができる。これら標識を用いて抗体を化学的に修飾する技術は、当分野でよく知られている。

【0043】

本方法は、場合により、結合した抗体の量を標準値と比較することをさらに含む。結合した抗体は、当業者に知られている数多くの方法で測定して表示することができる。侵入関連中間体の立体構造または構造に好ましく結合する抗体を用いたとき、侵入関連立体構造を破壊することによってウイルスの融合および侵入

を阻害する化合物によって、試薬 i に結合する抗体の量が減少し、それによって遊離状態の抗体の量がインヒビターなしの系と比較して増加するであろう。非誘発状態のウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質に優先的に結合する抗体を用いると、侵入関連立体構造を破壊することによりウイルスの融合および侵入を阻害する化合物は、試薬 i に結合した抗体の量が、インヒビターなしの系で試薬 i に結合した抗体の量と同様になるであろう。

【0044】

本発明の特定の態様は、1またはそれ以上のクリティカルな gp41 侵入関連構造または立体構造の形成を破壊し、それによって HIV 侵入をブロックする化合物を測定する方法に関する。CD4 / gp120 結合に応答して形成する gp41 の6個ヘリックス束は、1つのそのようなクリティカルな侵入構造を構成する。6個ヘリックス束に特異的な抗体は、その形成をブロックする小分子の能力を測定するために使用される。

【0045】

HIV-1 エンベロープ糖タンパク質 gp120 / gp41 を発現する細胞、ビリオンまたはその他の適当な膜小胞またはリポソームを、潜在的な抗ウイルス化合物（試験化合物）とレセプター（誘発剤）の存在下または非存在下でインキュベーションし、次いで、6個ヘリックス束構造を模倣したペプチドまたは組換えタンパク質の混合物（例えば P15 および P16 の混合物）に対して惹起されたポリおよび/またはモノクローナル血清を用いて gp41 の立体構造の変化を分析する。6個ヘリックス束のような「侵入関連構造」の形成を阻害する試験化合物は、これら抗体の結合の減少を引き起こすであろう。

【0046】

これらの分析における抗体の結合を検出するために、ELISA、免疫沈降分析、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡検査法、または蛍光光度法を含む方法を使用することができる。

【0047】

したがって、本発明の1つの態様では、本方法は、以下の工程を含む：

少なくとも1つの HIV エンベロープ糖タンパク質またはその断片を発現する

細胞を試験化合物とインキュベーションした後、得られた混合物を、少なくとも1つの糖タンパク質またはその断片をウイルス侵入のために活性化するのに十分な量の、その少なくとも1つの細胞表面レセプターの可溶型またはその断片とインキュベーションして、第2の混合物を得ること；

ウイルス侵入事象における、1またはそれ以上の構造または立体構造中間体の形成に対する該試験化合物の効果を測定すること。

【0048】

測定工程は、

ウイルス侵入事象における構造的または立体構造的中间体であるエピトープに結合する、1またはそれ以上の場合により検出可能なように標識された抗体を加えること；および

結合した抗体の量を測定すること
によって行うことができる。

【0049】

あるいは、測定工程は、

誘発剤と接触していないウイルス膜タンパク質または糖タンパク質に存在するエピトープに優先的に結合する、1またはそれ以上の場合により検出可能なように標識された抗体を加えること；および

結合した抗体の量を測定すること
によって行うことができる。

【0050】

本方法は場合により、結合した抗体の測定された量を標準値と比較することをさらに含む。

【0051】

別の態様では、少なくとも1つのウイルスエンベロープタンパク質またはその断片は、糖タンパク質またはその断片である。別の態様では、糖タンパク質またはその断片は、脂質膜または二重層と会合した、HIV-1 gp41 / gp120複合体またはその断片である。

【0052】

本発明はさらに、以下の工程：

ウイルス膜の外側に少なくとも1つの表面エンベロープ糖タンパク質またはその断片を有する非感染性ウイルス粒子を試験化合物とインキュベーションすること；

その後、得られた混合物を、ウイルス侵入のために糖タンパク質またはその断片を活性化するのに十分な量の、少なくとも1つの可溶型の細胞表面レセプターまたはその断片とインキュベーションして第2の混合物を得ること；

ウイルス侵入事象における1またはそれ以上の構造または立体構造中間体の形成に対する該試験化合物の効果を測定することを含む、ウイルス融合インヒビターをスクリーニングする方法に関する。

【0053】

測定工程は、

ウイルス侵入事象における構造または立体構造中間体であるエピトープに結合する、1またはそれ以上の場合により検出可能なように標識された抗体を加えること；および

結合した抗体の量を測定することによって行うことができる。

【0054】

あるいは、測定工程は、

誘発剤に接触していない、ウイルス膜タンパク質または糖タンパク質に存在するエピトープに好ましく結合する、1またはそれ以上の場合により検出可能なように標識された抗体を加えること；および

結合した抗体の量を測定することによって行うことができる。

【0055】

本方法は、場合により、結合した抗体の測定された量を標準値と比較することをさらに含む。

【0056】

1つの態様では、少なくとも1つの表面エンベロープ糖タンパク質またはその

断片は、H I V - 1 g p 4 1 / g p 1 2 0 複合体またはその断片である。

【0057】

別の態様では、エンベローブ糖タンパク質またはその断片を発現する細胞は、H I V - 1 エンベローブタンパク質またはその断片を発現する組換えワクシニアウイルスで感染させた細胞である。別の態様では、エンベローブ糖タンパク質またはその断片を発現する細胞は、H I V - 1 エンベローブタンパク質またはその断片を発現するベクターで形質転換された細胞である。別の態様では、エンベローブ糖タンパク質またはその断片を発現する細胞は、少なくとも1つの実験室に適したまたは初代ウイルス単離株から得られる、少なくとも1つのエンベローブタンパク質またはその断片を有する、複製欠損ウイルス粒子または偽ビリオンで感染させる。

【0058】

より具体的には、本発明に有用な試薬には、非感染性H I V - 1 粒子 (8 E 5 / L A V ウイルス (Folks, T. M., et al., J. Exp. Med 164 : 280-290 (1986) ; Lightfoote, M. M., et al., J. Virol. 60 : 771-775 (1986) ; Gendelman, H. E., et al., Virology 160 : 323-329 (1987))) または少なくとも1つの実験室に適したまたは初代H I V 単離株に由来する、エンベローブ糖タンパク質またはその断片を有する偽ビリオン (Haddrick, M., et al., J. Virol. Methods 61 : 89-93 (1996) ; Yamshchikov, G. V., et al., Virology 21 : 50-58 (1995)) が含まれる。

【0059】

8 E 5 / L A V 細胞系は、非複製系において機能的なエンベローブを発現するインタクトなビリオンを産生する。初代H I V - 1 レセプターC D 4 の可溶型またはその断片を加える (s C D 4) 。 s C D 4 の添加により、g p 1 2 0 に結合し、誘発することにより、ウイルス進入のためにエンベローブ糖タンパク質またはその断片が活性化され、そしてこれがg p 4 1 の融合活性型形態を誘発する。

【0060】

さらに別の態様では、少なくとも1つのウイルスエンベローブタンパク質を発現する細胞、例えばH I V - 1 エンベローブタンパク質またはその断片を発現す

る組換えワクシニアウイルスで感染させた細胞 (Earl, P. L., et al., J. Virol . 65 : 31- 41 (1991) ; Rencher, S. D., et al., Vaccine 5 : 265-272 (1997)) ; Katz, E. and Moss, B., AIDS Res. Hum. Retroviruses 13 : 1497-1500 (1997)) を使用することができる。エンベロープを発現した細胞は誘発剤とインキュベーションする。

【0061】

別の態様として、上記の方法において、CD4およびケモカインを発現する細胞系を、リンパ球または可溶性CD4 (sCD4) の代用とすることができる。この方法によって、試薬iおよび試験化合物を、侵入関連構造および立体構造の形成を誘発するのに供する、CD4、またはCR4、CCR5またはCXCR4などの適当なケモカインレセプターを発現する細胞系とインキュベーションする。

【0062】

上記の方法は、そこでエンベロープタンパク質がウイルス侵入にクリティカルな類似の複合体を形成する、他のウイルスに適合させることができ、これにはHIV-2, HTLV-I, HTLV-II, 呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、ヒトインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、パラインフルエンザウイルス3型 (HPIV-3)、ニューカッスル病ウイルスおよびネコ免疫不全ウイルス (FIV) が含まれるがこれに限定されない。

【0063】

本発明は、小分子、ペプチド、抗体および抗体断片が含まれるがこれに限定されない、これら分析において検出される新規化合物を包含する。

【0064】

本発明はさらに、小分子、ペプチド、タンパク質、抗体および抗体断片またはそれらの誘導体であってよい、これら方法によって同定された新規なインヒビターに関する。これらのインヒビターは、HIV-1および/または上記の他のウイルスが含まれる、様々なウイルスによる感染を阻害または予防するのに適している。これらのインヒビターは、HIV-1または他のウイルスによって感染したヒトを処置するのに使用することができる、またはHIV-1もしくは他のウ

ウイルスによる感染を予防するために使用することができる。本発明はさらに、適当な医薬組成物中のインヒビターを包含する。これらの抗ウイルス化合物は、治療目的で使用される体液、例えば血液または血液成分、においてウイルスを不活化するために使用することもできる。

【0065】

本発明はさらに、1またはそれ以上のウイルスエンベロープタンパク質または糖タンパク質における侵入関連の立体構造変化を阻害する、ウイルスに感染した人またはウイルスに感染した体液もしくは組織における抗体を検出するための診断的分析方法としての、上記分析方法の使用を包含する。感染した人または試料におけるそのような抗体の存在は、予後の上で価値あるものである。

【0066】

抗体

本発明において有用なペプチドおよびポリペプチドは、好ましくは単離された形態で提供される。「単離されたポリペプチド」は、自然の環境から取り出されたポリペプチドを意図する。即ち、組換え宿主細胞内で産生されおよび/または含まれるポリペプチドは、本発明の目的のために単離されていると解される。さらに、「単離されたポリペプチド」は、組換え宿主細胞または天然の供給源から部分的または実質的に精製されたポリペプチドである。例えば、組換え的に産生したポリペプチドは、Smith and Johnson, Gene 67. 31-40 (1988)に記載された1工程の方法により実質的に精製することができる。あるいは、ペプチドはよく知られたペプチド合成技術を用いて合成することができる。

【0067】

本発明の1つの態様では、本明細書において定義されたN-ヘリックスドメインに存在するgp41の7残基反復領域に対応するかまたはこの領域を模倣する安定なコイルドコイル溶液構造を形成することが可能なアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを哺乳類に投与することによって抗体を惹起する。gp41のN-ヘリックス7残基反復領域の溶液立体構造に対応するまたは模倣するアミノ酸配列を含むペプチドまたはそのマルチマーを使用することができる。gp41のN-ヘリックス7残基反復領域は4つの7残基反復を含む。好ましくは

、このペプチドは、HIV gp41の細胞外ドメイン（N-ヘリックスドメイン（配列番号1））の7残基反復領域の約28～55アミノ酸、またはそのマルチマーを含む。ペプチドは、小ペプチドとして投与するか、またはキーホールリンペットヘモシニアン（KLH）、卵アルブミン、ウシ血清アルブミン（BSA）または破傷風トキソイド等のより大きなキャリアタンパク質に担持することができる。gp41の7残基反復領域に対応するまたはこの領域を模倣する安定なコイルドコイル溶液構造を形成するペプチドは、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを形成するために利用することができる。特定のペプチドまたはマルチマーが、gp41の7残基反復領域に対応するかまたはこの領域を模倣する安定な三量体コイルドコイル溶液構造を有するか否かを決定するために、ペプチドを、本明細書の一部を構成するWild, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10537-10541 (1992)に記載の方法にしたがって試験することができる。

【0068】

このタンパク質のN-ヘリックスドメインを形成するHIV-1_{LA1} gp41タンパク質の残基の配列を以下に示す：

【化1】

ARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK
DQQLLGI (配列番号1)

【0069】

有用なペプチドの2つの例として、以下のアミノ末端からカルボキシ末端への次式を有するペプチドP-17：

【化2】

NH₂-NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ-COOH
(配列番号2);

および

アミノ末端からカルボキシ末端への次式を有するペプチドP-15：

【化3】

NH₂-SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL-COOH

(配列番号3).

が挙げられる。

【0070】

これらのペプチドは、場合により、より大きなキャリアータンパク質とカップリングさせるか、または場合によりN - および/またはC - 末端で末端保護基を含む。有用なペプチドは、以下に記載するように、1またはそれ以上、好ましくは1 ~ 10の保存的置換を含むP - 17またはP - 15に対応するペプチドをさらに含む。数多くの有用なN - ヘリックス領域が本明細書に記載される。

【0071】

g p 4 1の膜貫通の近接両親媒性 ヘリックスセグメントに対応するまたはこのセグメントを模倣するアミノ酸配列(C - ヘリックスドメイン(配列番号4))またはその部分を含むペプチドまたはポリペプチドを、哺乳類に投与することによって抗体を惹起することもできる。有用なペプチドまたはポリペプチドとしては、ペプチドP - 17のようなg p 4 1の7残基反復領域に対応するペプチドと混合したときに、コア6個ヘリックス束を形成することが可能なアミノ酸配列が挙げられる。ペプチドは、本明細書の一部を構成するChan, D. C., et al, Cell 89 : 263-273 (1997) ; Lu, M., et al., Nature Struct. Biol. 2 : 1075-1082 (1995)に記載された系と条件を用いてコア6個ヘリックス束を形成する能力について試験することができる。

【0072】

このタンパク質のC - ヘリックスドメインを形成するH I V - 1_{LA1} g p 4 1タンパク質の残基のアミノ酸配列を以下に示す：

【化4】

WNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASL
WNWFNITNW (配列番号4)

【0073】

本発明のこの態様において用いることができる好ましいペプチドまたはそのマ

ルチマーは、HIV gp41の細胞外C-ヘリックスドメインの約6以上のアミノ酸、好ましくは約24～56アミノ酸を含む。このペプチドは小ペプチドとして投与するか、またはキーホールリンペットヘモシニアン(KLH)、卵アルブミン、ウシ血清アルブミン(BSA)または破傷風トキソイド等のより大きなキャリアタンパク質に担持させることができる。この膜貫通の近接両親媒性ヘリックスセグメントは、以下に記載されるペプチドP-16およびP-18によって例示される。gp41の膜貫通の近接両親媒性ヘリックスセグメントに対応するまたはこのセグメントを模倣するアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドは、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を形成するために利用することができる。

【0074】

本発明のこの態様に有用なペプチドの例としては、HIV-1_{LAI}単離株に由来する膜貫通タンパク質gp41の一部に対応し、36個のアミノ酸配列(アミノ末端からカルボキシ末端へと読む)を有する：

【化5】

NH₂-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-COOH

(配列番号5);

するペプチドP-18および

以下のアミノ酸配列(アミノ末端からカルボキシ末端へと読む)：

【化6】

NH₂-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-COOH

(配列番号6)

を有するペプチドP-16が挙げられる。

【0075】

これらのペプチドは、場合により、より大きなキャリアタンパク質とカップリングしている。有用なペプチドは、以下に記載するように、1またはそれ以上、好ましくは1～10個の保存的置換を含むP-18またはP-16に対応するペプチドをさらに含む。全長P-18、36マーおよび全長P-16に加えて、

本発明のこの態様のペプチドは、P - 18およびP - 16の先端が切り取られた形態を含み得る。その先端が切り取られた形態が、P - 17またはP - 15と混合したときに6個ヘリックス束を形成することが可能である限り。

【0076】

gp41コア6個ヘリックス束に対応するまたはこの束を模倣する安定な溶液構造を形成することが可能なアミノ酸配列を含む1またはそれ以上のペプチドまたはポリペプチドを哺乳類に投与することによって抗体を惹起することもできる。この束は、膜貫通タンパク質の遠位領域の相互作用によりgp41において、N - ヘリックスドメインおよびC - ヘリックスドメインに大まかに対応する7残基反復領域および両親媒性ヘリックス領域セグメントを形成する。ネイティブなウイルスにおいて形成するこの束構造は、7残基反復領域のそれぞれの3コピーと膜貫通の近接両親媒性ヘリックスセグメントとの間の三量体相互作用の結果である。本発明において有用な組成物において、ペプチド領域は、互いに相互作用してコア6本束を形成する。マルチマーおよびコンジュゲート構造を含め、安定なコアヘリックス溶液構造を形成するペプチドとポリペプチドの混合物が有用である。

【0077】

(a) gp41の安定なコイルドコイル7残基反復領域に対応するかまたはこの領域を模倣するアミノ酸配列を含む1またはそれ以上のペプチド；および(b) gp41の膜貫通の近接両親媒性ヘリックスセグメントに対応するまたはこのセグメントを模倣する領域を含む1またはそれ以上のペプチド、の混合物を使用し得る。これらの混合物は、溶液に安定であってもなくてもよいさらなる免疫原性構造を提供するために、場合により化学的にまたは酸化的に架橋される。物理的混合および慣用的な架橋に加えて、このペプチド(a)および(b)は、適当な連結基(好ましくは、少なくとも2、好ましくは2~25のアミノ酸残基を有するペプチド残基)を介して互いに結合することができる。好ましい連結基は、さらなる酸化的架橋が想定される場合、グリシンとセリンの組合せまたはグリシンとシステインの組合せから形成される。

【0078】

例示的な態様には、P - 17とP - 18、P - 15とP - 16、P - 17とP - 16またはP - 15とP - 18の物理的混合物に対して抗体を惹起する工程が含まれる。

【0079】

融合活性型の膜貫通タンパク質構造を模倣する1またはそれ以上の新規なペプチドおよびタンパク質を含む、本明細書においてコンジュゲートと称する、組成物を哺乳類に投与することによって抗体を惹起することもできる。これらのコンジュゲートは、

(a) gp41の7残基反復領域に対応するかまたはこの領域を模倣する、安定なコイルドコイル溶液構造を形成することが可能な、28またはそれ以上のアミノ酸の1以上のアミノ酸配列；および

(b) gp41の膜貫通の近接両親媒性ヘリックスセグメントのアミノ酸配列に対応するまたはこのアミノ酸配列を模倣する1またはそれ以上のアミノ酸配列、

を含み、1またはそれ以上の配列(a)および(b)が、ペプチド結合(アミド結合)を介して、または約2~25アミノ酸からなるアミノ酸連結配列によって、互いに交互に連結している、ペプチドおよびタンパク質から形成される。

これらのペプチドおよびタンパク質は、好ましくは組換えにより製造される。

【0080】

これらのコンジュゲートは、好ましくは、侵入関連構造に対応するまたはこれを模倣する構造に折り畳まれそして構築される。形成され得る新規な構築物またはコンジュゲートの例としては、以下が挙げられる(N-末端からC-末端へ読まれる)：

(1) P - 17 - リンカー - P - 18 からなる3直列反復ユニット

(P - 17 - リンカー - P - 18 - リンカー - P - 17 - リンカー - P - 18 - リンカー - P - 17 - リンカー - P - 18)、

(2) P - 17 - リンカー - P - 18 - リンカー - P - 17、

(3) P - 18 - リンカー - P - 17 - リンカー - P - 18、

(4) P - 18 - リンカー - P - 17、

- (5) P - 15 - リンカー - P - 16 から構成される3直列反復ユニット (P - 15 - リンカー - P - 16 - リンカー - P - 15 - リンカー - P - 16 - リンカー - P - 15 - リンカー - P - 16)、
- (6) P - 15 - リンカー - P - 16 - リンカー - P - 15、
- (7) P - 16 - リンカー - P - 15 - リンカー - P - 16、
- (8) P - 16 - リンカー - P - 15、および
- (9) P - 15 - リンカー - P - 16

ここで、各リンカーは、同一でも異なってもよい、約2～約25アミノ酸、好ましくは2～約16アミノ酸残基のアミノ酸配列である。好ましいアミノ酸残基としては、グリシンおよびセリン、例えば (G G G G S)_x (配列番号7) (ここで、xは、1、2、3、4または5である) が挙げられる。任意の記載された構築物において、P - 15とP - 17は互換可能であり、P - 16とP - 18は互換可能である。そのような構築物の例 (配列番号77) を、その構築物の組換え発現に使用される対応する核酸配列 (配列番号78) とともにFIG. 7に示す。

【0081】

本明細書中で用いられる場合、「侵入関連」とは、ウイルス侵入の間のHIVと細胞表面との相互作用の後に生じるまたは露出する特定の分子の分子立体構造または分子構造、およびウイルス侵入における特定のアミノ酸配列および分子立体構造または分子構造の役割を意味する。

【0082】

本明細書中で用いられる場合、「HIV」とは、ヒト免疫不全ウイルスI型のすべての株と単離株を意味する。本発明の構築物は、HIV - 1 gp 41に基づくものであり、HIVタンパク質とその断片のアミノ酸の番号付けは、HIV - 1_{LAI}単離株についてのものである。しかし、HIV - 1ウイルス感染とそのようなHIV - 1感染に対する本発明の効果が、モデル系として本明細書中で用いられているが、標的化される侵入メカニズムは、HIV - 1のすべての株と単離株に関連することが理解されるべきである。従って、本発明は、「包括的スクリーニング」法に関する。

【0083】

本明細書中で用いられる場合「7残基反復」または「7残基反復領域」とは、アミノ酸、一般にはロイシンおよび/またはイソロイシン、の4-3反復を有する共通のタンパク質モチーフを意味し、しばしばヘリックス二次構造に関連する。「7残基反復」は、以下の配列：



[ここで、 AA_1 および AA_4 は、それぞれロイシンまたはイソロイシンのいずれか1つであるが； AA_2 、 AA_3 、 AA_5 、 AA_6 および AA_7 は任意のアミノ酸であってよい]

で示される。Wild, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10537-10541 (1992)を参照。

【0084】

ペプチドは、ペプチド結合によって共有結合した2またはそれ以上のアミノ酸を含む有機化合物として定義される。ペプチドは、構成するアミノ酸の数に関して言及され得る。即ち、ジペプチドは2つのアミノ酸残基を含み、トリペプチドは、3つのアミノ酸残基を含む、など。10またはそれ以下のアミノ酸を含むペプチドは、オリゴペプチドと呼ぶことができるが、10アミノ酸残基よりも長いペプチドはポリペプチドである。

【0085】

完全なgp41アミノ酸配列(HIV-1グループM：サブタイプB単離株：LAI、NからC末端へ)は次の通りである：

【化7】

AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEA
 QQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPW
 NASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEK
 NEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIKIFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIV
 NRVROGYSPLSFQTHLP-TPRG-PDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGSL
 ALIWDDLRSCLFSYHRLRDL LLIVTRIVELLGRRGWEALKYWW
 NLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIR
 QGLERILL. (配列番号8)

【0086】

gp41のN末端ヘリックス領域は、次のとおりである：

【化8】

ARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ
 QLLGI (配列番号1)

【0087】

以下に、タンパク質のN末端ヘリックスドメインにおける、HIV-1_{LAI} gp41タンパク質の残基558～595（配列番号7）の配列を示す。下に記したaおよびdの添字は、7残基反復の4-3位を示す。

【化9】

N N L L R A I E A Q Q H L L Q L T V W G I K Q L Q A R I L A V E R Y L K D Q
 d a d a d a d a d a
 571 578 585 (配列番号2)

【0088】

gp41のC末端ヘリックス領域は、次のとおりである：

【化10】

WNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASL
 WNWFNITNW (配列番号4)

【0089】

以下に、タンパク質のCヘリックスドメインにおける、HIV-1_{LA1} gp41タンパク質の残基643～678のアミノ酸配列を示す：

【化11】

Y T S L I H S L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F
 d a d a d a d a d a
 647 654 661 (配列番号5)

【0090】

HIV-1 gp41のNおよびCヘリックスドメインをモデル化するペプチドは、HIV-1の複数の株から構築することができ、単独でまたは本発明の他のペプチドと組み合わせて用いた場合に、侵入関連gp41構造および立体構造に対する抗体を惹起する得られたペプチドの能力を破壊しない、アミノ酸の欠失、挿入および置換を含むことができる。

【0091】

gp41のNヘリックスドメインをモデル化するペプチドの、所望の抗体反応を引き出す能力に対するそのような変化の効果は、分光光度法により測定することができる。円偏光二色性(Wild, C. et al., PNAS 89 : 10537-10541 (1992))によって測定されたヘリックス二次構造を形成するペプチドの能力を改変しないNヘリックスペプチドの1次配列内の欠失、挿入および置換は、本発明におけるそれらの使用に適合すると考えられる。

【0092】

ペプチドとしてモデル化される場合、gp41のCヘリックス領域は構造化されない。しかし、N-ペプチドと混合する場合、このCペプチドは、6個ヘリックスコア複合体の部分としてヘリックス二次構造をとる。この構造は、混合するとin vitroでN-およびC-ヘリックスペプチドを形成し、分光光度法により特徴付けることができる(Lu, M., et al., Nat. Struct. Biol. 2 : 1075-1082 (1995))。C-ヘリックス構造に対する一次配列の欠失、挿入および置換の効果の最初の決定は、変異体C-ペプチドがN-ペプチドの構築された形態と相互作用して6個ヘリックス束を形成する能力を解析することによって行うことができ

る。相互作用してこの構造を形成するC - ペプチドは、本発明におけるそれらの使用に適合すると考えられる。これは、円偏光二色性を使用して行うことができる。

【0093】

種々のHIV株に由来するN - ヘリックスドメインペプチド配列の例として、以下のペプチドが挙げられるが、これらに限定されない(すべてN末端からC末端の方向に記載する)：

HIV - 1グループM：サブタイプB単離株：LAI

【化12】

ARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLK
DQQLLGI

(配列番号1)

SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ

(配列番号9)

P15 SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL

(配列番号3)

P-17 NLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ

(配列番号2)

【0094】

サブタイプB単離株：ADA

【化13】

SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLALERYLRDQ

(配列番号10)

SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVL (配列番号11)

NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLALERYLRDQ

(配列番号12)

【0095】

サブタイプB単離株：JRF L

【化14】

SGIVQQQNNLLRAIEAQQRMLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLGDQ

(配列番号13)

SGIVQQQNNLLRAIEAQQRMLQLTVWGIKQLQARVL (配列番号14)

NNLLRAIEAQQRMLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLGDQ (配列番号15)

【0096】

サブタイプB単離株：89.6

【化15】

SGIVQQQNNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQARVLALERYLRDQ

(配列番号16)

SGIVQQQNNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQARVL (配列番号17)

NNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQARVLALERYLRDQ

(配列番号18)

【0097】

サブタイプC単離株：BU910812

【化16】

SGIVQQQSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQARVLAIERYLRDQ

(配列番号19)

SGIVQQQSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQARVL (配列番号20)

SNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQARVLAIERYLRDQ (配列番号21)

【0098】

サブタイプD単離株：92UG024D

【化17】

SGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVESYLKDQ

(配列番号22)

SGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVL (配列番号11)

NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVESYLKDQ (配列番号23)

【0099】

サブタイプF単離株：BZ163A

【化18】

SGIVQQSNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLQDQ

(配列番号24)

SGIVQQSNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVL (配列番号25)

SNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLQDQ

(配列番号26)

【0100】

サブタイプG単離株：FI.HH8793

【化19】

SGIVQQSNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLALERYLRDQ

(配列番号27)

SGIVQQSNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVL (配列番号25)

SNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLALERYLRDQ

(配列番号28)

【0101】

サブタイプH単離株：BE.VI997

【化20】

SGIVQQSNLLRAIQAQQHMLQLTVWGVKQLQARVLAVERYLKDQ

(配列番号29)

SGIVQQSNLLRAIQAQQHMLQLTVWGVKQLQARVL (配列番号30)

SNLLRAIQAQQHMLQLTVWGVKQLQARVLAVERYLKDQ (配列番号31)

【0102】

サブタイプJ単離株：SE . SE92809

【化21】

SGIVQQQSNLLKAIEAQQHLLKLTWVGKQLQARVLAVERYLKDQ

(配列番号32)

SGIVQQQSNLLKAIEAQQHLLKLTWVGKQLQARVL (配列番号33)

SNLLKAIEAQQHLLKLTWVGKQLQARVLAVERYLKDQ (配列番号34)

【0103】

グループN単離株：CM . YBF30

【化22】

SGIVQQQNILLRAIEAQQHLLQLSIWVGKQLQAKVLAERYLRDQ

(配列番号35)

SGIVQQQNILLRAIEAQQHLLQLSIWVGKQLQAKVL (配列番号36)

NILLRAIEAQQHLLQLSIWVGKQLQAKVLAERYLRDQ (配列番号37)

【0104】

グループO単離株：CM . ANT70C

【化23】

KGIVQQQDNLLRAIQAQQQLRLSxWGIRQLRARLLALETLLQNQ

(配列番号38)

KGIVQQQDNLLRAIQAQQQLRLSxWGIRQLRARL (配列番号39)

DNLLRAIQAQQQLRLSxWGIRQLRARLLALETLLQNQ

(配列番号40)

【0105】

種々のHIV株に由来するC-ヘリックスドメインペプチド配列の例として、以下のペプチドが挙げられるが、これらに限定されない(すべてN末端からC末端の方向に記載する)：

HIV-1グループM：サブタイプB単離株：LAI

【化24】

WNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASL

WNWFNITNW (配列番号4)

WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF

(配列番号41)

P16 WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL (配列番号6)

P-18 YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF

(配列番号5)

【0106】

サブタイプB単離株：ADA

【化25】

WMEWEREIENYTGLIYTLIEESQNQQEKNEQDLLALDKWASLWNWF

(配列番号42)

WMEWEREIENYTGLIYTLIEESQNQQEKNEQDLL (配列番号43)

YTGLIYTLIEESQNQQEKNEQDLLALDKWASLWNWF (配列番号44)

【0107】

サブタイプB単離株：JRF L

【化26】

WMEWEREIDNYTSEIYTLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF

(配列番号45)

WMEWEREIDNYTSEIYTLIEESQNQQEKNEQELL (配列番号46)

YTSEIYTLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (配列番号47)

【0108】

サブタイプB単離株：89.6

【化27】

WMEWEREIDNYTDYIYDLLEKSQTQQEKNEKELLELDKWASLWNWF

(配列番号 48)

WMEWEREIDNYTDYIYDLLEKSQTQQEKNEKELL (配列番号 49)

YTDYIYDLLEKSQTQQEKNEKELLELDKWASLWNWF (配列番号 50)

【0109】

サブタイプC単離株：BU910812

【化28】

WIQWDREISNYTGHIYRLLEESQNQQENNEKDLLALDKWQNLWSWF

(配列番号 51)

WIQWDREISNYTGHIYRLLEESQNQQENNEKDLL (配列番号 52)

YTGHIYRLLEESQNQQENNEKDLLALDKWQNLWSWF (配列番号 53)

【0110】

サブタイプD単離株：92UG024D

【化29】

WMEWEREISNYTGLIYDLIEESQIQQEKNEKDLELDKWASLWNWF

(配列番号 54)

WMEWEREISNYTGLIYDLIEESQIQQEKNEKDLL (配列番号 55)

YTGLIYDLIEESQIQQEKNEKDLELDKWASLWNWF (配列番号 56)

【0111】

サブタイプF単離株：BZ163A

【化30】

WMEWQKEISNYSNEVYRLIEKSQNQQEKNEQGLLALDKWASLWNWF

(配列番号 57)

WMEWQKEISNYSNEVYRLIEKSQNQQEKNEQGLL (配列番号 58)

YSNEVYRLIEKSQNQQEKNEQGLLALDKWASLWNWF (配列番号 59)

【0112】

サブタイプG単離株：FI.HH8793

【化31】

WIQWDREISNYTQQIYSLIEESQNQQEKNEQDLLALDNWASLWTF

(配列番号60)

WIQWDREISNYTQQIYSLIEESQNQQEKNEQDLL

(配列番号61)

YTQQIYSLIEESQNQQEKNEQDLLALDNWASLWTF (配列番号62)

【0113】

サブタイプH単離株：BE.VI997

【化32】

WMEWDRQIDNYTEVIYRLELSQTQQEQNEQDLLALDKWDSLWNWF

(配列番号63)

WMEWDRQIDNYTEVIYRLELSQTQQEQNEQDLL

(配列番号64)

YTEVIYRLELSQTQQEQNEQDLLALDKWDSLWNWF (配列番号65)

【0114】

サブタイプJ単離株：SE.SE92809

【化33】

WIQWEREINNYTGIIYSLIEEAQNQQENNEKDLLALDKWTNLWNWFN

(配列番号66)

WIQWEREINNYTGIIYSLIEEAQNQQENNEKDLL

(配列番号67)

YTGIIYSLIEEAQNQQENNEKDLLALDKWTNLWNWFN (配列番号68)

【0115】

グループN単離株：CM.YBF30

【化34】

WQQWDEKVRNYSGVIFGLIEQAQEQQNTNEKSLELDQWDSLWSWF

(配列番号 69)

WQQWDEKVRNYSGVIFGLIEQAQEQQNTNEKSLL (配列番号 70)

YSGVIFGLIEQAQEQQNTNEKSLELDQWDSLWSWF (配列番号 71)

【0116】

グループO単離株：CM.ANT70C

【化35】

WQEWDRQISNISSTIYEEIQKAQVQQEQNEKKLELDEWASIWNWL

(配列番号 72)

WQEWDRQISNISSTIYEEIQKAQVQQEQNEKKLL (配列番号 73)

ISSTIYEEIQKAQVQQEQNEKKLELDEWASIWNWL (配列番号 74)

【0117】

ペプチドおよびコンジュゲートは、NH₂末端でアシル化、COOH末端でアミド化してもよい。

【0118】

他のウイルス由来の融合活性領域に由来する有用なペプチドとして以下のペプチドが挙げられる。

RSVに関して：

【化36】

GEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVHEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGK

STT

(配列番号 __)

HPIV3に関して：

【化37】

YTPNDITLNNVALDPIDISIELNKAKSDLEESKEWIRRSNQKLD SIGNW

HQSSTT

(配列番号 __)

麻疹ウイルスに関して：

【化38】

PDAVYLHRIDLGPPISLERLDVGTNLNAIAKLEDAKELLESSDQILRSMK

(配列番号 __)

【0119】

有用な更なるペプチドは、本明細書の一部を構成する、PCT出願公開WO96/19495、および米国特許第6,020,459号、同第6,017,536号、同第6,013,263号、同第6,008,044号および同第6,015,881号に記載されている。ペプチドおよびコンジュゲートはNH₂末端でアシル化、COOH末端でアミド化してもよい。適当なN-ヘリックスおよびC-ヘリックスペプチドの混合物およびコンジュゲートを用いて、侵入関連中間体立体構造および構造に対する抗体を生じさせることができる。ペプチドは、単独で使用して適当なウイルス膜タンパク質または糖タンパク質に対する抗体を生じさせることができる。

【0120】

ペプチドおよびコンジュゲートは、保存的なアミノ酸の置換を含んでいてもよい。保存されたアミノ酸置換は、同様の電荷、大きさおよび/または疎水性の特性を有するアミノ酸による、ペプチド配列の1またはそれ以上のアミノ酸の置換からなる、例えば、グルタミン酸(E)をアスパラギン酸(D)へのアミノ酸置換。保存的な置換のみが行なわれる場合、得られるペプチドは、そのペプチドを誘導したペプチドと機能的に等価である。

【0121】

本明細書に記載されたペプチド配列は、以下のとおり、アミノ酸残基についての1文字表記で示される：

【表1】

A	アラニン	L	ロイシン
R	アルギニン	K	リシン
N	アスパラギン	M	メチオニン
D	アスパラギン酸	F	フェニルアラニン
C	システイン	P	プロリン
Q	グルタミン	S	セリン
E	グルタミン酸	T	トレオニン
G	グリシン	W	トリプトファン
H	ヒスチジン	Y	チロシン
I	イソロイシン	V	バリン

【0122】

本発明において有用なペプチドおよびコンジュゲートは、単一のアミノ酸残基または2～15アミノ酸の範囲の残基の鎖からなるアミノ酸挿入を含んでいてもよい。1またはそれ以上の挿入を、ペプチド、ペプチド断片、アナログおよび/またはホモログに導入してもよい。

【0123】

本発明に有用なペプチドおよびコンジュゲートは、全長ペプチド、アナログおよび/またはホモログのアミノ酸欠失を含んでいてもよい。そのような欠失は、全長ペプチド配列からの1またはそれ以上のアミノ酸の削除からなり、得られるペプチドの下限の長さは4～6アミノ酸である。そのような欠失は、ペプチド配列のうちの1つの連続した部分または1つより多くの分離した部分を含んでいてもよい。

その他の有用な抗体を以下に記載する：

g p 4 1 を標的とする唯一の広範に中和する抗体である2 F 5 モノクローナル抗体。この抗体は、H I V - 1 単離株の72%が保存されているエピトープである

、AIDS gp41から得られる外ドメインの線状アミノ酸配列に位置付けられ
;

融合活性型のgp41における6個ヘリックス束に結合することが示されているモノクローナル抗体、NC-1、は、N-およびC-ヘリックスドメインを形作るペプチドの混合物で免疫したマウスから産生させクローニングした。NC-1は、ヘリックスコアドメインおよびgp41のオリゴマー形態の両方に特異的に結合する。この立体構造に依存する反応性は、gp41のN末端コイルドコイル領域内での、gp41コアの形成を阻害するポイントミューテーションにより劇的に減少する。NC-1は、可溶性CD4の存在下でのみ、HIV-1感染細胞の表面に結合する。

【0124】

免疫原の調製

免疫原は、いくつかの異なる経路によって調製することができる。構築物は、合成ペプチドから作製することができる。これには、各配列をペプチドモノマーとして調製した後、合成後の修飾によって適当なオリゴマー構造を作製することが含まれる。ペプチドは、標準的な固相法によって合成される。三量体のコイルドコイル構造を作製するために、P-17ペプチドモノマーをオリゴマー形成に資する条件下で溶解させる。これらの条件には、20mMリン酸緩衝液(pH4.5)および100μMのペプチド濃度が含まれる(Wild, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1053710541 (1992))。これらの条件下で形成する構造は、場合により、化学的な架橋により、例えばグルタルアルデヒドを用いて、安定化させることができる。

【0125】

あるいは、この構築物の構成成分に対するかもしれない架橋過程の破壊的な作用を回避するために、三量体のコイルドコイル構造を安定化するための分子内ジスルフィド結合形成を利用するプロトコルを用いることができる。この方法は、ペプチド配列内の適当に配置させたシステイン残基の酸化を利用してオリゴマー構造を安定化するものである。これには、P-17ペプチドのN末端への短いリンカー配列が必要である。この方法によって形成される三量体のコイルドコイル

構造は、システイン残基の挿入によって安定化される。この三量体は、サイズ排除クロマトグラフィーによって、残存したモノマーとともに、高次のオリゴマー形態から分離し、分析用超遠心によって特徴付けることができる。これらの共有結合により安定化したコイルドコイルオリゴマーは、6個ヘリックス束の形成のためのコア構造として供する。

【0126】

6個ヘリックス束の調製を達成するために、N-ヘリックスコイルドコイル三量体にP-18ペプチドまたはP-16ペプチドの過剰量を加える。インキュベーションした後、これら2つのペプチドの特異的な会合の高次構造の生成物を安定化するために反応混合物を架橋手順に付す。所望の材料をサイズ排除クロマトグラフィーによって単離し、分析的超遠心によって特徴付けることができる。P-18またはP-16ペプチドのみに対応する免疫原は、特異的な合成後の修飾を必要としない。この方法を用いて、3つの別個の標的構築物を迅速且つ大量に作製する。

【0127】

標的免疫原を調製するための別の方法は、組換えgp41断片を産生する細菌発現ベクターを使用するものである。本発明の侵入関連免疫原形成することが可能なペプチドおよびポリペプチドを生じる発現ベクターの使用は、免疫原調製においてある一定の水準の汎用性を付加する。

【0128】

抗原標的の新しい修飾された形態は、より理解されているHIV-1侵入の構造的な決定因子として考えられる。組換え法は、これらの変化に迅速に順応する。さらに、この製造方法は、様々な構築物の容易な修飾を可能にする（即ち、免疫原性を高めるための、組換えgp41断片へのT細胞またはB細胞エピトープの付加）。最後に、これらの組換え構築物は、ウイルス侵入の過程においてgp41において形成し機能するさらなる構造成分に貴重な洞察をもたらすためのツールとして利用することができる。

【0129】

小さなタンパク質の発現のために、特に、細菌発現ベクター（デューク大学の

Terrance Oas博士より寄贈)を開発した。このプラスミド、pTCLE-G2Cは、pA ED-4、T7発現ベクターに基づいている。修飾TriPLE (Yansura, D. G., Methods Enzymol. 185 : 161-166 (1990)) 融合ペプチドをT7プロモーター (Studier, F. W., et al., Methods Enzymol. 185 : 60-89 (1990)) の後に挿入した。メチオニンをコードするTriPLEペプチドの末端にNdeI部位がインフレームで存在し、臭化シアン(CNBr)開裂部位を生じる。このベクターは、P-17ペプチドの組換え形態を発現させるために初期の実験に使用され (Calderone, T. L., et al., J. Mol. Biol. 262 : 407-412 (1996))、P-18ペプチドおよびP17/P18キメラタンパク質を発現させるために修飾されている。

【0130】

6個ヘリックス疎水性コア構造を作製するために、gp41のいくつかの7残基反復(例えばP-17またはP-15)領域および膜近位両親媒性ヘリックス(例えばP-16またはP-18)断片をアミノ酸残基のフレキシブルなリンカーで分離した。例えば、(GGGGS)_x [xは1、2または3である] (配列番号7) をベクター内にコードさせることができる。これは標準的なPCR法によって行われる。(GGGGS)_x (配列番号7) リンカーモチーフは、発現ベクターのP-17コード領域とP-18コード領域とを連結する合成オリゴヌクレオチドによってコードされる。

【0131】

すべての構築物は、複数の制限酵素消化と配列決定によって特徴付けられる。多重成分の相互作用を達成するこの方法の成功が、最近になって実証された (Huang, B., et al., J. Immunol. 158 : 216-225 (1997))。

【0132】

発現後、組換えgp41断片をインクルージョンボディとして単離し、臭化シアンによってリーダー配列から切り離し、サイズ排除クロマトグラフィー工程 (SUPERDEX75) により、リーダー副生成物から分離する。このプロトコルは、P-17ペプチドの大量の修飾物の精製において成功裏に使用されている (Calderone, T. L., et al., J. Mol. Biol. 262 : 407-412 (1996))。組換

え構築物(2)および(3)を、非変性条件下で等モル量で混合して、6個ヘリックス疎水性コア構造を生じさせる。構築物(1)および(4)は、分子間または分子内で折畳まれて、同じまたは同様の構造を生じる。所望の生成物をSUPERDEX 75 FPLCカラムを用いるサイズ排除クロマトグラフィーにより精製し、ベックマンXL-A型分析用超遠心を用いて分子量により特徴付ける。

【0133】

抗体の作製とキャラクタリゼーション

新規のgp41エピトープ構築物に対する抗体の作製とキャラクタリゼーションは、本発明の第2の態様である。実験用血清およびモノクローナル抗体を生物物理学的および生物学的評価に付する。

【0134】

融合関連に対する抗体の調製については、様々な宿主動物を示差的に発現したまたはパスウェイ遺伝子またはその部分で注射することにより免疫することができる。そのような宿主動物として、ウサギ、マウス、およびラットといった2~3の例が挙げられるが、これに限定されない。免疫学的応答を高めるために、宿主の種によって、フロイント(完全または不完全)、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン等の表面活性剤、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシニアン、次にトロフェノール、およびBCG(bacille Calmette-Guerin)およびコリネバクテリウム・パルヴム等の潜在的に有用なヒトアジュバントを含む、様々なアジュバントを用いることができる。

【0135】

ポリクローナル抗体は、上記の融合関連ペプチドまたはその混合物またはコンジュゲートなどの、抗原で免疫された動物の血清から得られた抗体分子の異成分から成る集合体である。ポリクローナル抗体の調製について、本明細書に記載したような宿主動物を、場合によりアジュバントを添加した1またはそれ以上のペプチドまたは組換えタンパク質で注射することにより免疫することができる。

【0136】

特定の抗原に対する抗体の均質な集団であるモノクローナル抗体は、培養物中

で連続継代細胞系による抗体分子の産生をもたらす任意の技術によって得ることができる。これらには、Kohler および Milsteinのハイブリドーマ法 (Nature 256 : 495-497 (1975) ; and U. S. Pat. No. 4, 376, 110)、ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kosbor et al., Immunology Today 4 : 72 (1983) ; Cole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 2026-2030 (1983))、およびEBV - ハイブリドーマ法 (Cole et al., Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)) が含まれるがこれに限定されない。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含む免疫グロブリンクラスのうちいずれかおよびそのサブクラスである。in vivo でのモノクローナル抗体の高い力価での産生によって、これがやがて好ましい製造方法となる。

【0137】

抗体は確立されたプロトコルにしたがって作製することができる。動物に関する実験 (免疫、採血およびハイブリドーマ産生) はすべて、標準的な方法によって実施する。第1の免疫原のセットは、ペプチド構築物P - 15またはP - 17 (場合により化学的な架橋結合または酸化により安定化されている、三量体コイルドコイルマルチマーを形成することが可能な)、P - 16またはP - 18、およびP - 17 / P - 18混合物またはP - 15 / P - 16混合物 (ここで、ペプチドは場合により化学的にまたは酸化的に架橋結合している) からなる。1つの一連の実験において、免疫原をKLH等の担体に担持させる。

【0138】

Balb - cマウスは、これら構築物のそれぞれで免疫する。マウスにKLHに担持させた抗原100 μ gで免疫する。最初の免疫後、14日目に100 μ g、次いで30および45日目に50 μ gを動物にブーストする。最初のブーストから2週間後にマウスを出血させる。さらに、ペプチド免疫原について概説したのと同じ様に、組換え構築物でマウスを免疫する。

【0139】

免疫の別法として、一次免疫原として、HIV - 1エンベロープ糖タンパク質gp120 / gp41の全部または一部を発現する組換えアデノウイルスベクターを使用し、次いでgp41ペプチド、タンパク質またはその他の構築物でブー

スター免疫することが挙げられる。

【0140】

試料は、E L I S Aによりスクリーニングして抗体結合のキャラクタリゼーションを行うことができる。抗原パネルは、すべての実験用免疫原を含む。1またはそれ以上の実験用免疫原に対する結合について陽性と試験される血清試料を有する動物は、モノクローナル抗体産生に使用するための候補である。この最初のスクリーニングの後、モノクローナル抗体産生のために、各実験用免疫原を示す1匹の動物を選択する。

【0141】

ハイブリドーマ上清を、構築されたおよび構築されていないペプチドおよび組換え体に対するE L I S Aによりスクリーニングする。E L I S Aが陰性あるいは弱い陽性である試料をさらにI g Gについて特徴付ける。I g Gが存在していれば、その物質を生物物理学的および生物学的分析においてスクリーニングする。強い陽性の試料は、ウイルスを中和するおよびエンベロープを結合する能力についてスクリーニングする。

【0142】

種々の条件下で、H I Vエンベロープを結合する能力について抗体を詳細に特徴付ける。ネイティブのエンベロープに結合する抗体の検出のために、インタクトであるものおよび溶解したモノの両方の、E n v - 発現細胞およびビリオンにおける免疫沈降は、非イオン性界面活性剤を用いて行う (Furata, RA et al., Nat. Struct. Biol. 5 (4) : 276-279 (1997) ; White, J. M. and I. A. Wilson, J. Cell Biol. 105 : 2887-2894 (1987) ; Kemble, G. W., et al., J. Virol. 66 : 4940-4950 (1992))。細胞リゼートおよびインタクトなビリオンに対する抗体結合も、E L I S A法で分析する。フローサイトメトリー実験は、エンベロープ発現細胞に対する結合を測定するために行う。他のマッピングされたモノクローナル抗体、ヒト血清およびペプチドを用いる交差競合実験も行うことができる。立体構造の変化に対する「誘発因子」を特徴付けるために、抗体結合をs C D 4および標的細胞の存在下および非存在下で比較することができる (White, J. M. and I. A. Wilson, J. Cell Biol. 105 : 2887-2894 (1987) ; Kemble,

G. W., et al., J Virol. 66 : 4940-4950 (1992))。g p 4 1 領域は高度に保存されているので、構造における可能性のある相違を識別するために、いくつかの異なるエンベロープを用いてエピトープの露出を、主な、実験室に適合した単離株および遺伝的に多様化したウイルス単離株の間で比較することができる。

【0143】

ウイルスエンベロープに対するペプチド抗血清の結合をイムノブロットおよび免疫沈降 (I P) 分析を用いて解析する。これら分析の結果は、ある特定のペプチドおよび組換え g p 4 1 断片が融合活性型のエンベロープ結合因子を正しく形作ることを示している。ウェスタンブロット実験の結果は、ウイルスエンベロープ決定因子に対する強い結合を示す、より安定に構築された免疫原に対して惹起された抗血清を用いた E L I S A 分析から得られた結果と大体似ている。リゼート免疫沈降分析では、g p 4 1 ならびに P 1 5、P 1 7 および P 1 5 / P 1 7 混合ペプチドに対して生じたポリクローナル抗血清は、ウイルス膜貫通タンパク質を沈降させる。これらの結果は、N - ヘリックスペプチドおよび N - および C - ヘリックスペプチドの混合物および g p 4 1 がいずれも、ネイティブのウイルスエンベロープでみられる構造に対する抗体を生じることを示している (F I G . 6 a)。

【0144】

融合活性型の g p 4 1 決定因子に対する抗体を生じるこれら免疫原の能力をさらに測定するために、一連の表面免疫沈降分析を行った。これらの実験は、受容体誘発の前または後の細胞表面発現したエンベロープに対する抗体結合のキャラクタリゼーションを可能にする。この分析法は、非フソジェニックおよび融合活性型のエンベロープの両方にみられるエピトープの試験が可能である。これらの実験において可溶性のおよび細胞発現した形態の両方における C D 4 を、g p 4 1 活性化の誘発因子として利用する。結果は、N - ヘリックスペプチド、N - および C - ヘリックスペプチドの混合物、および r g p 4 1 の両方が融合活性型の構造に対する抗体を生じることを示している (F I G . 6 b)。C D 4 誘発後の、6 個ヘリックス束に対して生じた抗血清により大きく増加した結合は、ウイルス侵入における、この g p 4 1 決定因子の提案された役割と一致するものである

。

【0145】

E L I S A分析

Nunc Immulon 2HBプレートを $1\mu\text{g}$ /ウェルのペプチドでコートする。所望の希釈率の試料約 $100\mu\text{L}$ を2個1組で加え 37°C で2時間インキュベーションする。ハイブリドーマ上清はそのまま試験し、ポリクローナル血清は、 $1:100$ の初濃度、次いで4倍希釈で分析する。インキュベーションした後、試料を除去し、プレートを $\text{PBS} + 0.05\% \text{ Tween-20}$ で洗浄し、 $100\mu\text{L}$ /ウェルの希釈したホスファターゼ標識した二次抗体 (Sigma) を加える。二次抗体 - コンジュゲートを、ブロッキング緩衝液中で $1:1500$ の最終濃度に希釈して加える。室温でインキュベーションした後、プレートを洗浄し、基質 (Sigma ファースト p - ニトロフェニルホスフェート) を加える。発色させた後、プレートを 405nm で読み取る。

【0146】

ウエスタンブロット分析

市販のHIV - 1ウエスタンブロットストリップを、洗浄緩衝液 ($\text{PBS} + 0.05\% \text{ Tween-20}$) で予め湿らせる。試料を緩衝液 (PBS 、 $0.05\% \text{ Tween-20}$ 、 5% 濃縮ミルク) 中で、ハイブリドーマ上清に対して $1:5$ 、ポリクローナル血清に対して $1:200$ の終濃度に希釈し、ストリップに加える。インキュベーション (浸透しながら2時間) した後、洗浄緩衝液でストリップを洗浄する (3×5 分間隔)。ペルオキシド標識した二次抗体 (Kirkgaard & Perry Laboratories) を、 $1:5000$ の濃度で加えて、浸透しながら1時間インキュベーションする。ストリップを、記述の通りに再び洗浄し、TMB基質を加える。水を添加することにより発色を止める。

【0147】

リゼート免疫沈降分析

ハイブリドーマ上清または免疫血清 (immunoserum) を、HIV - 1 I I I B細胞リゼート $4.2\mu\text{L}$ を含有する $200\mu\text{L}$ の PBS 中で、 4°C にて一晩インキュベーションする。リゼートは、H9細胞系の急性感染から調製する。タンパク

質AおよびGアガロースの添加により免疫複合体を沈降させ、洗浄し、10% SDS-PAGE (NOVEX) により解析し、ニトロセルロースに転写し、抗gp41モノクローナル抗体Chessie 8 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Programより入手) でイムノブロットングを行い、化学発光分析 (Amersham) およびオートラジオグラフィーによって検出する。

【0148】

表面免疫沈降分析

エンベロープ発現細胞は、リポフェクトアミン法 (Gibco BRL) を用い、Rev発現ベクター (カリフォルニア大学 (カリフォルニア州、サン・フランシスコ) のTris Parslow氏により提供) およびEnv発現ベクターpSM-WT (HXB2) (ニューヨーク大学 (ニューヨーク州、ニューヨーク) のDan Littman博士により提供) により、ヒト293T細胞を同時トランスフェクションすることにより調製することができる。ケモカインレセプターを有するおよび有しない、CD4を発現するU87細胞は、Littman博士により提供される。あるいは、実験室に適合した細胞系または一次リンパ球細胞の急性感染により、エンベロープ発現細胞を調製することができる。表面免疫沈降: 感染後2日目に、 5×10^6 Env-発現293T細胞を、可溶性CD4 (Intracell Inc.) (終濃度4 μ M) または適当な標的細胞 (培地0.5 mL中、 5×10^6 細胞) の存在下および非存在下で、0.5 mLのDulbecco修飾Eagle培地 (DMEM) 中、所望の温度にて1時間インキュベーションする。2 μ Lの免疫血清またはハイブリドーマ上清を加え、さらに1時間インキュベーションさせる。リン酸緩衝整理食塩水 (PBS) で細胞を2回洗浄し、200 μ Lの溶解緩衝液 (1% Triton X-100、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、pH 7.4) で溶解する。透明化した上清を12.5 μ Mタンパク質A-アガロース / 12.5 μ Mタンパク質G-アガロース (GIBCO BRL) の混合物と、4にて1時間インキュベーションし、溶解緩衝液で洗浄 (3 \times) する。免疫沈降した複合体を10% SDS-PAGE (NOVEX) によって解析し、ニトロセルロースに転写し、抗gp41モノクローナル抗体Chessie 8 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Programより入手) でイムノブロットングを行い、化学発光分析 (Amersham) およびオートラジオ

グラフィーによって検出する。

【0149】

免疫沈降実験

一連の抗体を表面免疫沈降分析によって、gp120/gp41+細胞とsCD4または種々の受容体およびコレセプターの組合せを発現している細胞との相互作用の後に、HXB2 gp41に結合する能力について試験する。CD4の表面発現した形態および二次レセプターは、CD4のみ、CD4+CXCR4、およびCD4+CCR5を選択的に発現するように処理を施されたU87細胞系により提供される。それぞれの場合において、インキュベーションを37℃にて種々の時間（以下に記載するように、はじめは5分、1、4、12時間）行い、次いで、4℃に冷却して免疫沈降を行っている間の更なる変化を制限する。免疫沈降は、上記のようにして行う。

【0150】

エンベロープ発現細胞の調製

エンベロープ発現細胞は、CD4および適当なケモカインレセプターを発現するU87細胞を、高感染多重度(MOI)の所望の一次ウイルス単離株で感染させることによって調製する。我々は、そのパネルに含まれるHIV-1単離株のそれぞれの生育を特徴付け、U87細胞系においてすべて十分に感染し複製されていると決定付けた。各ウイルス単離株について、与えられたMOIでのエンベロープ発現のレベルを、記述のイムノプロット法によって決定した。各HIV単離株について、それぞれのケースで同様のエンベロープ発現レベルを与えるようにMOIを調整する。表面免疫沈降分析は上記のようにして行う。

【0151】

実施例1

抗体の形成

gp41の6個ヘリックス束に対するモノクローナル抗体は、標準的な方法によって調製する。使用した免疫原は、ウイルス侵入事象に関与するエンベロープタンパク質または糖タンパク質のN-およびC-ヘリックスドメインをモデル化した合成ペプチドの物理的混合物からなる。免疫原は、N-およびC-ヘリック

sgp41ドメインをモデル化した合成ペプチドの物理的な混合物からなる。

【化39】

Nペプチド: SGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL

(配列番号3)

Cペプチド: WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL

(配列番号6)

【0152】

4匹のbalb-cマウスをこの混合構築物で免疫する。最初の免疫(100 µg)の後、14日目に100 µgを、30および45日目に50 µgを動物にブーストする。最初のブーストから2週間後に出血させる。実験動物の免疫によって作製したモノクローナル血清を、結合を特徴付けるELISAによってスクリーニングする。ELISAにより試験の結果結合が陰性の血清試料を破棄する。試験の結果、実験免疫原に対する結合が陽性である血清試料を有する動物は、モノクローナル抗体(MAb)製造における使用の候補である。この最初のスクリーニングの後で、少なくとも1匹の動物をMAb製造のために選択する。この選択の判断基準は、同起源の免疫原に対するエンベロープ結合パターンに基づく。ハイブリドーマ上清を混合ペプチド免疫原に対するELISAによってスクリーニングする。ELISA陰性である試料を破棄する。強い陽性の試料を、ウイルスエンベロープを結合するそれらの能力についてスクリーニングする。この方法を用いて、sgp41の6個ヘリックス束に対して一連のモノクローナル抗体を作製する。

【0153】

実施例2

ウイルス融合インヒビターの分析

トランスフェクションから2日後、HIV-1 HXB2エンベロープを一時的に発現したインタクトな293T細胞を試験化合物の存在下でインキュベーションする。1時間後、2 µgの可溶性CD4(sCD4)またはCD4を発現する細胞系を加える。さらに1時間後、6個ヘリックス束構造に対するモノクローナ

ル抗体を10 µg/mLの濃度で加え、混合物を25 で3時間インキュベーションする。このインキュベーション後、細胞をPBSで4回洗浄し、1 mLの溶解緩衝液(1% Triton X-100、150 mM NaCl、および50 mM Tris-HCl、pH 7.4)で溶解する。透明になった上清を、25 µLのプロテインA-アガロース、125 µLプロテインG-アガロース(GICOBRL)と、4にて一晩インキュベーションし、溶解緩衝液で3回洗浄する。免疫沈降した複合体を10% SDS-Pageゲルで解析し、ニトロセルロースに移し、抗gp41モノクローナル抗体Chessie 8(NIH AIDS Research and Reference Reagent Programより入手)でイムノブロッティングを行い、化学発光分析およびオートラジオグラフィーによって検出する。試験化合物は、モノクローナル抗体がHIV-1 gp41タンパク質を免疫沈降することができない、または免疫沈降する能力を有意に減少させるならば、6個ヘリックス束の破壊について陽性であると考えられる。

【0154】

実施例3

ウイルス融合インヒビターとしてジメチルサクシニルベツリン酸を使用する分析
本明細書において概説する分析は、その使用者が、試験化合物がウイルス侵入に必要なHIV-1 gp41立体構造の変化を破壊するかどうかを測定することが可能な細胞ベースの系からなる。これらクリティカルな立体構造変化を破壊する、試験化合物の能力は、gp41コア構造の形成を特徴付けることによって評価する。このマルチマー構造は、gp41のN-およびC-ヘリックスドメイン(FIG 7b)の相互作用によって形成される。この分析の1つの形態において、検出工程はそのコア構造に特異的な抗体(モノまたはポリクローナル)を用いる。

【0155】

与えられた化合物がgp41の立体構造変化を破壊する能力と、ウイルス複製の障害との相関関係を確立するために、以下の実験を計画した。分析は、免疫沈降(IP)分析法の修飾であり、試験化合物と、インタクトな、gp120/gp41エンベロープ複合体をその表面に発現しているウイルス感染細胞とをイン

キュベーションすることを含んでいる。ウイルス侵入に必要な gp41 の立体構造変化は、標的細胞レセプター CD4 の可溶型が、CD4 をその表面に発現している非感染標的細胞の添加のいずれかによって誘発した。コア構造に特異的な抗体 (Ab) を加えた。コア構造形成は、Ab 結合を可能にし、ゲル電気泳動を用いて特徴づけおよび定量ができる Ab / コア構造複合体を免疫沈降させる。簡単にいえば、コア構造形成の場合、(立体構造変化の破壊) をウェスタンブロットによって免疫沈降させて可視化する。gp41 は免疫沈降されなかったか見えなかった。これらの実験では、試験化合物の能力をコア構造形成のその効果を測定することによって測定した。

【0156】

コア形成につながる段階を破壊する能力について、いくつかの化合物を、以下のようにして測定した：

この実験では、ジメチルサクシニルベツリン酸 (DSB) を 2 種類の異なる濃度で分析した。FIG 8 に示されるように、試験化合物の非存在下で sCD4 誘発の後に免疫沈降した gp41 の量 (レーン 1) は、10 Mg/mL の DSB (レーン 2) の存在下で免疫沈降した gp41 の量よりも有意に多い。試験化合物を 100 µg/mL の量で加えると (レーン 3)、免疫沈降した gp41 の量は、CD4 誘発の非存在下で記録されたレベル (レーン 4) と同じ位までさらに減少する。

【0157】

細胞表面で発現したエンベロープではなく、HIV-1 エンベロープリゼートを用いた実験を行うことにより、DSB の結果がコア構造形成の破壊に起因するものであり、コア構造に結合する抗体の阻害ではないことがさらに実証された。この系ではコア構造は、試験化合物の添加前に存在しており、試験化合物がコア構造に対する抗体の結合を阻害するならば、表面免疫沈降法において観察されるのと同様の効果が観察されるであろう (FIG 8 参照)。しかし、抗体結合の減少は観察されなかった。10 µg/mL (レーン 1) および 100 µg/mL (レーン 2) の DSB 濃度では、化合物なしの対照 (レーン 6) と同等の gp41 の量が回収される (FIG 9)。

【0158】

実施例4

非感染性8E5/LAVウイルス粒子の調製

8E5/LAVウイルス粒子は、欠損（非感染性）HIV-1粒子の合成のためにコードするプロウイルスDNAの1つの統合されたコピーを含むT細胞クローンの産物である（Folks, T. M., et al., J. Exp. Med. 164 : 280-290 (1986)）。この細胞系8E5/LAVは、5'-ヨード-2'-デオキシウリジン（IUdR）に繰り返し暴露することによりLAV（ここではHIV-1_{IIIB}と称する）で感染した、A3.01親細胞系（CD4+CEM誘導体）から誘導した。このクローニングされた細胞系によって産生されたウイルスは、非機能的な逆転写を生じる非感染性ウイルス粒子の形成をもたらす、pol遺伝子に1つの塩基対の付加（第3241番）を含んでいる（Gendelman, H. E., et al., Virology 160 : 323-329 (1987)）。この突然変異ウイルスのキャラクタリゼーションから、その他の構造遺伝子産物（gagおよびenv）は正常に産生し、構築されてレトロウイルス粒子を形成することが分かった。

【0159】

8E5/LAV細胞系を、10%FCSおよび抗生物質を添加したRPMI 1640培地にて培養する。5×10⁵細胞/mLの初密度で2日間培養した培養細胞は、培養上清中で約10⁸/mLの濃度のウイルス粒子になる（電子顕微鏡により測定）。回収日に、細胞を低速（1500RPM）で遠心することによって取り出し、培養細胞上清を0.45µmフィルターで濾過することによって透明にする。ウイルス粒子は、超遠心（26000×g、5時間、Sorval TFA 20.250ローター、4）により小さな培養副産物から分離する。ウイルスペレットを0.1倍の容量のPBS中で懸濁し、EM（ABI, Columbia, MD）により定量する。使用するまでウイルス粒子を-70で保存する。

【0160】

実施例5

sCD4-ウイルス混合物の形成

非感染性ウイルスをPBS中に懸濁して、最終濃度約10⁸粒子/mLにする。

可溶性CD4（分子量46,000）を加え（終濃度2mg/mL）、混合物を37で4時間インキュベーションする。終了時に、サイズ排除クロマトグラフィー（Sephadex（登録商標）G-50）またはスクロース勾配による超遠心のずれかによって、混合物を複合体化していないsCD4から分離する。

【0161】

上記で特定の好ましい態様について記述したが、本発明がそのように限定されないことは理解されよう。様々な修飾を開示された態様に対して行うことができ、そのような修飾が、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内であると意図されることは当業者には想到される。

【0162】

本明細書において言及したすべての刊行物、特許および特許出願は、本発明が属する分野の当業者の技術レベルを示すものである。すべての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物または特許出願が、それぞれ、具体的におよび個別にその全体が参考として援用されるように、同じ程度に、本明細書において参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ウイルス進入の媒介におけるgp41の仮定的な役割を説明するものである。ネイティブな状態では、HIV-1エンベロープ複合体は、非フュージニック（non-fusogenic）形態で存在する。CD4（ある場合にはケモカイン）結合の後、プレ-ヘアピン中間体の形態をとる。この時点で、膜貫通タンパク質であるgp41が伸張した立体構造をとり、N-およびC-ヘリックス領域はまだ会合していない。この中間体は6個ヘリックス束（ヘアピン中間体）の形成へと進行する。この束の形成は、ウイルスと細胞膜を互いに近づくよう引き寄せることによってウイルス標的細胞融合の促進に寄与する。阻害ペプチドのようなインヒビターの存在下では、このペプチドとgp41の適当な相補領域との間の相互作用によってプレ-ヘアピン中間体（伸張した立体構造）が安定化され、「安定化されたプレ-ヘアピン中間体」を形成する。このプレ-ヘアピン中間体の安定化によって、6個ヘリックス束の形成が不可能になり、ウイルス侵入の防御として有効にはたらく。この安定化されたプレ-ヘアピン中間体は、本発明の

方法で用いられる抗体を生じさせるのに有用な融合活性型免疫原の1つの形態である。

【図2】 FIG. 2A - 2Cは、gp41の融合活性型形態を捕らえて安定化するための、エピトープ標的化ペプチド、P-18HAの使用を説明するものである。FIG. 2Aは、可溶性および細胞発現したCD4への結合によるHXB2エンベロープの活性化後の、P-18HAによるgp41の同時免疫沈降を示す(+/-は、CD4の存在または非存在を示す)。FIG. 2Bは、抗CD4結合抗体(Q4120、Sigma)による、P-18HA結合の同時免疫沈降の防御を示す。FIG. 2Cは、HIV初代CCR5依存性単離株のエンベロープに対するレセプター活性化(CD4およびケモカイン両方)の効果を示す。各パネルにおいて、^{*}は、IgG重鎖によるバンドを、[†]は、恐らくタンパク質の分解によって生じたgp41の短い断片によるバンドを示す。

【図3】 HIV-1 gp41の構造および抗原領域の模式図である。この図は、抗体がgp41に結合したときに、これらの領域に生じる立体構造変化も示している。

【図4】 FIG. 4Aおよび4Bは、6個ヘリックス束構造を形成するgp41のN-およびC-ヘリックスドメインの相互作用を示す模式図である。上面図および側面図の両方を示す。束の内部はN-ヘリックスコイルドコイルを示す。外部の構造部分は、C-ヘリックスドメインを示す。

【図5】 ウイルス侵入の間に形成するgp41中間体構造の模式図である。融合中間体Iは、レセプター結合の直後に形成し、伸張した形態の外部領域を示す。融合中間体IIは、コア構造の形成の後のgp41を示す。阻害ペプチドは、ドミナントネガティブな様式で、gp41の相補領域との相互作用によって阻害すると考えられる。

【図6】 FIG. 6Aおよび6Bは、リゼート免疫沈降実験の結果を示す。FIG. 6Aは、N-およびC-ヘリックスペプチド(個々のおよび混合した)および組換えgp41に対して生じたポリクローナル血清に関するリゼート免疫沈降実験の結果を示す。このアッセイでは、C-ヘリックスペプチドによって生じた血清を除き、血清はすべてHXB2 gp41を免疫沈降する。この実験に

において、sCD4の存在または非存在(+/-)は、結果に影響がなかった。FIG. 6Bは、同じ一連の血清を用いた表面免疫沈降実験の結果を示す。この実験では、4種類の血清(N1、N2、C1/N1混合物およびrgp41)が、表面発現したエンベロープのCD4活性化の後のgp41に対する増大した結合を示した。混合ペプチドおよびrgp41血清のバンドは非常に重く、一方、N-ヘリックスペプチド血清のバンドが非常に軽い。各パネルにおいて、^{*}は、IgG重鎖に起因するバンドを示す。

【図7】 FIG. 7Aおよび7Bは、HIV-1gp41の構造および抗原領域を示す模式図である。これらの図はまた、gp41コア構造に特異的な抗体の結合によってこれらの領域が典型的に受ける立体構造の変化も示す。

【図8】 2種類の異なる濃度：10μg/mLおよび100μg/mLのジメチルサクシニルベツリン酸(DSB)を用いた細胞表面発現したエンベロープに対する表面免疫沈降実験の結果を示す。

【図9】 2種類の異なる濃度：10μg/mLおよび100μg/mLのジメチルサクシニルベツリン酸(DSB)を用いた、細胞表面発現したエンベロープではなくHIV-1エンベロープリゼートに対する免疫沈降実験の結果を示す。

。

【図1】

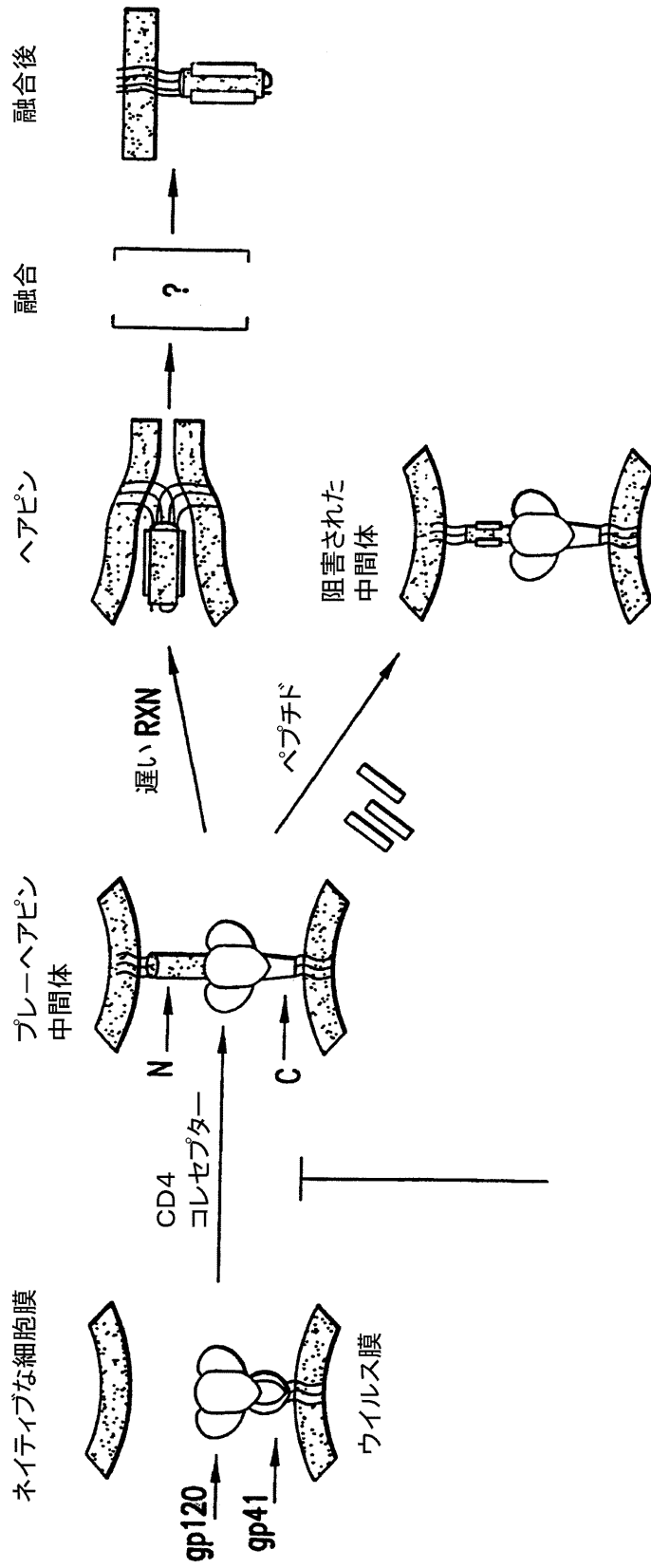


FIG.1

【圖2A】

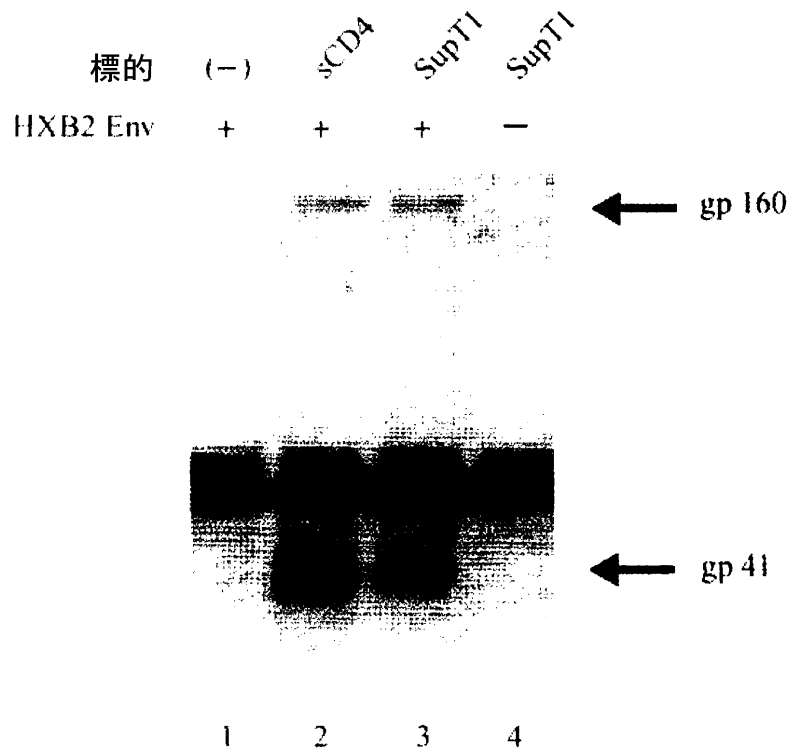


FIG.2A

【图2B】

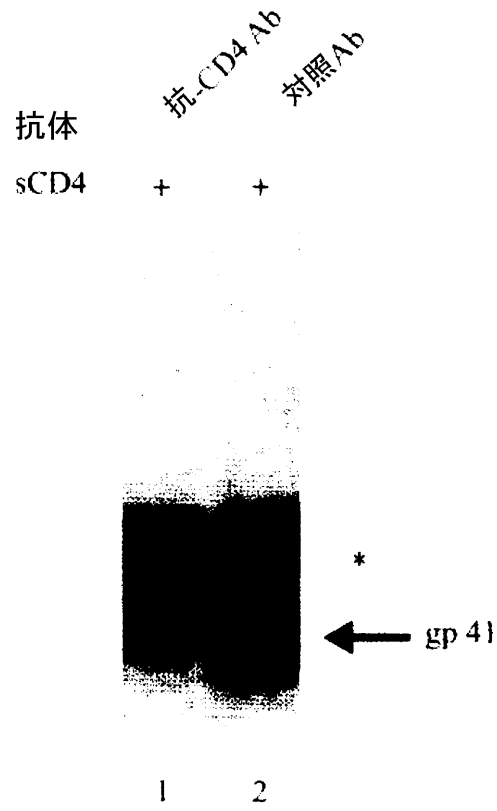


FIG.2B

【図2C】

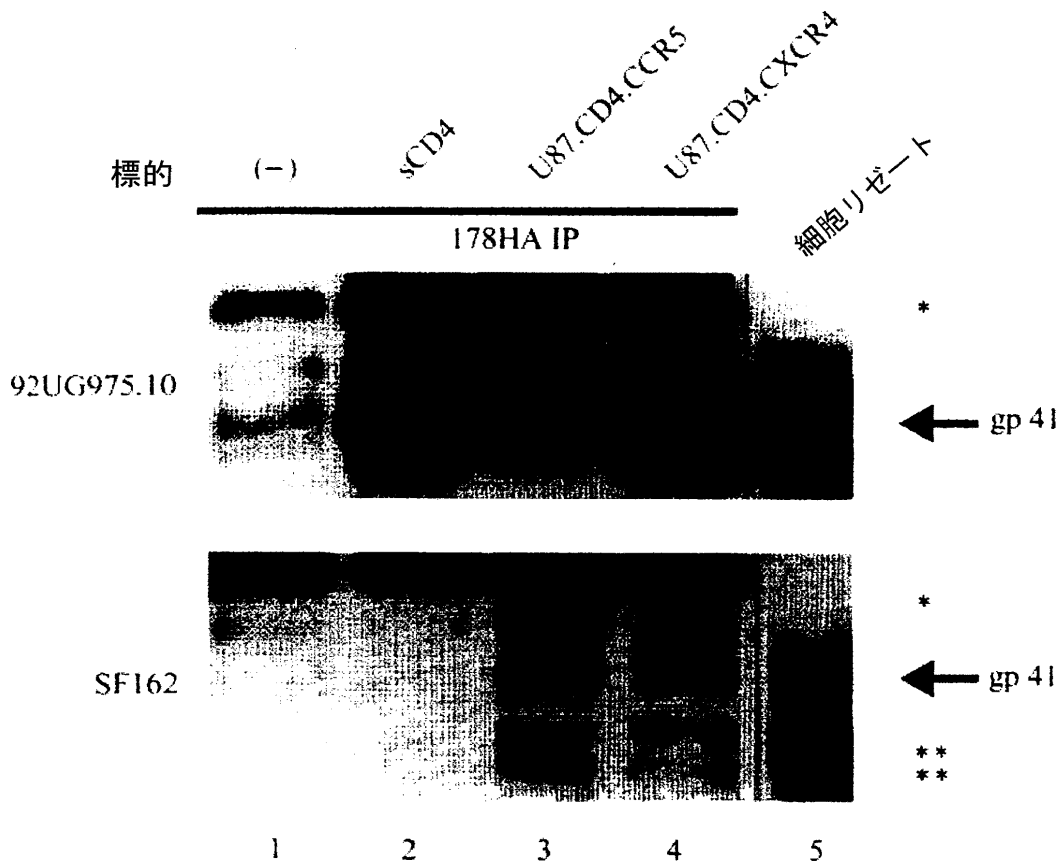


FIG.2C

【図3】

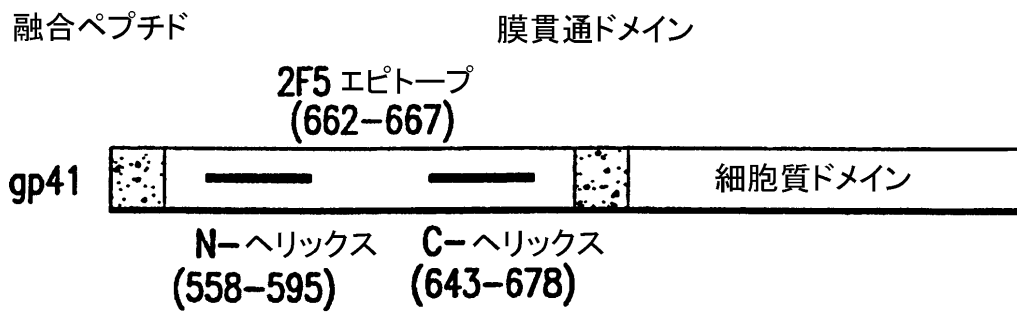


FIG.3

【図4A】

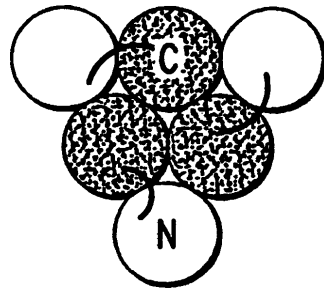


FIG. 4A

【図4B】

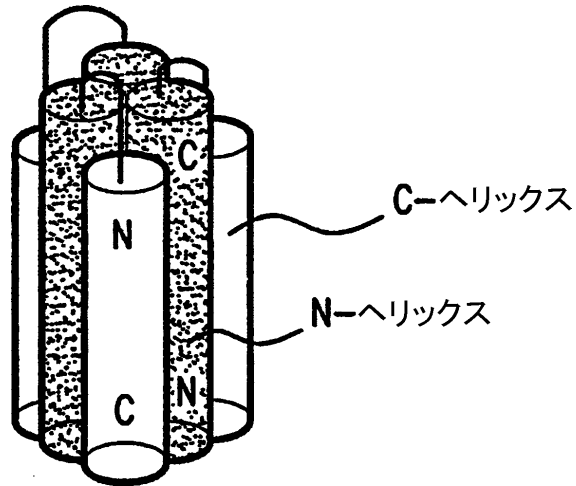


FIG. 4B

【図5】

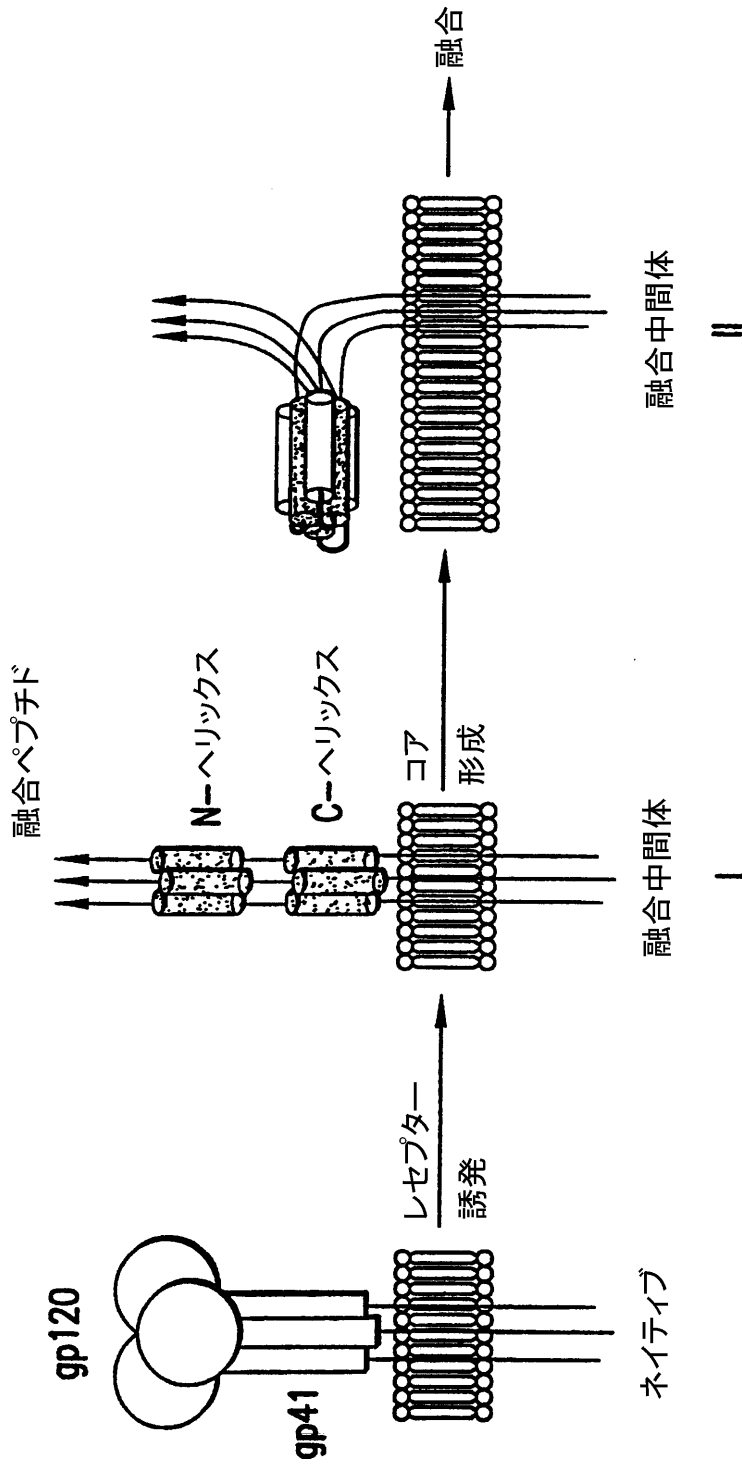


FIG.5

【図6A】

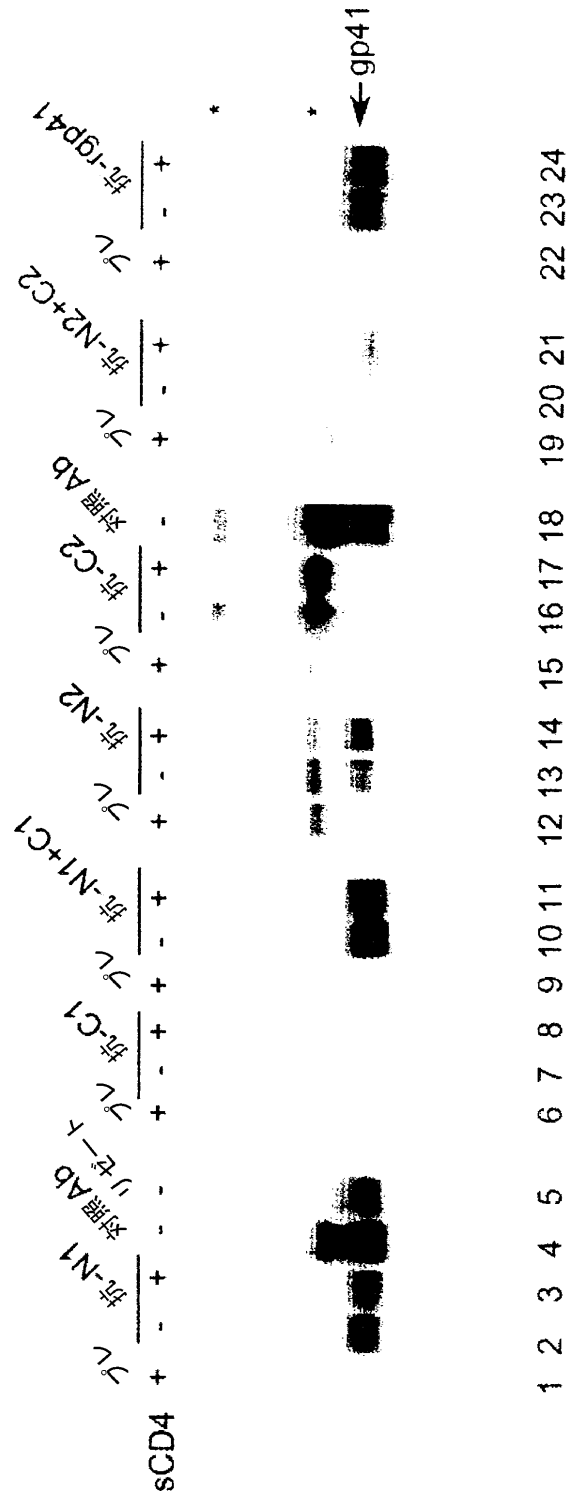


FIG.6A

【図6B】

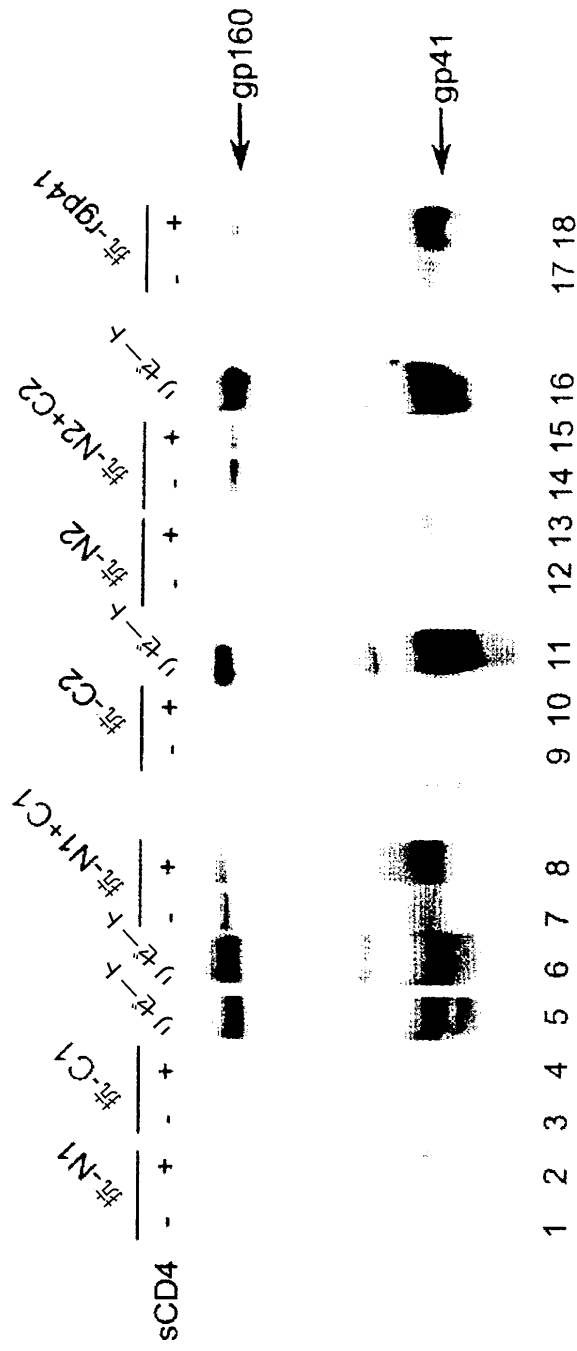
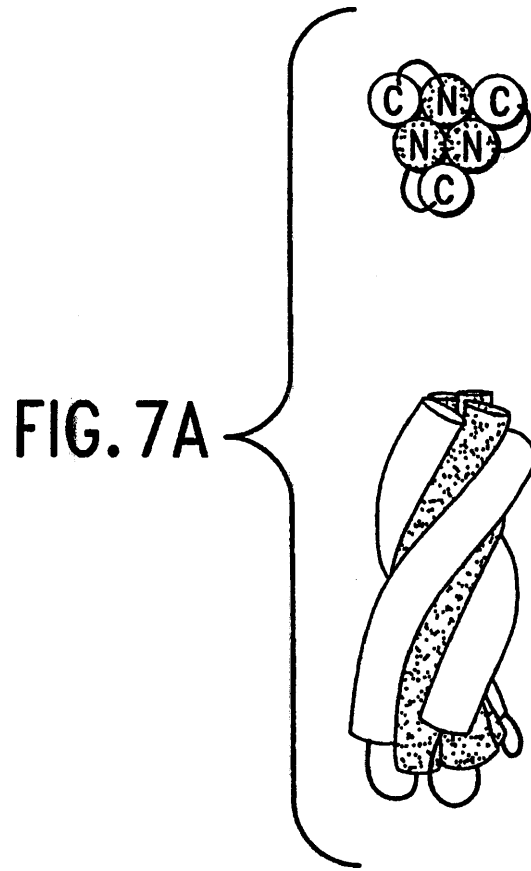


FIG.6B

【図7A】



【図7B】

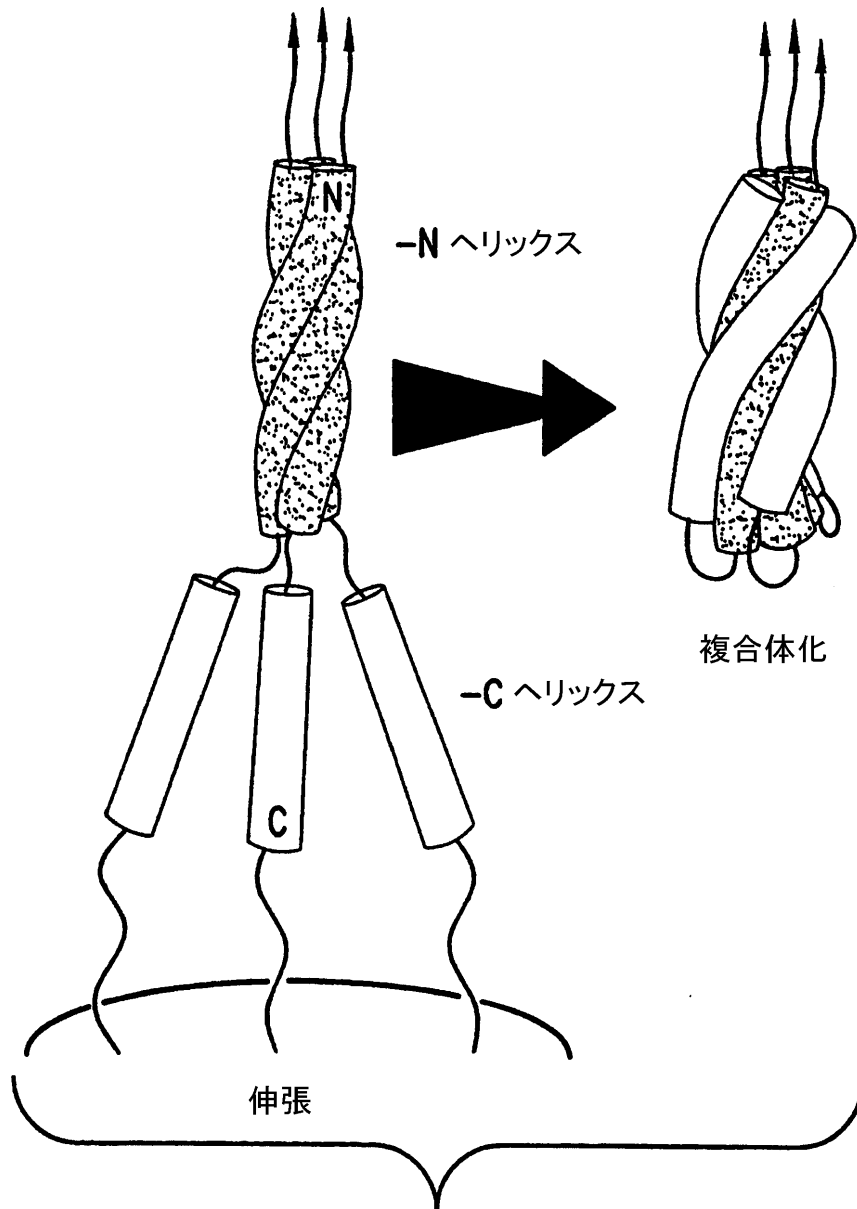


FIG. 7B

【図8】

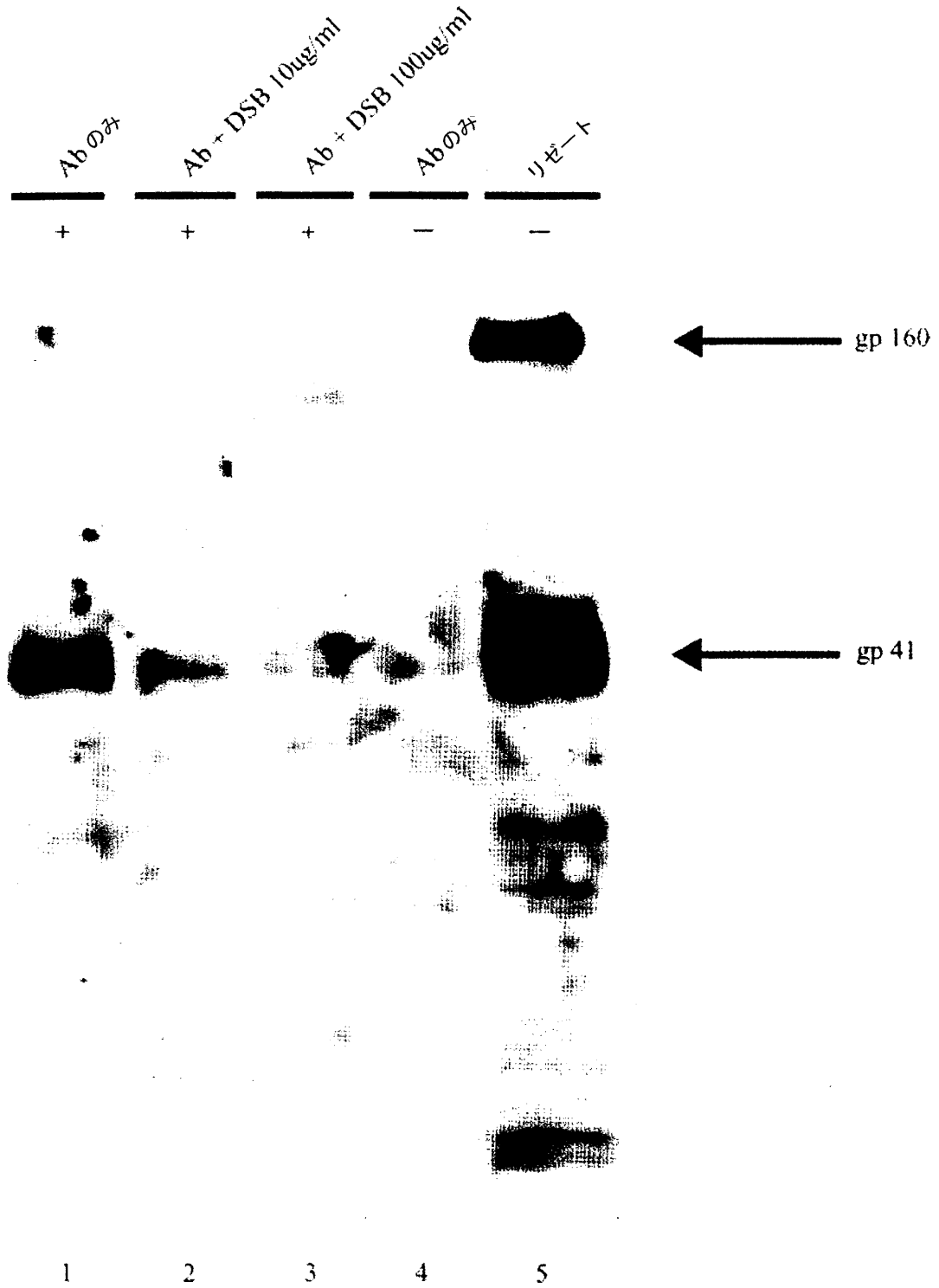


FIG.8

【図9】

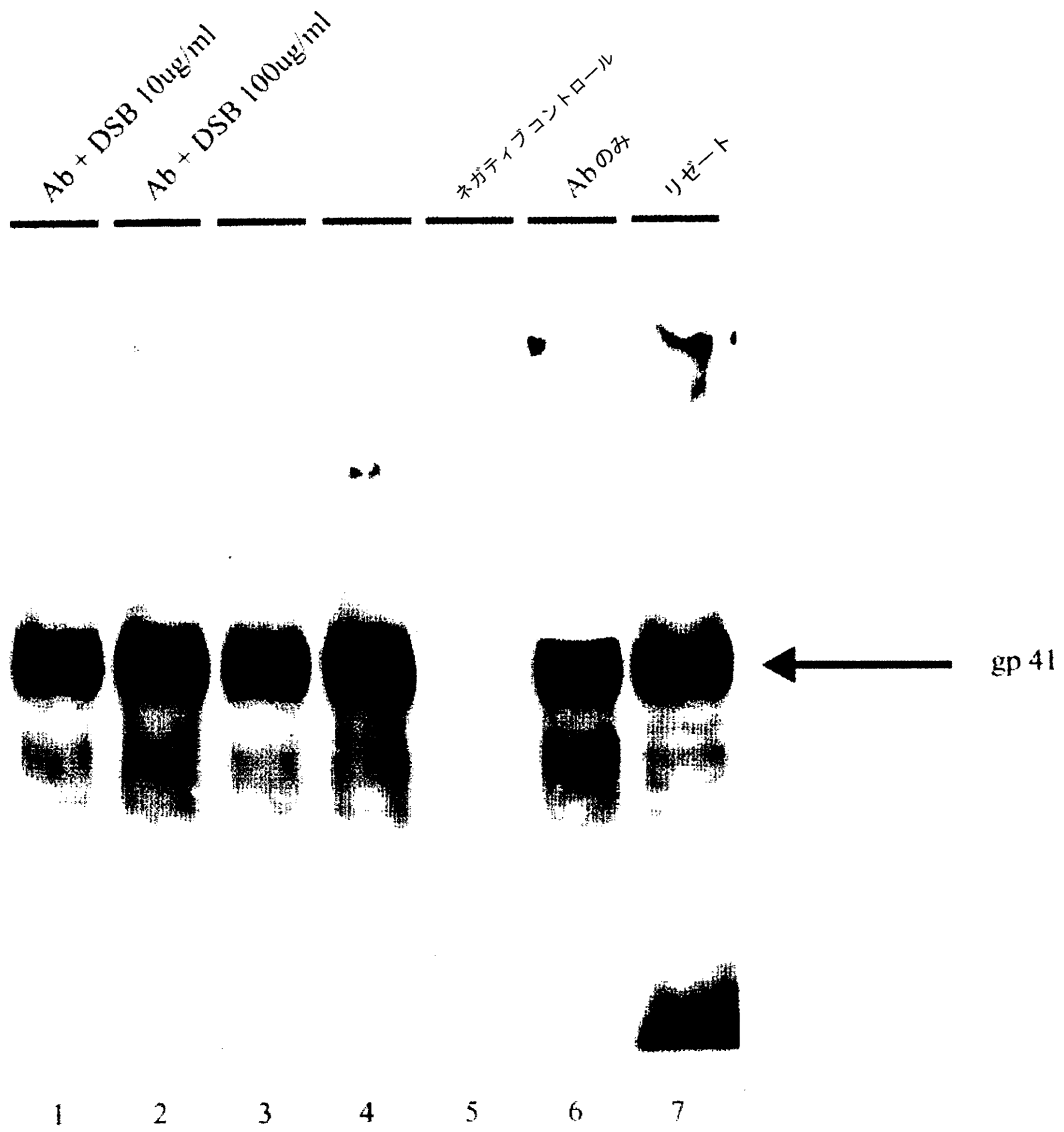


FIG.9

【手続補正書】

【提出日】平成14年11月21日(2002.11.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

g p 4 1 配列 E L D K W A S (配列番号 7 8) を示す単離株から得られた 2 F 5 モノクローナル抗体は、g p 4 1 を標的とする中和抗体である (Muster, T., et al., J. Virol. 67 : 6642-6647 (1993), and Muster, T., et al., J. Virol. 68 : 4031-4034 (1994))。この抗体は、H I V - 1 単離株に 7 2 % に保存されているエピトープである g p 4 1 の外部ドメインの線状アミノ酸配列 Glu - L e u - A s p - L y s - T r p - A l a (E L D K W A (配列番号 7 9)) に位置付けられる。この抗体は線状の決定因子をマップしているが、競合実験では 2 F 5 エピトープは、自然状態では立体構造であると示唆される。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

これらのコンジュゲートは、好ましくは、侵入関連構造に対応するまたはこれを模倣する構造に折り畳まれそして構築される。形成され得る新規な構築物またはコンジュゲートの例としては、以下が挙げられる (N - 末端から C - 末端へ読まれる) :

(1) P - 1 7 - リンカー - P - 1 8 からなる 3 直列反復ユニット

(P - 1 7 - リンカー - P - 1 8 - リンカー - P - 1 7 - リンカー - P - 1 8 - リンカー - P - 1 7 - リンカー - P - 1 8)、

- (2) P - 17 - リンカー - P - 18 - リンカー - P - 17、
 (3) P - 18 - リンカー - P - 17 - リンカー - P - 18、
 (4) P - 18 - リンカー - P - 17、
 (5) P - 15 - リンカー - P - 16 から構成される3直列反復ユニット (P - 15 - リンカー - P - 16 - リンカー - P - 15 - リンカー - P - 16 - リンカー - P - 15 - リンカー - P - 16)、
 (6) P - 15 - リンカー - P - 16 - リンカー - P - 15、
 (7) P - 16 - リンカー - P - 15 - リンカー - P - 16、
 (8) P - 16 - リンカー - P - 15、および
 (9) P - 15 - リンカー - P - 16

ここで、各リンカーは、同一でも異なってもよい、約2～約25アミノ酸、好ましくは2～約16アミノ酸残基のアミノ酸配列である。好ましいアミノ酸残基としては、グリシンおよびセリン、例えば (G G G G S)_x (配列番号7) (ここで、xは、1、2、3、4または5である) が挙げられる。任意の記載された構築物において、P - 15とP - 17は互換可能であり、P - 16とP - 18は互換可能である。そのような構築物の例を、その構築物の組換え発現に使用される対応する核酸配列とともにFIG. 7に示す。

【手続補正3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0118

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0118】

他のウイルス由来の融合活性領域に由来する有用なペプチドとして以下のペプチドが挙げられる。

RSVに関して：

【化36】

GEPINFDYDPLVFPSDEFDASISQVHEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGK
STT (配列番号 75)

H P I V 3 に関して :

【化37】

YTPNDITLNNVALDPIDISIELNKAKSDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNW
HQSSTT (配列番号 76)

麻疹ウイルスに関して :

【化38】

PDAVYLHRIDLGPISLERLDVGTNLNAIAKLEDAKELLESSDQILRSMK
(配列番号 77)

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0123

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0123】

本発明に有用なペプチドおよびコンジュゲートは、全長ペプチド、アナログおよび/またはホモロークのアミノ酸欠失を含んでいてもよい。そのような欠失は、全長ペプチド配列からの1またはそれ以上のアミノ酸の削除からなり、得られるペプチドの下限の長さは4~6アミノ酸である。そのような欠失は、ペプチド配列のうちの1つの連続した部分または1つより多くの分離した部分を含んでいてもよい。

その他の有用な抗体を以下に記載する :

g p 4 1 を標的とする唯一の広範に中和する抗体である 2 F 5 モノクローナル抗体。この抗体は、H I V - 1 単離株の 7 2 % が保存されているエピトープである、A I D S g p 4 1 から得られる外ドメインの線状アミノ酸配列 Glu - Leu - A

sp - Lys - Trp - Ala (E L D K W A : 配列番号 7 9) に位置付けられ ;
融合活性型の gp 4 1 における 6 個ヘリックス束に結合することが示されている
モノクローナル抗体、NC - 1、は、N - および C - ヘリックスドメインを形作る
ペプチドの混合物で免疫したマウスから産生させクローニングした。NC - 1
は、ヘリックスコアドメインおよび gp 4 1 のオリゴマー形態の両方に特異的に
結合する。この立体構造に依存する反応性は、gp 4 1 の N 末端コイルドコイル
領域内での、gp 4 1 コアの形成を阻害するポイントミューテーションにより
劇的に減少する。NC - 1 は、可溶性 CD 4 の存在下でのみ、HIV - 1 感染細胞
の表面に結合する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 01/04030
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G0IN33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G0IN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JIANG: JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 80, 1999, pages 85-96, KP002172034 abstract page 86, right-hand column, last paragraph; figure 1B page 88, right-hand column, last paragraph -page 89, left-hand column, paragraph 1 page 89, right-hand column, last paragraph -page 90, left-hand column, paragraph 1 --- -/--	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 July 2001		Date of mailing of the international search report 22/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Luis Alves, D

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/04030

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FERRER: NAT STRUCT BIOL, vol. 6, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 953-60, XP001008035	1,5,9-16
Y	abstract page 953, paragraph 1 -page 954, right-hand column, paragraph 1 page 956, left-hand column, last paragraph -page 959, last paragraph ---	2-4,6-8, 17,18
X	RYU: MOL CELLS, vol. 8, no. 6, 31 December 1998 (1998-12-31), pages 717-23, XP001007287	1,5,9-16
Y	abstract page 717, left-hand column, paragraph 1 -page 718, left-hand column, paragraph 2 page 720, left-hand column, paragraph 2 -page 721, left-hand column, paragraph 1 page 722, left-hand column, paragraph 2 - last paragraph ---	2-4,6-8, 17,18
X	ECKERT D M ET AL: "INHIBITING HIV-1 ENTRY: DISCOVERY OF D-PEPTIDE INHIBITORS THAT TARGET THE GP41 COILED-COIL POCKET" CELL,CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA,US, vol. 99, no. 1, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 103-115, XP000982264 ISSN: 0092-8674	1,5,9-16
Y	abstract page 103, left-hand column, paragraph 1 -page 104, right-hand column, paragraph 3 page 106, right-hand column, paragraph 2 -page 107, left-hand column, paragraph 4 page 112, right-hand column, last paragraph -page 113, left-hand column, paragraph 1 --- -/--	2-4,6-8, 17,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No P./US 01/04030
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>JIANG SHIBO ET AL: "A conformation-specific monoclonal antibody reacting with fusion-active gp41 from the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 72, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 10213-10217, XP002170629 ISSN: 0022-538X abstract figure 1A page 10213, right-hand column, last paragraph -page 10214, right-hand column, paragraph 1 page 10216, left-hand column, last paragraph -page 10217, left-hand column, paragraph 1</p>	2-4, 6-8, 17, 18
P, Y	<p>--- CHEN: AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 16, no. 18, 10 December 2000 (2000-12-10), pages 2037-2041, XP002172035 abstract</p>	2-4, 6-8, 17, 18
A	<p>--- DONZELLA G ET AL: "AMD3100, A SMALL MOLECULE INHIBITOR OF HIV-1 ENTRY VIA THE CXCR4 CO-RECEPTOR" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 4, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 72-77, XP002932484 ISSN: 1078-8956 abstract page 73, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 2 page 74, right-hand column, paragraph 2 -page 76, left-hand column, paragraph 2</p>	1-16

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 グラハム・ピー・オーラウェイ
アメリカ合衆国20878メリーランド州ダー
ンズタウン、ホワイト・ウォーター・ウェ
イ14205番

Fターム(参考) 2G045 AA40 CB21 DA44 FB03
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ10 QQ20
QQ79 QR48 QR51 QS03 QS33

专利名称(译)	检测病毒融合抑制剂的分子		
公开(公告)号	JP2003522948A	公开(公告)日	2003-07-29
申请号	JP2001558736	申请日	2001-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	帕那科斯制药公司		
申请(专利权)人(译)	Panakosu制药公司		
[标]发明人	カールティワイルド グラハムピーオーラウェイ		
发明人	カール・ティ・ワイルド グラハム・ピー・オーラウェイ		
IPC分类号	C12Q1/70 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5047 G01N33/5008 G01N33/5091 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N2333/162 Y10S977/927 Y10S977/959		
FI分类号	G01N33/569.ZNA.H G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.V C12Q1/70		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB21 2G045/DA44 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ10 4B063/QQ20 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QS03 4B063/QS33		
优先权	60/181543 2000-02-10 US 60/235901 2000-09-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了通过预防或破坏与这些细胞进行病毒融合所需的病毒膜蛋白的构象变化来鉴定抑制或预防包膜病毒如HIV-1感染细胞的化合物的方法，以及它涉及通过这种鉴定方法发现的化合物。本发明进一步包括使用这些分析方法作为诊断测定法，以检测抑制被病毒感染的人的病毒进入过程的抗体。

