

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-5706

(P2009-5706A)

(43) 公開日 平成21年1月15日(2009.1.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08	4 B O 6 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-181260 (P2008-181260)	(71) 出願人	503421597
(22) 出願日	平成20年7月11日 (2008.7.11)		マリンクロット ベテリナリー, アイエヌ
(62) 分割の表示	特願平6-503919の分割		シー.,
原出願日	平成5年7月15日 (1993.7.15)		アメリカ合衆国 イリノイ州 60060
(31) 優先権主張番号	9215232.1		マンデレイン, イースト ホーリー
(32) 優先日	平成4年7月17日 (1992.7.17)		ストリート 421
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100081994
			弁理士 鈴木 俊一郎
		(72) 発明者	オステルハウス, アルバートス ドミニカ
			ス マルセリヌス エラスムス
			オランダ 3981 シーエイチ バンニ
			ック ディーアール, プリヴィーストラ
			ート 16
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗-ネコ免疫不全ウイルス (F I V) ワクチン

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、およびネコおよび子ネコをFIV感染から保護するのに使用するためのワクチンを提供する。

【解決手段】FIVエンベロープタンパク質の残基483~567をコードするFIVenv遺伝子の領域の全部または一部に実質的に対応するヌクレオチド配列、またはこのような配列の何れかと実質的に相同性の変性配列または前記配列の何れかとハイブリッド化する配列を含有する核酸分子、あるいはFIVに対するワクチンおよび前記核酸分子によってコードされる合成ポリペプチドの製造におけるその使用。

【選択図】 図3

F/G. 3

位置	540	550	560
19k1	M S D L P T N W G Y M K C N C T X D T S N N H T I K M E C P E E K		
19k1seq			
19k32			

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

FIVエンベロープタンパク質のアミノ酸残基 549～567をコードするFIV env 遺伝子の領域に対応するヌクレオチド配列、あるいは宿主中に中和抗体を産生できる配列をコードする該配列と80%より高い配列同一性を有する配列を含む、FIV防除組成物の調製に使用される核酸分子。

【請求項 2】

FIVエンベロープタンパク質のアミノ酸残基 549～567をコードする FIV env 遺伝子の領域に対応する配列からなる第一ヌクレオチド配列、あるいはFIVに対する中和抗体を産生できるポリペプチドをコードする該配列と80%より高い配列同一性を有する配列を、該第一ヌクレオチド配列の側部にある1つの付加的ヌクレオチド配列とともに含み、該付加的ヌクレオチド配列が150個以下の塩基からなるものである核酸分子。

10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載されたヌクレオチド配列の、FIV防除組成物を調製する際ににおける使用の方法。

【請求項 4】

アミノ酸残基 549～567 にわたるFIV エンベロープタンパク質の領域に対応するアミノ酸配列、あるいは80%を超える残基が該配列と同一であるか、または同様の特性を有する残基であり、かつFIV防除の生成物であるアミノ酸配列から実質的になる合成ポリペプチド。

20

【請求項 5】

前記アミノ酸配列に融合した付加的ポリペプチドを含む融合タンパク質の形態であるか、あるいは担体タンパク質またはポリペプチドに連結した、請求項 4 に記載の合成ポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 4 または 5 に記載の合成ポリペプチドの、FIV 防除組成物を調製する際ににおける使用の方法。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載の核酸分子を含む発現ベクターまたはクローニングベクター。

【請求項 8】

請求項 1 または 2 に記載の核酸分子を含む、形質転換またはトランスフェクトされた原核性または真核性の宿主細胞。

30

【請求項 9】

請求項 8 に記載の宿主細胞を上記の合成ポリペプチドが発現される条件下で培養し、次いで産生された該合成ポリペプチドを回収することを含む、合成ポリペプチドの製造方法。

【請求項 10】

挿入されたヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドに対する免疫応答を刺激するために、請求項 4 もしくは 5 に記載のポリペプチド、請求項 7 に記載の発現ベクター、または請求項 8 に記載の宿主細胞を、必要に応じ、1つ以上のアジュバントおよび薬理的に許容される担体または希釈剤とともに含む、FIV 防除用組成物。

40

【請求項 11】

請求項 10 に記載の組成物を FIV-感染した、非ヒト動物に投与することからなる、FIV の防除方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、およびネコおよび子ネコをFIV感染から保護するのに使用するためのワクチンの開発に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

FIVは近年発見されたt - リンパ崇高精鍊値ウイルスであり、これはネコに感染してAIDS - 様症候群を引き起こす。FIVは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)と形態学的にも病理学的にも類似性を示すが、抗原的には異なることが示されている (Pederson et al., Science 235: 790-793, 1987)。感染したネコおよび子ネコは、一般的には中間的症候 (例えば、リンパ節疾患、白血球減少症、貧血症および二次的な通性感染症) を伴う衰弱性のAIDS - 様疾患を示し、最終的には死に至る。

【 0 0 0 3 】

伝染病学的研究は、FIV感染が全世界的に拡大していることを示しており、この病気は獣医学的見地から、急速に、著しい臨床的重要性を得ている。このため、近年、FIVに対するワクチンの開発に関する努力が開始されており、固定感染細胞全体または不活性化ウイルス全体に基づくワクチンの予備的結果は有望ではあるが (Yamamoto et al., AIDS research and human retroviruses, 7(11):911- 922, 1991)、サブユニットワクチンまたはペプチドに基づくワクチンを用いてネコをFIV感染に対して首尾よく免疫する方法は、未だ文献に報告されていない。現在のところ、市販のワクチン入手することはできない。

【 0 0 0 4 】

いたるところに存在しているにもかかわらず、FIVがネコからヒトに伝播しうとは思われない。それにもかかわらず、FIVはゲノム組織、生物学的特性および付随する病理学的徴候 (例えばインビボおよびインビトロ両方でのCD4+ リンパ細胞の減衰、免疫機能の漸進的損失および通性感染) を伴う天然宿主での持続性感染の傾向について、HIVおよび他の哺乳類レンチウイルスの類似性を共有している。従って、FIVのような非ヒトレンチウイルスの実験的モデルの開発は、ヒトのHIV感染に対するワクチンおよび治療法の設計に寄与するであろう。

【 0 0 0 5 】

ゲノム組織およびヌクレオチド配列の観点から見たFIVの分子構造が研究されている (Talbot et al., PNAS, 86: 5743-5747, 1989) が、今までのところ、抗原的に重要な領域の同定については二三の報告しかなく、また中和ワクチンおよび薬物療法の開発に有用なエピトープを含むであろう特定領域については全く報告がない。複製能を有するFIVの分子クローンが近年入手できるようになった (Siebelink et al., J. Virol. 66(3):1091-1097, 1992)。分子クローニングおよび配列分析は、異なる地理的領域から得られたウイルス性単離物が異質であること (Morikawa et al., Virus Research, 21: 53-63, 1991) を示している一方で、同一の単離物から得られたクローン (Olmstead et al., Talbot et al., 上記) または同一のネコから直接エキスビボ (ex vivo) されたクローン (Siebelink et al., 上記) が高度に同質であることを示している。ヒトカウンターパート HIV-1中のゲノム多様性は、異なるHIV-1単離物の生物学的特性の多様性 (例えば感染細胞の細胞病理的变化、細胞指向性、ウイルス性複製およびウイルス中和) を反映しており、その結果、効果的なHIVワクチンおよび療法の調査において、多くの異なるアプローチを探究する必要がある、これには、例えば中和抗体またはオプソナイジング抗体、抗体媒介細胞毒性、補体媒介細胞崩壊、細胞毒性Tリンパ細胞、およびインターロイキンおよび他の免疫エフェクター分子の産生の効果、ならびにウイルスの排除においてそれらが果たす役割の効果についての探究が含まれる。現状の文献報告から明らかなように、この広範囲の研究の多くは、未だ商業的に有益であることを証明しなければならず、また効果的な市販のHIVワクチンの展望には程遠い。これに基づき、効果的なFIVワクチンおよび療法の研究には、同様の困難が予想される。

【 発明の開示 】

【 0 0 0 6 】

しかしながら我々は、FIVエンベロープタンパク質の特定領域が、中和抗体によるFIVの認識に重要であることを見出した。本発明によれば、可変部V4およびV5に位置するこれら特定領域が、ネコのFIV感染に対するワクチンの基礎として提案される。より詳しくは、我々は、FIVエンベロープタンパク質の残基483 ~ 567の中和部位を同定した。

【0007】

従って、本発明の一つの観点は、FIVを防除する（combatting）組成物（以下、FIV防除組成物ともいう）、好ましくは哺乳類等の動物におけるFIV感染に対するワクチン、即ちFIVに対する免疫応答を刺激するワクチン組成物の製造における、FIVエンベロープタンパク質の残基483～567をコードするFIV env遺伝子の領域の全部または一部を含むヌクレオチド配列、またはこのような配列の何れかと実質的に相同性の変性配列または前記配列の何れかとハイブリッド化する配列の使用を提供する。

【0008】

別の見地から見ると、本発明は、FIV防除組成物、好ましくは動物におけるFIV感染に対するワクチンの製造に使用するための、FIVエンベロープタンパク質の残基483～567をコードするFIV env遺伝子の領域の全部または一部を含むヌクレオチド配列、またはこのような配列の何れかと実質的に相同性の変性配列または前記配列の何れかとハイブリッド化する配列を含有する核酸分子を提供する。

10

【0009】

本発明の他の観点は、FIVエンベロープタンパク質の残基483～567をコードするFIV env遺伝子の領域の全部または一部に実質的に対応する第一ヌクレオチド配列、またはこのような配列の何れかと実質的に相同性の変性配列または前記配列の何れかとハイブリッド化する配列を、該第一ヌクレオチド配列の側部にある少なくとも1つの付加的ヌクレオチド配列とともに含み、該付加的ヌクレオチド配列が150以下の塩基、好ましくは100 eq以下、特に50以下の塩基を含む核酸分子を提供する。

20

【0010】

本発明に係る核酸分子は、単鎖または二重鎖DNA、cDNAまたはRNAであってよく、好都合には組み換え核酸分子、好ましくは組み換えDNA分子の形態をとってもよい。

本発明に係る核酸分子中の付加的な側部配列は、FIV env遺伝子自体から誘導されるものでもよく、FIV DNAの他の領域または異種源から誘導されるものでもよく、またコードしてもコードしなくてもよい。好ましい態様では、側部配列は1つ以上の制限部位を含んでいてもよい。

【0011】

上述したように、envコード領域中の変動は、FIVの異なる系統間あるいは抗原型間、地理的に異なる起源の単離物間で、あるいは同一宿主からの異なる単離物間でさえも起こり、そして、FIVエンベロープタンパク質の残基483～567をコードするFIV env遺伝子の領域中のこのような変異体（これらは、例えばFIVに対する免疫応答を刺激することにより、FIVを防除することができるような生成物として発現する）は、この発明の範囲に含まれる。異なるFIV単離物およびこれらの間の配列の相違は、例えば Rigby et al. により Journal of General Virology (1993), 74, 425-436 に記載されている。

30

【0012】

ここで用いられる「実質的に相同性」には、約60%以上、例えば70%または80%以上の配列相同性を有する配列、ならびに機能的に等価な対立変異体、および単一または多数の塩基の置換、付加および/または欠失により修飾された関連配列が含まれる。「機能的に等価」とは、免疫反応性ポリペプチド、例えば宿主により産生された中和抗体により認識されるポリペプチドをコードするか、またはFIVウイルスと戦いうるヌクレオチド配列を意味する。

40

【0013】

エンベロープタンパク質の残基483～567をコードするFIV env遺伝子の領域とハイブリッド化するか、あるいは任意の変性物、即ち先に定義したように実質的に相同の配列または機能的に等価な配列とハイブリッド化する配列の使用もまた、本発明の範囲に含まれる。

【0014】

ここで用いられる「ハイブリッド化」とは、非緊縮条件下（例えば、6 × SSC 0%ホルムアミド、室温）で結合し、低緊縮条件下（例えば2 × SSC、室温、好ましくは2 × SSC、

50

42) または高緊縮条件下 (例えば $2 \times \text{SSC}$ 65) (ここで $\text{SSC} = 0.15 \text{ M NaCl}$ 、 0.015 M クエン酸ナトリウム、 $\text{pH } 7.2$) で洗浄した配列と定義される。一般的に言って、高緊縮条件下でハイブリッド化する配列は、コードの縮退を起こさないが高緊縮条件下でハイブリッド化する配列と同様に、本発明の範囲に含まれる。

【0015】

このような誘導関連配列を製造する方法、例えば部位指向性突然変異発生、ランダム突然変異発生、または核酸の酵素開裂および/または連結による方法は当業界で公知であり、このようにして修飾されたヌクレオチド配列が被験(subject)配列と有意な相同性を有するかどうかを、例えばハイブリッド化により決定する方法と同様である。

【0016】

従って、本発明に係るヌクレオチド配列の提供は、今まで入手できなかった、FIVエンベロープタンパク質の免疫学的に重要な領域の組み換えフラグメントを実質的な量で得ることを可能にし、これにより、抗-FIVワクチンおよび療法の開発を可能にする。

【0017】

従って、また別の観点によれば、本発明は、FIV防除組成物、好ましくはワクチン組成物を調製するために、FIVに対する中和抗体を産生できるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、エンベロープタンパク質の残基483~567をコードするFIV env遺伝子の領域からの1つ以上の抗原決定基をコードする領域を導入している配列を含む核酸分子の使用を提供する。

【0018】

本発明はまた、エンベロープタンパク質のアミノ酸残基483~567または他のFIVタンパク質の等価アミノ酸残基の全部または一部を含むエピトープを与える、ワクチンへの使用に好適なペプチドを提供する。これらアミノ酸は、ペプチドの抗原性に影響を与えない他のアミノ酸により置換されていてもよい。これらのペプチドは、生理的に許容される担体に接合された複合体として提供されてもよく、または担体配列を含んでいてもよい。

【0019】

本発明によれば、中和部位の同定、即ち宿主の中和抗体により認識されるエンベロープ糖タンパク質の一部をコードするFIV env遺伝子の領域の同定は、抗-FIVワクチンの開発に当たって極めて重要である。というのは、レトロウイルスになると、FIVは感染宿主細胞のゲノム内に統合する(integrate)ことができ、これが宿主の免疫システムを潜伏させ、および/または宿主の免疫システムからエスケープする(hide and/or escape)ことができるので、ウイルスが宿主細胞に感染する前に早急に中和することが望まれるからである。

【0020】

本発明によれば、エンベロープタンパク質の残基483~567の間の中和部位は、いわゆるFIV env遺伝子のエスケープ突然変異体を発生することにより同定された。このようなFIVの突然変異体は、宿主の中和抗体により認識される領域中の突然変異により、宿主の免疫応答をエスケープするかまたは回避する。エスケープ突然変異体は、多数のレンチウイルス(例えばVisnaウイルスNarayan et al., J. Virol. 32: 1045-1050参照)に関して記載されているが、FIVに関するエスケープ突然変異体は記載されておらず、またこれまで中和エピトープは同定されていない。

【0021】

上述したように、FIVの分子クローンが入手可能であり、このようなクローンのヌクレオチド配列が公表されている(例えば、Siebelink 1992 上記参照)。我々は、このようなクローンの1つ19kl (Siebelink, 上記)のエスケープ突然変異体を、このクローンに感染させた特異的な病原体なしの(specific pathogen free; SPF)ネコからの血清の存在下で、このクローンのウイルス子孫を培養することにより発生させた。このようなエスケープ突然変異体のエンベロープ遺伝子の配列を決定し、親クローンの配列と比較することにより、突然変異の領域、従って中和-耐性が現れた部位(中和部位)を同定することができる。FIV env遺伝子のV4およびV5可変部-コード部位、特にエンベロープタンパク

10

20

30

40

50

質の残基483～567をコードする領域中のエスケープ突然変異体もまた、本発明の別の態様を形成する。

【0022】

特に、以下に更に詳述するように、エスケープ突然変異体は、FIV env遺伝子の残基483および残基549～567において発生している。本発明によれば、これらの領域が好ましい。我々は理論的な考察と結び付けることを欲するものではないが、残基483～567にまたがるFIV envタンパク質の領域が1つ以上の抗原的に重要なエピトープ部位を含むか、またはこれに寄与しているであろうと信ずる。従って、直線状の連続したエピトープに加え、この領域中の重要なエピトープ（1つ以上）は不連続であることも可能であり、即ち、これらはタンパク質の異なる領域からのアミノ酸残基を含んでいてもよく、またこのようなエピトープは、FIV env遺伝子中の領域483～567により寄与されるアミノ酸残基、特に残基483および領域549～567中の他の残基を含んでいる。

10

【0023】

上記で定義したような本発明に係るヌクレオチド配列は、当業界において公知の適切な発現システム中で、残基483～567にまたがるエンベロープタンパク質の領域の全部または一部を含むFIVアミノ酸配列を含有する合成ポリペプチドとして、あるいは宿主の中和抗体により認識されるその機能的に等価な変異体として発現される。このような合成ポリペプチド、ならびに、これらの合成ポリペプチドを薬理的に許容される担体および/またはアジュバントとともに含むワクチン組成物は、本発明の更に別の態様を形成する。

20

【0024】

ポリペプチドアミノ酸配列に関連して上記で用いた「機能的に等価」とは、天然FIVエンベロープタンパク質に関連するか、またはこれから誘導されるポリペプチドであって、アミノ酸配列が単一または多数のアミノ酸の置換、付加または欠失により修飾されたもの、およびアミノ酸が化学的に、例えばグリコシル化または脱グリコシル化により修飾されてはいるが、免疫原活性または他のFIV- 防除活性を保持している配列、例えば宿主中の中和抗体を産生できる配列を定義している。

【0025】

このような機能的に等価な変異体、自然の生物学的変異体として発生させることができ、または公知の手法を用いて調製することができ、例えば機能的に等価な組み換えポリペプチドは、部位指向性突然変異発生、ランダム突然変異発生、またはアミノ酸の酵素開裂および/または連結による方法等の公知の手法により調製することができる。ここで用いられる用語「ポリペプチド」は、長鎖ポリペプチドおよび短鎖ペプチド配列の両方を定義する。

30

【0026】

上記したように、アミノ酸配列を修飾して機能的に等価な変異体配列を得ることは、ポリペプチドの免疫原性が影響を受けない限りにおいて、アミノ酸置換により行なうことができる。従って、例えばアミノ酸を、ポリペプチドまたはそのエピトープ（1つ以上）の物理化学的性質、例えば電荷密度、親水性/疎水性、サイズ、立体配置を保存し、このため免疫学的構造を保持する他のアミノ酸で置換することができる。例えば、AをGで、またはその逆に置換してもよく、VをA、LまたはGで；KをRで；SをTで、またはその逆に；EをDで、またはその逆に；そしてQをNで、またはその逆に置換してもよい。一般的に、置換するアミノ酸は、置換されるアミノ酸と同様の特性、例えば疎水性、親水性、電気陰性度、嵩高な側鎖等を有する。

40

【0027】

「付加」変異体には、例えば300以下、200または100の残基のアミノ酸配列の挿入によるアミノ末端および/またはカルボキシル末端の融合物、ならびに1つ以上のアミノ酸の配列内挿入物が含まれる。付加されたアミノ酸配列は、他の変異体または他のアミノ酸のFIVエンベロープタンパク質、例えば他のポリペプチドまたはタンパク質の全部または一部における対応する位置に存在するものであってよい。より長いペプチドは、1つ以上のポリペプチド配列の多数のコピーを含んでいてもよい。あるいは、ポリペプチドの多数の

50

コピー（例えば5～20、好ましくは8～15）を、例えばTamによりPNAS 85: 5400-5413, 1989に記載されたようにしてポリアミノ酸骨格、例えばポリリジン骨格に連結して、いわゆる多抗原ペプチド（MAPs）を形成することができる。

【0028】

挿入アミノ酸配列変異体は、タンパク質の所定部位に1つ以上のアミノ酸残基が導入されているものであるが、得られる生成物の適切なスクリーニングにより、ランダム挿入も可能である。欠失変異体は、配列からの1つ以上のアミノ酸の除去により特徴づけられる。好ましくは欠失または挿入は、隣接した対、例えば2つの残基の欠失または2つの分子の挿入で行なわれる。全ての場合において、修飾はポリペプチドの免疫原性を保持することが条件である。従って、機能的に等価な変異体ポリペプチドの例としては、少なくとも

10

【0029】

場合によっては、自然には発生しないものであれば、例えば特定の担体結合を可能にするか、あるいはジスルフィド結合を許容するために、ポリペプチドの末端に1つ以上のシステイン残基を挿入することが好都合である——これは、ポリペプチドがタンパク質表面に現れるような抗原性ループを模造するのを可能にし、これによりその免疫原性が向上するので望ましいであろう。また、免疫原性の向上、またはリボゾーム、ノボゾームおよびSCOMS等の輸送ビヒクル中への導入を促進するために、脂肪酸または疎水性テイルをペプチドに加えてもよい (Reid, Vaccine 10: 597-601, 1992)。

20

【0030】

本発明の合成ポリペプチドのアミノ酸残基は、特に分子末端において化学的に修飾されていてもよく、また、例えばアミノ酸のエステルまたはアミドの形態をとってもよい。従って、N-またはC-末端残基、例えばN-またはC-末端システイン残基、特にC-末端システイン残基は、アセトアミドあるいは他の保護基により化学的に封鎖または保護されていてもよい。広い範囲にわたる封鎖基が当業界において知られており、例えばスルホネート、カルボキシメチル、カルボキサミドメチル、アミノエチルおよび類似の基を用いることができる。

30

【0031】

免疫原的に活性な連結体を生成するために、ポリペプチドを担体と結合させてもよい。好適な生理的に許容される担体であれば何れも使用でき、例えば、ウシ血清アルブミン、チログロブリン、オバルブミンあるいは鍵穴カサガイ(keyhole limpet) ヘモシアニン等のタンパク質が挙げられる。近年、ある意味でフィリオン(virion)に類似した微粒子構造の表面上に、ウイルス性ペプチドの多くのコピーが出現する概念が注目を集めている。これは、例えばポリオウイルスでのウイルス/ペプチドキメラを製造することによって、あるいはそれ自体が自然に集合して粒子になるタンパク質、例えばB型肝炎表面ウイルス、酵母からのTyタンパク質または肝炎ウイルスからのコアタンパク質(HBcAg)にペプチドを結合することによって行なうことができる。またポリペプチドを他のFIVタンパク質

40

【0032】

この手法でペプチドに担体配列を結合させるよりはむしろ、それ自体が好適な担体配列を組み込んでいるポリペプチドを製造することができ、即ち、以下に詳述するように、本発明の合成ポリペプチド(1つ以上)を含むか、または異種起源の担体配列に結合したこのようなポリペプチドを組み込んでいる長鎖配列を含む融合タンパク質として製造できる。このような担体タンパク質は、一般的には、得られる生成物が生理的に許容されるように選択される。

【0033】

50

合成ポリペプチドの免疫原性を増強するために行いうる他の修飾法としては、FIVヘルパーT-細胞エпитープを含む長鎖アミノ酸配列の導入、またはこれとの結合が挙げられる。これに関しては特に、ヘルパーT-細胞エпитープを含み、従って高度に免疫原的な様式の抗原出現と、ヘルパーT-細胞エпитープの存在という2つの利点を有するHBcAgのような微粒子担体タンパク質が挙げられる。このような修飾、ならびに抗原出現および/または免疫系への輸送を向上する他の手法(上述したものを含む)は、当業界で公知であり、FrancisによりVaccine s Eds. Gregoriadis et al, Plenum Press, New York, p 13-23, 1991;Sci. Pro gress 74: 115-130, 1990に、および Francis & Clarke によりMeth. Enzymol., 178: 659-676, 1989に記載され、概説されている。

【0034】

10

本発明の合成ポリペプチドは、酸付加塩のような薬理的または生理的に許容される塩として存在していてもよい。これは、有機塩および無機塩の両方を包含し、例えば塩酸、フッ化水素酸、硫酸、スルホン酸、酒石酸、フマル酸、臭酸、グリコール酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸、コハク酸、酢酸、硝酸、安息香酸、アスコルビン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼン-スルホン酸、ナフタレンスルホン酸、プロピオン酸等の酸から調製されるものを含む。酸付加塩は、塩酸、酢酸またはコハク酸から調製されるものが好ましい。このような塩は、当業者に公知の従来法により調製できる。あるいはペプチドは、カルボン酸塩、例えばアンモニウム塩、またはアルカリ金属塩、例えばナトリウム、カリウム、リチウムの塩に変えることができる。

【0035】

20

上述したように、本発明の合成FIVポリペプチドは、動物のFIV感染を防除するため、および好ましくはFIVに対する宿主免疫応答を刺激するために使用できる。このような免疫応答は、FIV感染から宿主を保護し、および/またはウイルスを殺すかまたは阻害するための体液性-および/または細胞性-媒介免疫の両方の要素からなっていてよく、従ってウイルスにダメージを与え、阻害し、または殺す免疫エフェクター分子、抗体または細胞の発生を包含する。一般に、このような宿主-保護免疫応答は、ウイルスを中和できる抗体の産生により明示されるであろう。

【0036】

本発明の合成FIVポリペプチドは、ウイルスの成長または持続を阻害する中和抗体を産生することにより、その宿主保護効果を発揮することができる。モノまたはポリクローナルであってもよいこのような中和抗体は、これらを含むワクチン、およびFIV感染に対し宿主を受動的に免疫するワクチン組成物の調製におけるその使用として、本発明のさらなる態様を形成する。モノまたはポリクローナル抗体を得る手法は、当業界において公知である。

30

【0037】

従ってまた別の観点からすると、本発明は、FIV防除組成物、好ましくは動物におけるFIVに対する免疫応答を刺激するワクチン組成物の調製のために、FIVエンペローブタンパク質の残基483~567にわたる領域の全部または一部に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその機能的に等価な変異体を使用すること、ならびにFIV防除組成物、好ましくは動物におけるFIVに対する免疫応答を刺激するためのワクチン組成物の調製に用いられる上記定義のポリペプチドを提供する。

40

【0038】

本発明のこの態様に係る合成ポリペプチドは、上記で広く規定したようなヌクレオチド配列を含むし、発現制御配列に作動的に結合している組み換えDNA分子、またはこのような組み換えDNA分子を含む組み換えDNAクローニングベヒクルまたはベクターを含む宿主細胞中で発現させることによって調製できる。あるいはポリペプチドは、本発明に係るヌクレオチド配列を含む裸のDNA分子を宿主細胞中に直接注射することによっても発現することができる。好適な組み換えDNA 技術および発現技術は、例えば Sambrook et al., 1989 (Molecularcloning, a laboratory manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press) に記載されている。

50

【 0 0 3 9 】

このように発現されたポリペプチドは、本発明に係るFIVエンベロープタンパク質の残基483～567にわたる領域の全部または一部、およびそれに融合した組み換え分子のDNAによりコードされた付加的ポリペプチドからなる融合ポリペプチドであってよい。これは、例えばβ-ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、酵母Ty粒子、肝炎コア抗原または膜タンパク質の膜透過部、またはこの分野で融合タンパク質に一般的に採用されている任意の他のポリペプチドによることができる。

【 0 0 4 0 】

融合タンパク質の別の形態では、本発明の1つ以上の合成ポリペプチドが、別のタンパク質、例えば肝炎コア抗原、酵母Ty粒子またはインフルエンザウイルスヘモアグルトニン (haemagglutinin: HA) の1つ以上の抗原エпитープ、またはその一部で置換されているもよい。従って、本発明の他の態様は、本発明に係るヌクレオチド配列を含むDNAを含有するクローニングおよび発現ベクター、ならびにベクター核酸、例えばベクター DNA中に該ヌクレオチド配列を挿入することによる本発明の核酸分子の調製方法を包含する。このような発現ベクターは、例えば整合読み取り枠において本発明の核酸分子と結合している翻訳制御要素（例えば開始および終了コード）および転写制御要素（例えばプロモーター-オペレーター領域、リボゾーム結合部位、終止停止配列）のような適切な制御配列を有している。

【 0 0 4 1 】

本発明はまた、上記で定義した本発明に係るヌクレオチド配列を含む、形質転換またはトランスフェクトされた原核性または真核性の宿主細胞、または突然変異微生物、ならびに、上記で定義した核酸分子を含有する宿主細胞を、上記ポリペプチドが発現される条件下で培養し、生成されたこのようなポリペプチドを回収することによる本発明の合成ポリペプチドの調製方法を包含する。上述したように、好ましい核酸分子、ベクター、宿主細胞または微生物等は、FIVエンベロープタンパク質の残基483および549～567をコードする配列を含むものである。

【 0 0 4 2 】

本発明に係るクローニングおよび発現ベクターは、当業界で公知の技術に従って、プラスミド、ファージおよび組み換えウイルスを含有していてもよく、また種々の異なる発現システム、細胞など、例えばバクテリア性（例えばE. Coli）、酵母または哺乳類の発現システムにおいて発現することができる。本発明のFIVポリペプチドの適切なグリコシル化を起こすことを可能にするため、真核性システム、好ましくは哺乳類システム中での発現が好ましい。従って、本発明に係るポリペプチドは、例えばウイルスベクターでトランスフェクトされ、かつ本発明に係るFIVポリペプチドを構成的に発現しうる細胞系（例えばHelaまたはBHK）のような遺伝子工学的に処理された細胞系内で発現することができる。従って、例えば好適なウイルス性ベクターの典型としては、組み換えワクシニアウイルスが挙げられる。発現の簡便な方法としては、本発明に係る核酸分子を、プラスミドベクター中にワクシニアウイルスプロモーターの下流で挿入し、その側部にワクシニアチミジンキナーゼ(TK)配列を並べることができる。得られる組み換えベクターは、ワクシニアウイルスによりトランスフェクトされた細胞中に挿入される。相同性組み換えの結果として、ポリペプチドを発現するTK組み換えワクシニアウイルスが産生される。

【 0 0 4 3 】

本発明に係る好ましい発現システムとしては、バクテリア性システム、例えば E.coli およびSalmonella、酵母、ワクシニア、バクテリオファージおよび哺乳類細胞（例えばBHK細胞）のシステムが挙げられる。本発明に係る合成ポリペプチドはまた、公知のMerrifield固相合成法のような化学的手段により調製することもできる。本発明に係る核酸配列およびポリペプチドは、ワクチン製造の分野において公知の手法を用いるワクチン組成物の調製に使用することができる。

【 0 0 4 4 】

伝統的ワクチン製剤は、適切ならば、1種以上の好適なアジュバント、例えば水酸化

10

20

30

40

50

アルミニウム、ムラミルジペプチド、鉱物油または植物油、ノボゾーム、リボゾーム、サポニン、Quil-A、Q5-21、Matrix pluronicsとともに、あるいは1種以上の薬理的に許容される担体または希釈剤の存在下で、1種以上の本発明に係るポリペプチドを含んでいてよい。好ましい担体としては、液状媒体、例えば患者にポリペプチドを導入するためのビヒクルとして用いるのに適切な食塩溶液を挙げることができる。近年、免疫刺激性複合体 (ISCOMS - Morein et al., Nature, 308: 457-460, 1984) は、ワクチン調製のアジュバントとして特に効果的であることが見出されている。

【0045】

このようなワクチン組成物は、本発明の他の態様を形成する。従って、本発明はまた、FIVエンベロープタンパク質の残基483~567にわたる領域の全部または一部に対応するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、またはその機能的に等価な変異体の1つ以上を、必要に応じ、1つ以上のアジュバントおよび薬理的に許容される担体または希釈剤と一緒に含む、FIV防除組成物、好ましくは動物、殊に哺乳類のFIVに対する免疫応答を刺激するワクチン組成物、ならびに、上記のような組成物を動物に投与することからなるFIVを防除する方法、好ましくは動物におけるFIVに対する免疫応答を刺激するための方法を提供することが判る。

【0046】

本発明に係るワクチンを与える別の方法は、免疫原性ポリペプチドを動物内のその場で発現するように、問題のポリペプチドを発現することができる発現ベクターを動物に投与することである。免疫原性ポリペプチドのこのような「その場での(in situ)」発現は、動物の免疫システムに特に有望な様式で免疫原性を与えることが見出された。また、このように引き起こされた免疫応答は、もっと普通の技術を用いて生じた免疫応答に較べて、一般的に有意に改善されている。従って、本発明の別の態様は、挿入されたヌクレオチド配列によりコードされたポリペプチドに対する免疫応答を刺激するための、本発明に係るヌクレオチド配列が挿入されている発現ベクターまたは宿主細胞とともに、1つ以上の薬理的に許容される担体または希釈剤を含む、FIV防除組成物、好ましくは動物のFIVに対する免疫応答を刺激するワクチン組成物を提供する。

【0047】

このような用途に好適な発現ベクターは当業界で公知であり、特にウイルス性ベクター、殊にポックスウイルスベクターが挙げられる。特筆する価値のあるベクターには、例えばAda et al., Vaccine 8: 425-437, 1990に記載されているような、ワクシニアウイルス、家禽ポックスウイルス、カナリアウイルス、ネコ rhinotracheitis、ネコカリシウイルス、ネコ panleukopenia、アデノウイルスおよびバクテリア (例えばサルモネラ) が含まれる。特に有利には、融合タンパク質は、異種起源のタンパク質部分(「担体」)が膜透過性タンパク質 (例えばインフルエンザウイルスHA) の全部または一部を含むようなシステム中で発現することができる。このような組み換えウイルスに感染した真核性細胞中で発現する場合、融合タンパク質はグリコシル化されており、細胞表面に輸送され、この表面を通してそれが突き出し、これによって合成ポリペプチド (またはそのエピトープ) が細胞表面の外側に現れる。

【0048】

このようなシステム中で発現されたポリペプチドは、FIVエンベロープタンパク質の残基483~567の領域からの1つ以上の短鎖または長鎖ペプチド配列を含んでいてもよい。組成物、例えば本発明に係るワクチン組成物の投与は、任意の普通の経路で、例えば経口的または非経口的に、例えば筋肉内または皮内注射、特に皮下注射により、必要に応じ間隔を置いて、例えば7~42日間隔で2度注射することによって行うことができる。典型的には、ポリペプチドは1投与当たり1~1000 µg、好ましくは1投与当たり2~100 µgの量で投与される。

【0049】

以下の非限定的実施例によって、本発明を更に詳細に説明する。

【実施例】

【 0 0 5 0 】

実施例 1

材料および方法

ウイルス . 複製可能な分子クローン19k1および19k32のウイルス子孫、および生物学的単離物FIV A'dam 19は、先に説明したようにして得られた(Siebelink e t al.1992、上記)。手短にいうと、分子クローン19k1および19k32は、A'dam 19 と名付けた自然FIV感染ネコの骨髓細胞からのDNAから、直接に単離された。これらの分子クローンのDNAを、Crande IIネコ腎臓 (CrFK) 細胞中にトランスフェクトした。この培養物を、SPFネコの末梢血単核細胞 (PBMC) で刺激して、ConAおよびI Lとともに培養することによって、ウイルスの産生を持続させた。72時間後、ペニシリン (100 IU/ml)、ストレプトマイシン (100 μg/ml)、L-グルタミン (2mM)、β-メルカプトエタノール (2 x 10⁻⁵) およびI L (100 IU/ml) を補充したRPM I 1640 (Gibco) (以下、培地(C M)という) 中で、PBMCを別個に培養した。これらの培養物中にFIV抗原が検出されたとき、上澄み液を200 nmフィルターで濾過し、アリコートとして-135 で保存した。生物学的単離物FIV A'dam 19は、ネコ A'dam 19のPBMCを 8 ConA で3日間刺激することによって得られ、I L 100IU/mlの存在下に更に培養した。FIV抗原が上澄み液中に検出されたとき、培養物上澄み液を濾過し、アリコートとして-135 で保存した。クローン 19k1のウイルス子孫 (FIV 19k1) を、102の50%組織培養物感染投与量で腹腔内に接種することにより、10週令のSPFネコ (Cat No.14) を感染させた。このネコから、感染 (p.i.) 後2週目および3 2週目に、前記のようにしてウイルスを再単離し、それぞれFIV 19k1 R2およびFIV 19k1 R32と名付けた。

血清 . 自然FIV感染ネコ A' dam 19の血清を、血清 A19と名付けた(Siebelin k,1992、上記参照)。ネコ14の血清は、感染に先立って採取し (プレ血清)、また感染後22週目に採取した (S14/22という)。非感染SPFネコの血清を、コントロール血清 (S-SPFという) として用いた。全ての血清は、使用前に56 で1時間熱不活性化した。

GagおよびEnv-特異的ELISA . FIVのエンベロープタンパク質に対する抗体の存在は、組み換えFIVエンベロープタンパク質ELISAにおいて、次のようにして検出した。即ち、env遺伝子を発現する組み換えワクシニアウイルス (rVV) VGR657 (G. Rimmelzwaan et al. 免疫不全ウイルス研究に関する第1回国際会議、1991 年9月4~7日 U.C.Davisで開催) (または野生型ワクシニアウイルス) に感染させたRK13、BHKまたはHeLa細胞の細胞溶解物を、0.1M NaAc緩衝液pH 5.5中で50 μ lの体積として、ELISAプレート (CostarRIA/EIA、高結合性) 上に室温で16時間塗布した。次いでウェルを空にし、4%w/vパラホルムアルデヒドを用いて室温で1 0分間固定した。洗浄後、0.05 % Tween-80および10 % FCSを含有するPBSでプレートをブロックした。

【 0 0 5 1 】

マイクロタイタープレートを塗布してブロックした後、1:40または1:20の出発希釈度で、5 %NaClを補充したPBS-TB中で血清サンプルを2 倍連続希釈したもの5 0 μ lを添加した。次いでプレートを37 で1時間インキュベートした。続いて、ネコIgGに対するビオチン結合マウスMAB (Sigma, St Louis,USA)、またはHRP結合ヤギ抗-ネコ IgG抗原製剤 (Cappel CooperBiomedicals, Malvern, USA) を50 μ lの体積で加え、プレートを37 で1時間インキュベートした。HRP結合ストレプトアビジン (AmershamInternational UK) を、37 で30分間ビオチンに結合させた。これら各々をインキュベートした後、プレートをDWTで洗浄し、次いでテトラメチルベンジジン (TMB) を用いて次のようにして発色させた。即ち、0.1M N aAc緩衝液pH5.5中の0.1mg/ml TMBおよび0.003%H₂O₂からなる基質溶液100 μ l各ウェルに加えた。20 で10分間インキュベートした後、100 μ l体積の2MH₂SO₄を加えて発色反応を停止した。TitertekマルチスキャンでOD450値を測定した。力価は、コントロール抗原で塗布したプレート得られるバックグラウンド値の3 倍以上を示す希釈度の逆数として与えられる。Gagタンパク質に対する抗体は、市販のFIV p24/p17抗体ELISAを用いて、製造業者 (European Veterinary Laboratory, Amsterdam, The Netherland) が推奨するようにして検出した。

逆転写酵素アッセイ . 逆転写酵素 (R T) 活性は、先に説明したようにして測定した (S

iebelink, 1992、上記)。

ウイルス中和アッセイ．インビトロ培養による更なる突然変異を避けるために低継代ウイルスレベルを用いたため、かつ、ネコPBMCまたは胸腺細胞において成長する群落のウイルス力価 (Siebelink、上記) が低いため (約102)、ウイルスインプットをRT活性によって標準化した。生物学的単離物FIV A'dam 19、分子クローンFIV 19k1およびFIV 19k3 2、および再単離物FIV19k1R2およびFIV 19k1R32のウイルス群落を、RTアッセイで試験した。このアッセイのために、 5×10^4 CPM/mlのRT活性を含む希釈ウイルス群落450 μ lを、血清サンプル50 μ lとともに24ウェルプレート (Costar) 上で37 °Cで60分間インキュベートした。コンカナバリンA (ConA) — およびインターロイキン-2(IL-2) — で刺激したPBMCまたは胸腺細胞 (106) を加えた。37 °Cで60分後に細胞を洗浄し、それぞれの血清サンプル2%を補充したCM (RPMI 1640 [GIBCO]、ペニシリン [100 IU/ml]、ストレプトマイシン [100 μ g/ml]、L-グルタミン [2mM]、 β -メルカプトエタノール [2×10^{-5} M]、IL-2[100 IU/ml]) 中で14日間インキュベートした。RT活性は、ウイルス産生の尺度として測定した。ウイルス中和は、RT活性が、非感染細胞の平均RT活性として定義されるバックグラウンドの2倍以上に増加しなかった場合に、陽性と考えた。先の実験において、感染培養物のRT活性は、バックグラウンドの少なくとも5倍であること (示さない) が観察された。

エスケープ変異体の生成．ConAおよびIL2で刺激したSPFネコのPBMC (106) を、FIV 19k1で感染した。これを親クローンと名付ける。24時間後、培養物を2個の同じフラスコに分けて入れた。一方の培養物には2%の血清S14/22を加え、他方には2%のS-SPF (コントロール血清) を加えた。培養物を毎週収穫し、それぞれの血清2%を補充した新たなCMに交換し、RT活性の存在について試験した。培養物上澄み液中にバックグラウンド値の5倍以上のRT活性を測定できたとき、上澄み液を孔径220 nmのフィルターで濾過し、135 °Cで保存した。これらの培養物から誘導されたウイルスは、S14/22およびコントロール血清の存在下の培養物から誘導されたウイルスについて、それぞれ19k1Aおよび19k1Bと名付ける。 5×10^4 cpm/mlのRT活性を含有する19k1Aおよび19k1Bの培養物上澄み液の希釈物を、10%の血清サンプルS14/22またはコントロール血清とともに37 °Cで60分間インキュベートした。ConAおよびIL-2で刺激したSPFネコのPBMC (106) を、各培養物に加えた。37 °Cで60分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、それぞれの血清2%を補充したCM中で培養した。培養物上澄み液を、RT活性の存在について毎週2回試験した。RT活性を示すことができたとき、培養物上澄み液を孔径220 nmのフィルターで濾過し、-135 °Cで保存した。これらのウイルスは、S14/22またはコントロール血清 (S-SPF) の存在下で増殖した19k1Aについて、それぞれ19k1A.Aおよび19k1A.Bと名付け、S14/22およびコントロール血清の存在下で増殖した19k1Bについて、それぞれ19k1B.Aおよび19k1B.Bと名付けた。19k1A.Aは、更に19k1esc と名付けた。

配列分析．親クローン19k1のエンベロープ遺伝子の配列は、先に説明されている (Siebelink, 1992、上記)。エスケープ変異体19k1escのエンベロープ遺伝子を、PCRにより増幅した。培養物19k1escからのPBMC (105) をベレット化し、100 μ lのK-緩衝液 (50 mM KCl、10 mM Tris pH 8.4、1.5 mM MgCl₂、0.5% Tween-20および100 μ g/mlプロテイナーゼK) を用いて56 °Cで45分間溶解した。混合物を95 °Cで5分間インキュベートすることにより、反応を停止した。2つのオリゴヌクレオチドプライマーを設計した (プライマー1、5'-GGCGAATTCATGGCAGAAGGAT TTGTAGCC -3'; およびプライマー2、5'-TATGCATGCCATTCCTCCTCTTTTTCAGACATG CC -3')。これらのプライマーは、それぞれEcoR1およびSph1制限酵素開裂部位 (下線) を含んでおり、後続のpUC19へのクローン化が容易であった。PCR反応は、汚染を避けるために別の実験室で行なった。100 μ lの体積中に、10 μ lの細胞溶解物、50 mMのKCl 10 mM の Tris pH 8.4、1.5 mMのMgCl₂、0.02%のゼラチン、250 μ Mのデオキシヌクレオチド-トリリン酸、1 μ Mの各プライマーおよび2.5単位のTaqポリメラーゼを含んでいる。サンプルを100 μ lの鉱油で被覆して蒸発を避け、変性工程 (94 °Cで1分間)、プライマーアニール工程 (60 °Cで1分間) およびプライマー延長工程 (72 °Cで2分間) からなる35回の増幅サイクルを行なった。平行して、陰性コントロール (SPFネコからの非感染PBM

10

20

30

40

50

C)を増幅した。増幅生成物を、アガロースゲル電気泳動(0.8%)により、適切な大きさのDNAフラグメントの存在について分析した。PCR反応における過剰のプライマーを、Centric on-30マイクロ濃縮器(Amicon)を用いて除去した。DNAをEcoR1およびSph1で消化し、pUC19にクローン化した。エンベロープ遺伝子のジデオキシヌクレオチド連鎖集結反応(Sanger F. 1981. DNA中のヌクレオチド配列の決定。Science 214: 1205-1210)のために、サブクローンをを用いた。ヌクレオチドおよびタンパク質のアラインメントは、Lasergen eソフトウェア(DNAstar inc. London,UK)を用いて行なった。19k1escの観察されたヌクレオチドの変化は、Taqエラーを除外するために、独立したPCR増幅を用いて確認した。キメラクロンの生成。キメラクロンの構築の概要は、図1に示されている。制限マッピングにより、両方のFIVゲノム中において、共通かつ独特な内部Sph1部位が同定された。組み換えウイルスを生成するため、ラムダクロン19k1および19k32をSalIおよびSphIで消化した。消化後に生成したSalIおよびSph1フラグメントを、予めKpnI部位を削除しておいたpUC19プラスミドベクターにクローン化した。5'端反復配列(LTR)、gagおよびPolの5'部分を含むプラスミドを、5'サブクローンと名付けた。Polの3'部分、envおよび3'LTRを含むプラスミドを、3'サブクローンと名付け、これを用いてクロン19k1と19k32との間で、内部の1666塩基対(bp)KpnIフラグメントを交換した。同様に、クロン19k1の1662 bp KpnIフラグメントをpUC19にクローン化し、これを19k1の3'KKサブクローンと名付けた。位置1667または位置1668の何れかでの部位指向性突然変異発生によって、1つヌクレオチドが置換されたクロン19k1の144-bp NsiI - MstIIフラグメントと同様にして、19k1escエンベロープの144 bp NsiI - Mst2フラグメント(この章の配列分析参照)を交換した。部位指向性突然変異発生は、19k1の3'サブクローンにおけるPCRによって行なった。この目的のために、次の3つのオリゴヌクレオチドを設計した。プライマーI、5'-CCTTATTATGCATTTCAATATGACAAAAGCTG-3'は、NsiI部位(下線)を含み;プライマーmut1、5'-GCCTTTTTCCTCAGGACATTCATTTTATTGTGTGAGTATTG-3'は、Mst2部位(下線)および位置1678にT-to-G置換(太字)を含み;プライマーmut2、5'-GCCTTTTTCCTCAGGACATTCATTTGTATTG-3'は、Mst2部位(下線)および位置1668にT-to-G置換(太字)を含んでいた。2つのPCR反応を、両方の反応において5'末端から開始させるためにプライマーIを用いて行なった。一方の反応にはプライマーmut1を用いたが、他方の反応にはプライマーmut2を用い、3'末端から開始させた。PCR反応の条件は、この章の配列分析に記載されている。PCRフラグメントをNsiIおよびMst2で消化し、19k1の3'KKサブクローンにクローン化した。突然変異発生は配列分析によって確認された。

10

20

30

40

【0052】

144 bpのNsiIフラグメントとMst2フラグメントが交換されている3'KKサブクローンからの1662 bp KpnIフラグメントを、19k1の3'サブクローンにクローン化した。それぞれ25 μgの3'サブクローンと5'サブクローンを混合し、SphIで消化し、連結した。SalIでの消化後、これらの構築物を先に説明したようにして(Siebelink, 1992, 上記)、Crane IIネコ腎臓細胞(CrFK)にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、ConAおよびILで刺激したPBMCとともに3日間培養することによって、ウイルスの産生を建て直した。培養物を、PBMCのシンシチウムの形成および培養物上澄み液中のRT活性について監視した。RT活性を検出できたとき、培養物上澄み液を200nmフィルターで濾過し、アリコートとして-135℃で保存した。

結果

ネコの感染。クロン19k1のウイルス子孫での実験的感染において、ネコ14は、4週間以内に血清変換した。ELISAにより測定されたgag-特異的およびEnv-特異的血清抗体は、感染後8週間以内にプラトーに達した(表1)。ウイルスを、感染後(p.i.)2週目および32週目に再単離した(表1)。このネコからp.i.後22週目に採取した血清(血清S14/22)および2つのウイルス単離物(それぞれFIV 19k1R2およびFIV 19k1R32)を、この実施例で説明した実験に使用した。

【0053】

【表 1】

gag- および Env-特異的 ELISA により測定されたネコ 14 の抗-FIV 血清抗体応答、およびネコ 14 の FIV 19k1 感染後のウイルス単離物

p.i. 後の週	抗 体 応 答		ウイルスの単離
	(p24/p17)	(gp120)	
	gag	env	
	(逆 数 力 価)		
0	<50	<40	ND
2	<50	40	+
4	722	640	ND
6	902	>5120	ND
6	1031	>5120	ND
11	1186	>5120	ND
22	1079	>5120	ND
32	1036	>5120	+

OD₄₅₀ (x10⁻³) (450nm での光学密度)

ND: 測定されず。

【 0 0 5 4 】

ウイルス中和 ネコ14からp.i.後22週目に得られた血清 (S14/22) を、分子クローンFIV 19k1およびFIV 19k32のウイルス子孫、および生物学的単離物FIV A'd am 19、FIV 19k1R 2およびFIV 19K1R32に対する中和性抗体の存在について試験した。SPFネコの血清をコントロールとして用いた。その結果を表 2 に示す。

【 0 0 5 5 】

【表 2】

FIV 単離物、分子クローンおよび FIV 再単離物の血清 S14/22 および
SPF 血清によるウイルス中和

ウイルス	中 和 後 の R T 活 性 (cpm/ml) :	
	S14/22 血清	SPF 血清
FIV A' dam19	24219	61480
19k19	157	12333
19k32	26864	59187
FIV 19k1R2	82	58442
FIV 19k1R32	103	18145

10

20

【 0 0 5 6 】

R T 活性によって測定されたようなウイルスの生育は、コントロール血清の存在下の全ての培養物において実証することができた。ウイルスの複製もまた、S14/22の存在下の生物学的単離物FIV A'dam 19およびFIV 19K32の培養物において検出することができた。しかしながら、S14/22の存在下で培養したFIV 19K1、および再単離物FIV 19K1R2およびFIV 19K1R32の培養物で感染した培養物においては、ウイルスの複製は検出することができず、完全な中和を示した。タンパク質-A Sepharoseビーズに吸着させて抗体IgGを除去した血清S14/22は特に、分子クローン19k1を中和することができなかった。このことは、観察された中和活性が、血清免疫グロブリンのためであることを示している（表に示さない）。

30

エスケープ変異体の生成 . SPFネコからのFIV 19k1-感染PBMCを、S14/22の存在下に培養し（培養物A、19k1Aという）、またはコントロール血清の存在下に培養した（培養物B、19k1Bという）。17日以内に、培養物 19k1Bの上澄み液中にR T活性を測定することができた。44日間培養した後、培養物19k1AにもR T活性を測定することができた（図2A）。R T活性は培養時間の間上昇した。S14/22またはコントロール血清の存在下に52日間培養した非感染培養物においては、R T活性を実証することができなかった（データは示さない）。

40

【 0 0 5 7 】

感染後52日目に培養物19K1Aおよび19k1Bの上澄み液を集めて濾過した。これらの培養物上澄み液を血清S14/22またはコントロール血清とともに培養した。SPFネコからのConAおよびIL-2で刺激したPBMCを、ウイルス-血清混合物に添加し、更にそれぞれの血清、S14/22またはコントロール血清2%の存在下に培養した。これらの培養物は、S14/22またはコントロール血清の存在下で培養した19k1Aの培養物について、それぞれ19k1A.Aおよび19k1A.Bと名付け（図2B）、S14/22またはコントロール血清の存在下で培養した19k1Bの培養物について、それぞれ19k1B.Aおよび19k1B.Bと名付けた（図2C）。R T活性は、19k1Aの両方の培養物において、感染後17日目に実証することができた。19k1A.Aのウイルス複製の動力学は、コントロール19k1A.A（図2B）および19k1B.B（図2C）と同様であった。予想したとおり、培養物19k1B.Aではウイルスの複製は観察されなかった（図2C）。

50

これらの結果は、19k1A.Aが血清S14/22によるウイルス中和に耐性であることを示している。

配列分析 . 更に19k1escと名付けた19k1A.Aの細胞を溶解し、細胞DNA中に組み込んだFIV ゲノムのエンベロープ遺伝子をPCRによって増幅した。PCR生成物をEcoR1 およびSph1で消化し、PUC19にクローン化した。19k1escのエンベロープ遺伝子を配列決定し、親クローン19k1およびクローン19k32の配列と比較した(図3)。多可変部2(HV-2)中の位置468において、T-to-cのサイレント翻訳が観察された(図示しない)。HV-5中に、2つのA-to-cトランスポージョンが観察された。位置1667における一方のトランスポージョンは、AsnからThrへのアミノ酸置換を引き起こすが(アミノ酸の位置556)、位置1678における他方は、LysからGlnへのアミノ酸置換を引き起こす(アミノ酸の位置560)。クローン19k1と19k32とのエンベロープ遺伝子のヌクレオチド配列(これらは、S14/22を用いた中和アッセイにおいて19k1escと同じフェノタイプを示した)を比較すると、位置1665におけるT-to-Gトランスポージョンおよび位置1669におけるC-to-Tトランジションの存在が示され、その結果、それぞれAsnがLysで置換され(アミノ酸の位置555)、HisがTyrで置換された(アミノ酸の位置557)(図3)。

キメラクロンのウイルス中和 . 親クローン19k1、およびエンベロープ遺伝子が部分的に交換されているか、または1つのアミノ酸が部位指向性突然変異により置換されているクローン、およびエスケープ変異体19k1escのウイルス子孫を、C onAおよびIL-2で刺激した胸腺細胞で感染させる前に、血清S14/22またはSPFコントロール血清とともにインキュベートした。この実験の結果は、キメラクロンを血清S14/22での中和について別個に試験した前の多くの実験結果と同様である。感染後9日目、12日目および15日目に、RT活性を測定した。感染後9日目の全てのコントロール培養物においてRT活性を測定することができ、感染後12日間にわたり増加し続けた(図4)。予想したとおり、FIV 19k1は血清S14/22で中和され、SPFコントロール血清では中和されなかった(ウイルスの生育はコントロール培養物中で実証された)(図4A)。前のように、FIV 19k32はS14/22で中和されなかった(図4B)。これら2つの分子クローン間でのウイルス中和の相違が表面タンパク質の相違によって生じたのかどうかを調べるために、我々は、1662 bp KpnIフラグメントを交換した。これらのキメラクロンは、19k1KK32(19k32のKpnIフラグメントを含有する19k1)および19k32KK1(19k1のKpnIフラグメントを含有する19k32)と名付けた。キメラクロン19k1KK32は血清S14/22で中和されなかったが(図4C)、キメラクロン19k32KK1は中和された(図4D)。このことは、エンベロープ遺伝子の1662 KpnIフラグメント内のエピトープが、中和に関連することを示している。この実験において、S14/22の存在下に生育させた培養物19k1KK32の上澄み液の、感染後12日目に試験したRT活性は、低かった。前の実験において、RT活性の増加は感染後9~12日目に実証された。

【0058】

血清S14/22の存在下に生育させたFIV 19k1のエスケープ変異体は、この血清で中和されなかった(図4E)。19k1のエンベロープタンパク質のアミノ酸配列と、エスケープ変異体の配列とを比較すると、多可変部5(HV-5)内で2つのアミノ酸が置換していることが示された。これらの置換が、血清S14/22からのFIV 19k1のエスケープを引き起こすかどうかを確かめるために、我々は、HV-5全体を含有するクローン19k1の144 bp Ns1I - Mst2フラグメントを、エスケープ変異体のそれと交換した。19k1NMescと名付けられたこのキメラは、S14/22で中和されなかった(図4F)。これは、一方または両方のアミノ酸置換がエスケープ機構に関連していることを示している。部位指向性突然変異発生によって、これら2つのアミノ酸が別個に置換された。これらの点突然変異クローンを、19k1mut1(位置556: AsnからThrに)および19k1mut2(位置560: LysからGlnに)と名付けた。FIV 19k1mut1は血清S14/22で中和できたが(図4G)、FIV 19k1mut2はS14/22で中和できなかった(図4H)。このことは、LysからGlnへのアミノ酸置換を生じさせるアミノ酸位置560での点突然変異が、血清S14/22からのFIV 19k1のエスケープによることを示している。また、クローン19k1とクローン19k32との間でのHV-5の相違が、血清S14/22での中和の相違を引き起こすかどうかを調べるために、これら2つのクローン間で、144 bp Ns1I -

Mst2フラグメントを相互に交換した。しかしながら、この交換の結果、ウイルス中和の変化が生じなかった（図示しない）。このことは、他のエピトープが関連しているかもしれないことを示している。

まとめ、感染後22週目に得られた分子クローンFIV 19k1のウイルス子孫に感染したSPFネコ（No.14）からの血清は、インビトロでこのウイルスを中和することができた。この血清はまた、このネコから感染後2週目および32週目に再単離されたウイルスも中和することができた。FIV 19k32および生物学的単離物FIV A'dam 19（両方とも19k1と同じネコから単離された）は、インビトロでこの血清で中和されなかった。FIV 19k32（これは、エンベロープタンパク質における6つのアミノ酸だけがFIV 19k1と異なっている）が中和されないという事実は、血清S14/22中の中和抗体が、厳密に型特異的なエピトープを指向することを示唆している。ヒトにおいては、型特異的HIV-1中和抗体は、HIV-1感染後の初期に生じ、いわゆる主要中和ドメイン、V3 - ループと主に反応するようである（Goudsmidt PNAS 85:4478-4482, 1988, Matsushita J. Virology 62:2107-2114, Parker, PNAS 85:1932-1936, 1988; Rusche, PNAS 85:3198-3202, 1988）。感染経過の後期には、グループ特異的ウイルス中和抗体が検出される（Kang PNAS 88:6171 -6175）。

10

【0059】

FIV 19k1に感染したSPFネコから得られた血清S14/22が、FIV 19k1およびネコ14からの再単離物だけを中和でき、FIV 19k32を中和できないという事実は、FIV に感染したネコにおいては、感染後の初期に型特異的ウイルス中和抗体が出現することを示している。また、他の研究者は、ネコのウイルス中和抗体を、実験感染後4週以内に検出できたことを示している（Ferreiro et al., J. Gen. Virol. 72: 617-622, 1991; Tozzini et al., J. Virol. Meth., 37: 241-251, 1992）。FIVの異なる単離物に実験的に感染したネコ、または自然感染ネコからの血清サンプルは全て、FIV Petaluma株を中和することができ、グループ特異的ウイルス中和抗体が存在していたことを示した。これらのウイルス中和アッセイは、Crande 11ネコ腎臓（CrFK）細胞に適応したFIVの株に基づいている。大部分のFIV単離物はCrFK細胞に感染しないので、ウイルスをこれらの細胞中で増殖させるために、CrFK細胞に対するFIVの適応化が必要である。従って、使用した標的細胞の相違は、他の研究者（Ferreiro、Tozzini、上記）によって報告されたFIVのグループ特異的中和と、この実施例において報告した型特異的中和との間で観察された相違をよく引き起こすことができた。ウイルス中和に関連するエンベロープタンパク質の領域を決定するために、我々は、FIV 19k1での感染後22週目に得られた SPFネコからの血清の存在下にFIV19k1を増殖することにより、FIVのエスケープ変異体を生成した。親クローン19k1のエンベロープ遺伝子のアミノ酸配列と、エスケープ変異体19k1escのそれとを比較すると、多可変部5（HV-5）中の2つのアミノ酸が突然変異したこと、即ち、位置556でのAsnからThrへのアミノ酸置換と、位置560でのLysからGlnへのアミノ酸置換が示された。親クローン19k1とS14/22で中和されないクローン 19k32とのアミノ酸配列を比較すると、HV-5の相違、即ち、位置555でのAsnからLysへのアミノ酸置換と、位置557でのHisからTyrへのアミノ酸置換も示された。

20

30

【0060】

HIV-1のトランスメンブランエンベロープタンパク質における1つのアミノ酸置換は、中和耐性を引き起こすことができる（Reitz et al., Cell 54:57-63, 1988）。しかしながら、報告された位置582でのアミノ酸AlaからThrへの置換は、中和エピトープに関連がなく（Wilson J. Virol. 64: 3240-3248, 1990）、このことは、中和からのエスケープが中和エピトープの外側での突然変異によって起こりうることを示している。中和エピトープの外側で1つのアミノ酸を変えると、例えば、エンベロープタンパク質の構造（これは、以前は露出していた中和エピトープのマスキングを引き起こしうる）を変えることができた。FIVのエスケープ変異体19k1escのエンベロープ遺伝子におけるアミノ酸置換が、血清S14/22での中和に対する耐性の唯一の原因であることを示すために、部位指向性突然変異および部分的遺伝子交換を行なったところ、中和抗体によって発揮される抑圧からエスケープするのに、FIVの表面タンパク質のHV-5内での1つの突然変異で充分であるという結論

40

50

が導かれた。

【 0 0 6 1 】

クローン19k1と19k32とのエンベロープ遺伝子の大きなフラグメントを相互に交換すると、S14/22のための中和エピトープまたは19k1が、表面タンパク質上に位置していることが示された。同様に、クローン19k1とエスケープ変異体との間で、HV-5を含有する144 bp NsiI - Mst2フラグメントを交換した結果、中和フェノタイプの交換が生じ、HV-5内の1つのアミノ酸を置換した結果、血清S14/22の中和抗体からのエスケープが起こった。しかしながら、クローン19k1と19k32との間での144 bp NsiI - Mst2フラグメントを相互に交換しても、中和フェノタイプの交換を引き起こさず、このことは、19k1と19k32との間の中和に関する機能的相違は、HV-5の外側にあることを示した。この研究は、アミノ酸位置560でのLysからGlnへの置換を引き起こす単一点突然変異は、インビトロで中和抗体からのエスケープに基づくことを実証した。

実施例 2

SPFネコを、実施例1で説明したようにして、分子クローン19k1のウイルス子孫に感染させた。感染後22週目に得られたこのネコからの血清は、この分子クローンのウイルス子孫を中和することができたが、エンベロープ遺伝子における19 k1との同一性が99.3%である19k32のウイルス子孫を中和できなかった。遺伝子交換および点突然変異（実施例1参照）によって、我々はキメラクローンを構築し、ネコ胸腺細胞の感染に基づく我々のウイルス中和アッセイでこれらを試験した（実施例1参照）。6つの置換突然変異の5つを含有する1662 bpKpnIフラグメントの交換は、ウイルス中和フェノタイプを提示することが示された。次いで我々は、多可変部5中の6つの置換突然変異の2つを含有する144bp NsiI - MstIIフラグメントを相互に交換した。このフラグメントの交換は、フェノタイプを変化させなかった（表3）。他の3つの置換突然変異、即ち位置222でのR-S、位置454でのN-Dおよび位置483でのL-Sを、部位指向性突然変異発生によって置換した。位置483でのロイシンからセリンへの置換のみが、ウイルス中和に対する耐性を与えた（表3）。

【 0 0 6 2 】

【 表 3 】

FIV 分子クローンおよびキメラクローンのウイルス中和

ウイルス	ネコ 14 血清で中和した後の R T 活性	
	前	p.i. 後 22 週目
19k1	55215	1296
19k1 NM32	291690	3558
19k1 222	690036	6774
19k1 454	586896	6561
19k1 483	622740	545613
19k32	465969	2506722
19k32 NM1	573012	429117
19k32 222	325815	586269
19k32 454	498948	331725
19k32 483	870699	613587

【 0 0 6 3 】

この突然変異によって、もう1つの可能性のあるグリコシル化部位（示さない）が導入される。この部位のグリコシル化は、ウイルス中和エピトープをマスクすること、あるいはタンパク質の配座を変化させることができた。これによって、ウイルス中和（VN）抗体

は、中和エピトープを認識することができない。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】図1は、キメラFIVクローンの構築の説明図である。最上段のバーは、主要なオープンリーディングフレームgag、polおよびenvを示す。制限酵素開裂部位として、KはKpn I; MはMst II; NはNsi I; SはSal I; SpはSphIを示す。個々の点突然変異は、(▼)で示される。

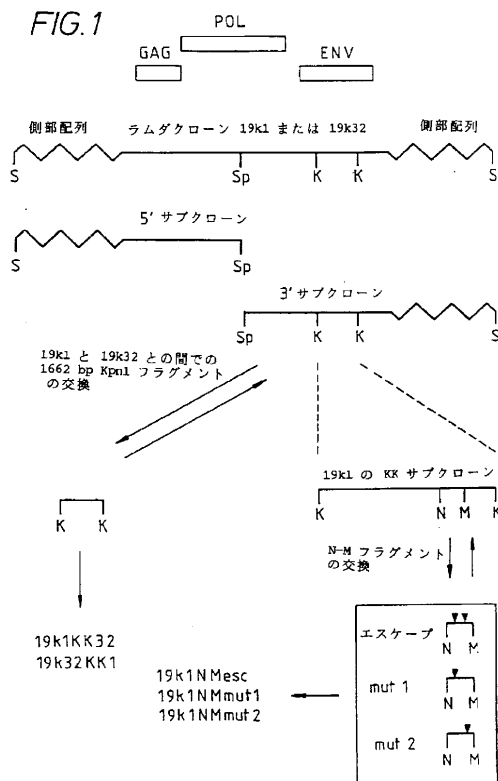
【図2】図2は、血清S14/22(破線)またはSPF血清(実線)の存在下の、エスケープ変異体FIV 19K1(A)、FIV 19K1A(B)、FIV 19K1B(C)の培養物において実証された逆転写酵素(RT)活性(cpm x 10³)として表されるウイルス複製の動力学を示す。

【図3】図3は、分子クローンFIV 19K1、FIV 19K32およびFIV 19K1 escのエンベロープ遺伝子の多可変部5のアミノ酸配列の比較を示す。

【図4】図4は、親FIVクローンおよびキメラFIVクローンおよび19K1 escのウイルス子孫を、血清S14/22(破線)またはSPF血清(実線)とともに用いて、感染後9~12日目にRT活性(cpm x 10³)を測定することにより決定された中和実験の結果を示す。(A) FIV 19K1; (B) FIV 19K32; (C) 19K1KK32; (D) 19K32KK1; (E) FIV 19K32; (F) FIV 19K1N Mesc; (G) FIV 19K1Mut1; (H) FIV 19K1 Mut2。

10

【図1】



【図2】

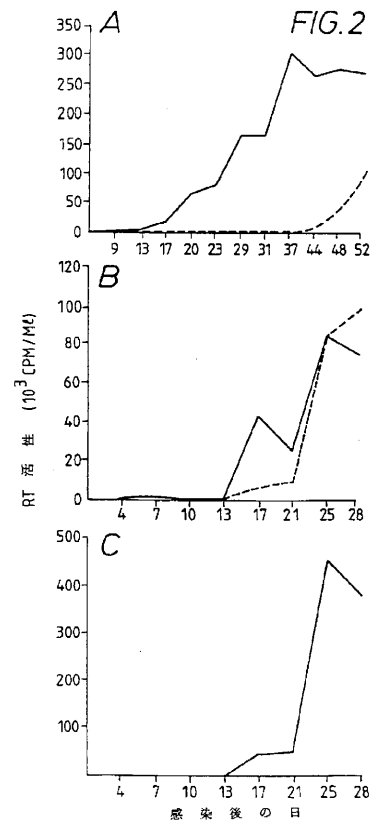


FIG. 3

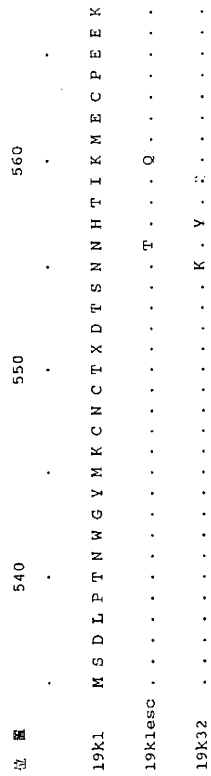
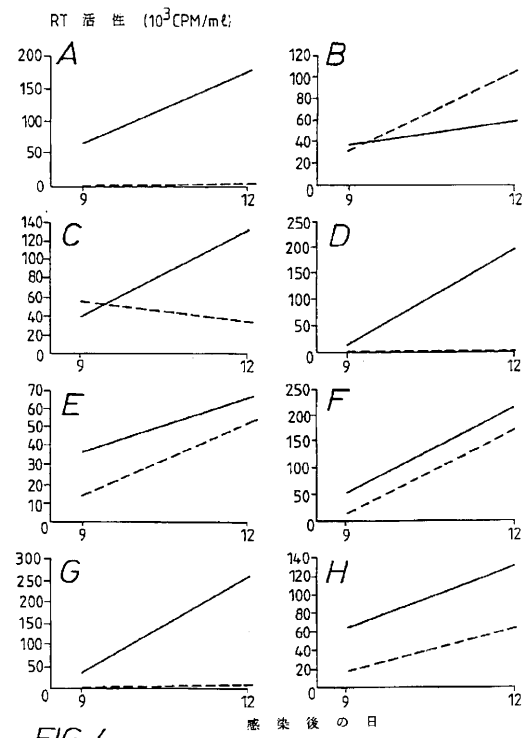


FIG. 4



2009005706000001 . app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	1 7 1	

(72)発明者 ジーベリンク, コルネラス ヘルマン ヨハヌス

オランダ 3 8 3 3 ジーディー ルースデン グリフトホルスト 2 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA02 CA05 DA02 GA11
 4B064 AG31 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA90X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA45
 4C085 AA03 BB11 BB23 CC01 DD62 EE01 GG01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA17 CA01 DA86 EA31 FA74