

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

**特許第3851938号**  
**(P3851938)**

(45) 発行日 平成18年11月29日(2006.11.29)

(24) 登録日 平成18年9月15日(2006.9.15)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 K 39/21 (2006.01)** A 6 1 K 39/21  
**A 6 1 P 31/12 (2006.01)** A 6 1 P 31/12

請求項の数 12 (全 22 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平7-507666                  (86) (22) 出願日 平成6年8月19日(1994.8.19)                  (65) 公表番号 特表平9-501933                  (43) 公表日 平成9年2月25日(1997.2.25)                  (86) 国際出願番号 PCT/US1994/009336                  (87) 国際公開番号 W01995/006124                  (87) 国際公開日 平成7年3月2日(1995.3.2)                  審査請求日 平成13年4月23日(2001.4.23)                  (31) 優先権主張番号 08/109,934                  (32) 優先日 平成5年8月20日(1993.8.20)                  (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者                  ザ ガヴァメント オブ ザ ユナイテッド                  ステイツ オブ アメリカ、レプリ                  ゼンテッド バイ ザ セクレタリー、デ                  パートメント オブ ヘルス アンド ヒ                  ューマン サーヴィスィズ                  アメリカ合衆国 20852 メリーラン                  ド州 ロックビル エグゼクティブ ブ                  ルバード 6011 ピー. オー. ボック                  ス 13、ナショナル インスティテュー                  ト オブ ヘルス、オフィス オブ テク                  ノロジー トランスファー内</p> <p>(74) 代理人                  弁理士 中島 淳</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 植物、動物、およびヒトのワクチンとして並びに免疫療法に有用な抗体の免疫優性エピトープの弱体化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫原性組成物であって、  
 HIV-1のgp120/160の修飾形態物と、  
 薬学的に許容される担体と、を含み、  
 ここで、前記gp120/160の修飾形態物はV3ループを有し、V3ループは、gp120/160の修飾形態物におけるV3ループから当該gp120/160の修飾形態物の異なる部位へ免疫応答を実質的に向けさせるように免疫弱体化されたものである当該組成物。

【請求項2】

前記V3ループは、天然V3ループには存在しない一以上のN-結合グリコシル化シグナルを含む修飾アミノ酸配列を有する請求の範囲第1項に記載の組成物。

【請求項3】

前記担体は薬学的に許容される生理食塩水を含むものである、請求の範囲第1項に記載の組成物。

【請求項4】

前記V3ループは、このV3ループに対する炭水化物部分の付加によって免疫弱体化されたものである、請求の範囲第1項に記載の組成物。

【請求項5】

前記V3ループは、このV3ループ中のアミノ酸の改変によって免疫弱体化されたものであ

る、請求の範囲第 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記改変はアミノ酸置換を包含するものである、請求の範囲第 5 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記アミノ酸の改変は、ヒトにおける液性免疫が実質的に生じない前記 V 3 ループにおけるアミノ酸の異なるセットを生じるものである、請求の範囲第 6 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記アミノ酸の異なるセットは、直鎖状のヒト B 細胞エピトープを含む、請求の範囲第 7 項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 V 3 ループは生来の電荷を有し、前記改変はこの生来の電荷の変更をもたらすものである、請求の範囲第 5 項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記改変は、1 以上のアミノ酸の削除を含むものである、請求の範囲第 5 項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記 V 3 ループは、少なくとも 1 つの他の分子に対する結合部位を含み、前記組成物は前記エピトープに非可逆的に結合した少なくとも 1 つの他の分子をさらに含むものである、請求の範囲第 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記他の分子は前記 V 3 ループに対して指向する抗体を含むものである、請求の範囲第 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、免疫応答の操作に関する。より詳細には、免疫弱化 (immunodampening) によって免疫エフェクター応答の対象を、疾病関連の抗原に対してこれまで無反応 (silence) であったかあるいは非免疫原性であるエピトープに向けるものである。

背景技術

ウイルス、細菌、後生動物の寄生虫、およびヒトの癌等の病原性の各種作因は、宿主の免疫応答に打ち勝つための巧妙な攻略法を発達させてきた。このため、多くの病原性有機体に対する有効なワクチンの開発努力に障害を受けることが多い。

ある種の寄生生物は、抗体の影響を避けて自己を守ることを可能とするような細胞内生育環境を発達させてきた。また、その他の寄生生物の中でもアフリカントリパノソーマなどは、抗原変異 (antigenic variation) と呼ばれるプロセスを利用して自己の表面外被の特性を変える。さらに他の寄生生物は、リンパ球障害性因子を放出して宿主の免疫応答を抑制する途を発達させている。

上記以外の攻略法によれば、病原体は、構造の変化あるいは抗原連続変異 (antigenic drift) を受ける免疫優性エピトープを表示する。このエピトープに対抗して生起する早期中和抗体および/または細胞障害性 T リンパ球 (CTL) 応答は、優勢な病原性の表現型の力価を減じようとする宿主免疫系の対抗手段である。しかしながら、感染と上記免疫応答の発言及び効果との間には時間的ずれがある。さらに、免疫優性エピトープの抗原連続変異の結果、上記の早期中和抗体や CTL 応答は病原体に対して効果を失ってしまう。

ヒト免疫不全ウイルス - 1 (HIV - 1) は、ヒトの免疫系に侵入してこれを破壊するための精巧な攻略法を発達させてきた。これに対してこれまで試みられたワクチンによる対抗手法はいずれも成功していない。ワクチン産生におけるある手法は HIV - 1 の gp 120 / 160 を中心としてきた。gp 120 / 160 の優性 V 3 ドメインに対しては中和抗体を作ることができる。しかし、この中和抗体はインビボでの HIV - 1 の継続した生育を防ぐことに関しては有効でない。ハイウッド (Haigwood) らは、V 3 ドメインを含むアミノ酸を除去することによって、優性 V 3 ドメインを保持しない gp 120 / 160 免疫原を生成した [ AIDS Research and Human Retroviruses 6:855-69(1990) ]。この工作タ

10

20

30

40

50

ンパクは酵母中で非グリコシル化形態で生産され、変性され、試験動物を免疫するのに用いられた。この手法は、より保存された中和応答を引き出すことができなかつた。

病原体でコードされた免疫優性抗原であって抗原性の変動を受けるものの他の例としてはインフルエンザウイルス凝集抗原(HA)が挙げられる。実際、HAの抗原構造の変化は、このウイルスで引き起こされる呼吸器疾患の周期的な流行に関連している。実験的な条件下では、中和抗体の存在においてこのウイルスを増殖させる時に加えられる選択圧は、耐性変異体の出現という結果を引き起こした。ある例では、HA1の位置63における突然変異(DからN)の結果、共通N-X-S/Tに合致する3つのアミノ酸モチーフが創製された。この断片は、小胞体とゴルジを経由して移動するタンパクに対するN-結合オリゴ糖の付加に関するシグナルとして機能する。過剰の炭水化物の存在によってHAタンパクと中和抗体の間の相互作用が阻止された。このことはN-結合グリコシル化の阻害剤であるツニカマイシンの存在下で上記変異体の増殖が抗体結合を回復したことが発見されたことによって確認された。このため、ウイルスでコードされたエピトープの翻訳後修飾が中和抗体の結合を妨げる可能性がある。

10

ゲシング(Gething)らは、タンパクのエピトープを防御する方法として、オリゴヌクレオチドの突然変異誘発を利用してN-結合修飾物を導入することを開示している[米国特許第5041376号]。タンパクのN-結合修飾物を使用する意図は、その免疫原性を低下させることによって抗原の循環時間を延長させる点にある。

#### 発明の概要

本発明は、一態様において、ヒトに投与して、被験者内にHIV-1に対抗する免疫的保護を引き起こすワクチンに関する。このワクチンは、HIV-1のgp120/160の修飾形態物と、ヒトに投与するための薬学的に許容される担体とを含有するものであって、前記修飾物においては、gp120/160のV3ループは免疫弱化されている。即ち、本発明の免疫原性組成物は、HIV-1のgp120/160の修飾形態物と、薬学的に許容される担体と、を含み、ここで、前記gp120/160の修飾形態物はV3ループを有し、V3ループは、gp120/160の修飾形態物におけるV3ループから当該gp120/160の修飾形態物の異なる部位へ免疫応答を実質的に向けさせるように免疫弱化されたものである。好ましくは、本ワクチン中のV3ループは、天然(native)のV3ループには存在しない一以上のN-結合グリコシル化シグナルを有する修飾されたアミノ酸配列を有する。

20

30

本発明は、他の一態様においては、哺乳類に投与して、被験体の哺乳類動物内に病原性の有機体に対抗する免疫的保護を引き起こすワクチンに関する。この病原性の有機体は、免疫優性エピトープを有する抗原を含有する。本ワクチンは、このような抗原が修飾された形態の物と、薬学的に許容される担体とを含有するものであって、抗原の免疫優性エピトープは免疫弱化されている。担体は、薬学的に許容される生理食塩水緩衝液を含有することが好ましい。また、免疫優性エピトープは、炭水化物を構成する一部をエピトープに付加する方法等によって免疫弱化することができる。但し、免疫優性エピトープが複数のアミノ酸を含有する場合は、エピトープはこれらのアミノ酸の改変によって免疫弱化させることができる。この実施形態においては、改変はアミノ酸置換を包含することができ、複数のアミノ酸を、ヒトB細胞に寛容化された異なる複数のアミノ酸で置換することができる。この異なる複数のアミノ酸は、例えば直鎖状のヒトB細胞エピトープを含有することができる。前記複数のアミノ酸はまた、生来の(native)電荷を有することもでき、その場合、改変によってこの生来の電荷は変化する。改変は、さらに前記複数のアミノ酸の一以上を除去することを含むこともできる。

40

本発明の上記の態様における他の実施形態では、免疫優性エピトープは、少なくとも一つの他の分子に対する結合部位を有し、ワクチンは、更にこのエピトープに非可逆的に結合された少なくとも一つの他の分子を含む。当該他の分子は、例えばエピトープに対する抗体を有することができる。この実施形態においては、前記エピトープはレセプターを含むことができ、また前記他の分子はこのレセプターに対するリガンドを含むことができる。本発明のさらに他の実施形態においては、免疫優性エピトープは、哺乳類がこのエピトー

50

プに対して中和抗体を産生することができるエピトープである。そのような免疫優性エピトープは複数のアミノ酸を含むことができ、この複数のアミノ酸は、病原性の有機体の生存能力に影響を与えることなく変更されることができ、それにより、当該複数のアミノ酸を、病原性有機体の複数の世代にわたって遺伝的浮動によって変化できるようにする。

本発明のワクチンは、真菌、原虫類、細菌、さらにインフルエンザウイルスやHIVなどのウイルスを含む多くの病原性有機体に対抗する免疫防御力を与えることができる。一実施形態においては、病原性有機体はHIV-1であり、免疫優性エピトープはHIV-1のgp120/160のV3ループである。このエピトープはさらに、付加的なN-結合グリコシル化シグナルを含むように改変された複数のアミノ酸を有することもできる。

本発明は、更に他の一態様においては、免疫優性エピトープを有する天然の抗原を含有する病原性有機体に対抗して哺乳類を免疫する方法に関する。この方法は、免疫優性エピトープが免疫弱体化された天然抗原修飾物を含有するワクチンを哺乳類に投与する段階を含む。この方法は、ワクチンの投与に先立って哺乳類に天然抗原を投与する段階を含むことが好ましい。そのような天然抗原の投与の際には、当該天然抗原をコードしてこれを哺乳類中に発現するベクターを対象哺乳類に投与することもまた好ましい。

10

本発明は、さらに他の一態様においては、元々の(original)免疫優性エピトープを有する抗原を含有する病原性有機体に対抗して哺乳類中に免疫防御を引き起こすためにその哺乳類に投与することができるワクチンの製法に関する。この抗原は、前記元々の免疫優性エピトープを含有するアミノ酸群のサブセットを含む複数のアミノ酸をも包含する。この方法は、1) 上記元々の免疫優性エピトープを含有するアミノ酸群のサブセットを含む複数のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列を得ること、2) 元々の免疫優性エピトープとは異なるアミノ酸サブセットを含有する修飾された免疫優性エピトープをコードするようにポリヌクレオチド配列を修飾すること、3) 上記修飾段階の結果得られたポリヌクレオチド配列を発現し、修飾された免疫優性エピトープを含む修飾抗原を産生してこれによって当該修飾免疫優性エピトープを前記元々の免疫優性エピトープと比較して相対的に免疫弱体化すること、および4) 前記修飾抗原と薬学的に許容される担体とを含有するワクチン組成物を調製すること、の各段階を包含する。

20

本発明によるワクチンの製法においては、修飾段階は、少なくとも一つのアミノ酸置換をコードする修飾ポリヌクレオチド配列を、元々の免疫優性エピトープ中に産生することを包含することができる。この修飾ポリヌクレオチド配列は、例えばヒトB細胞に寛容化された修飾免疫優性エピトープをコードすることができる。修飾免疫優性エピトープは、例えば直鎖状のヒトB細胞エピトープであることができる。修飾段階においては、元々の免疫優性エピトープを含有するアミノ酸群のサブセットは、生来の電荷も有してもよい。また修飾段階は、生来の電荷とは異なる電荷を有する修飾免疫優性エピトープをコードする修飾ポリヌクレオチド配列を産してもよい。他の実施形態においては、修飾段階は、少なくとも一つのアミノ酸欠損をコードする修飾ポリヌクレオチド配列を元々の免疫優性エピトープ中に産生することを包含してもよい。

30

本発明は、他の一態様においては、ヒトに投与してHIV-1に対する免疫防御を当該ヒトにもたらすことのできるワクチンの製法に関する。この方法は、HIV-1のgp120/160抗原を得ること、このgp120/160をトロンピンに暴露処理してgp120/160を分解すること、およびトロンピンで処理された抗原と薬学的に許容される担体とを含むワクチン組成物を調製すること、を含む。好ましくは、本発明の本態様で用いられるgp120/160抗原の第9238部位は、本方法の処理段階の間、完全なまま保たれる。

40

本発明は、さらに他の一態様においては、ヒトに投与してHIV-1に対する免疫防御を当該哺乳類にもたらすことのできるワクチンに関する。このワクチンは、HIV-1のgp120/160抗原を得、このgp120/160抗原をトロンピンに暴露処理してgp120/160抗原を分解し、さらにトロンピンで処理された抗原と薬学的に許容される担体とを含むワクチン組成物を調製することによって生産される。

【図面の簡単な説明】

50

図1はプラスミドpJJ25の概略図である。

図2はプラスミドpMCI Iの概略図である。

図3はプラスミドpSC65の概略図である。

図4はプラスミドpJJ5の概略図である。

図5はプラスミドpSC59の概略図である。

図6はgp120/160エンベロープタンパクのHXB2 V3ループの概略図である。部位指向性突然変異によるアミノ酸置換を示す。各変異体は次のように標記される：1 (RIR)；2 (RGP)；3 (FVT)；4 (NMR)。ここに示す突然変異はすべて細胞外経路においてN-結合グリコシル化を指向するであろう共通モチーフを生成するように企図されている。

10

図7はHXB2 V3ドメインの主配列、リコンビナントエンベロープタンパクの抗原性を評価するために用いられる抗体試薬のエピトープ標的、およびウエスタン分析による抗体結合データのまとめを示す。“+”は抗体試薬による染色を示し、“-”は検出可能な染色が無かったことを示す。

#### 発明の詳細な説明

##### A.用語の定義

本明細書においては、“免疫防御”とは、有機体によって引き起こされる感染を避ける能力、および/または、有機体によって引き起こされる疾病の防御、予防、あるいは弱体化をもたらす能力をいう。

“免疫優性エピトープ”とは、抗原上のエピトープであって、宿主有機体中に選択的に免疫応答を引き起してその抗原から他のエピトープの実質的な排除を引き起こすエピトープをいう。

20

“エピトープを免疫弱化すること”とは、エピトープを修飾することにより、宿主有機体の免疫系がそのエピトープに対する抗体を産生することを実質的に防ぐことをいう。但し、免疫弱化はそのエピトープを除去することは含まない。

“gp120/160”とは、本明細書では、膜に結合したgp160およびこれに由来する遊離gp120をコードする遺伝子、並びにその遺伝子産物のいずれかのものをいう。

その他の用語については、以下の詳細な説明の記述に関連させつつ逐次その意味を記載する。

30

##### B.使用したリコンビナントプラスミド

本発明を実施・使用する方法の具体例に関連する各種プラスミドをここに記載する。デジョン(DeJong)らは、HXB2の三番目の超可変ドメイン(V3ループ)であるHIV-1 gp120/160を含有する領域のサブクロニングを容易にするためにリコンビナントプラスミドpJJ25とpMC I Iを利用した[Vaccines 92, Modern Approaches to new Vaccines Including the Prevention of AIDS,チャノック(Chanock)ら編、ニューヨーク(1992年)]。リコンビナントプラスミドpJJ25は、小さなPvuII-XbaIスタッファー挿入片を含有するNcoIからBamHIまでのHXB2様の断片(nts 5675-8478)を担持する。リコンビナントプラスミドpMCI Iは、完全長の感染性のHXB2様のゲノムを担持する。Current Protocols in Molecular Biology, (グリーン・パブリッシング・アンド・ウィリー-インターサイエンス、補遺15(1992年)、ページ16.17.2)に記載の発現ベクターpSC65は、初期-後期スーパーワクシニアプロモーターを、完全体(intact)チミジンキナーゼ遺伝子の中央に並列させ、下流側にサブクロニング部位を有して担持している。V3ループ交換には、修飾pGEM-1(プロメガ社、ウィスコンシン州マジソン)を直接のレシピエントとして使用した。プラスミドpJJ5は、NcoI-BamHI断片(ロス・アラモス(Los Alamos)の命名ではnts 5674-8474)を欠くHXB2の完全な分子クローンである。プラスミドpSC59はpSC65の構築に使用された親プラスミドである。

40

HXB2の配列(その包括的な制限地図を含む)は、GenBankにおいて受託番号K03455によって特定される。PvuIIおよびXbaIの開裂部位を示す更なる配列

50

データは、GenBankの受託番号M17449によって見いだされる。

#### C. 緒言

本発明者らは、抗原上のある免疫優性エピトープを免疫弱化すると、宿主有機体においてその抗原上の非優性エピトープ群に対する高力価の抗体群を産生することができることを見いだした。そのような免疫弱化された抗原は、HIV、インフルエンザウイルス、レンチウイルス、その他のウイルス等、非常に変わりやすい免疫優性エピトープの抗原を有する有機体に対する有効なワクチンとして用いることができる。

本発明者らによる発見の例示的な適用では、本発明者らは、免疫優性V3ドメインに過剰なN-結合炭水化物を有するヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)のリコンビナントgp120/160タンパクが、新規な抗原特性を示すことを見いだした。この抗原特性には、野性型のV3エピトープを認識する抗体に対する結合能の欠如が含まれる。本発明者らはまた、上記過剰炭水化物部分の存在は、HIV-1リコンビナントウイルスの感染性生存能を弱めないことを見いだした。さらに、本発明者らは、過剰のN-結合炭水化物部分を有するV3変異体gp120/160タンパクの発現を指向するリコンビナントウイルスで免疫した実験動物は、インビトロで、野性型のHIV-1による感染を中和する高力価の抗体を示すことを見いだした。よって、gp120/160のV3ドメイン内の免疫優性エピトープを免疫弱化すれば、免疫応答は、同じ抗原上にある他の中和エピトープに向かうこととなる。

#### D. 有機体の同定

本発明の技法は、互いに関係のない多数の病原性有機体に対する有効なワクチンを創製するために用いることができる。本発明は、高レベルの抗原連続変異を示す免疫優性エピトープを有することによって宿主生物の免疫応答を避けるという攻略法を発達させている有機体に対して最も適切に用いられる。この免疫優性エピトープは通常、病原性有機体の生残能力に影響を与えることなく変化しうるような複数のアミノ酸の形態を採っている。そのような免疫優性エピトープの例としては、HIV-1のgp120/160のV3ドメインやインフルエンザウイルスのHAが挙げられる。免疫優性を示すと思われる他のエピトープは、感染の過程にわたり大きく変化することが示されているエピトープであり、アフリカトリパノソーマの表面抗原などである。

#### E. 免疫優性エピトープの同定

本発明のワクチンは、まず病原性有機体中の免疫優性エピトープを同定することによって創製される。免疫優性エピトープを担持することが疑われる抗原は、その病原性有機体の外表面上の抗原の選択によって同定できる。例えば、真菌、細菌、およびウイルス等の最も単純な有機体は、その病原性有機体の外表面上に露出した一個または二個のタンパクを有している。これらの外表面タンパクが相応の抗原を担持している可能性がもっとも高い。免疫優性エピトープを担持している可能性がもっとも高いタンパクは、ウェスタンアッセイによって同定することができる。このアッセイにおいては、全タンパクをゲル上に付してその病原性有機体に感染した生物から採取した血清に対して試験する。当該血清中の結合抗体は、良く知られたELISAの種々技法において行われるものと同様に、標識抗体によって同定する。

免疫優性エピトープは、病原性有機体に感染した宿主生物の血清を検査することによって同定できる。血清の検査にあたっては、宿主生物において免疫応答を引き起こすと思われる同定済抗原に結合した抗体の量を調べる。もし、免疫優性エピトープがこの抗原に存在すれば、血清中の実質的に全ての抗体がその免疫優性エピトープに結合し、抗原に存在する他のエピトープには抗体は殆どあるいは全く結合しないことになる。

免疫優性エピトープの同定の一例として、HIV-1のgp120/160のV3ドメインはHIV-1の免疫優性エピトープであることが他の研究者らによる競合アッセイでのペプチドスキニングによって同定された。インビトロでウイルスを中和する抗血清が得られた。gp120/160から一連の重複ペプチドが調製された。過剰量のこれらのペプチドそれぞれを血清に順次添加した。各血清サンプルを用いてHIV-1に対する中和活性を試験した。gp120/160のV3ドメインからのペプチドが、血清の実質的

10

20

30

40

50

に全ての中和活性を排除することが判明した。

#### F. 免疫優性エピトープの免疫弱化

免疫優性エピトープが同定されたら、その免疫優性エピトープを免疫弱化する。免疫弱化は、以下に記載する技法を始めとする各種技法に従って行うことができる。

##### N - 結合炭水化物の導入：

免疫優性エピトープは、N - 結合炭水化物残基の導入によって免疫弱化することができる。ペプチドエピトープにおいては、これは、そのエピトープをコードする遺伝子に対する部位指向突然変異誘発によって付加的なN - 結合グリコシル化シグナルを含むことにより簡単に行うことができる。

N - 結合炭水化物 (CHO) の存在はポリペプチドの主アミノ酸配列によって決定する。アスパラギン、次いで任意のアミノ酸、最後にセリンまたはスレオニン (N - X - S / T、ここでXはプロリンおよびアスパラギン酸以外の任意のアミノ酸) の3つのアミノ酸からなる配列がN - 結合CHO付加に関するシグナルであると信じられている。N - 結合配列と合体した炭水化物を始めとする複合炭水化物の付加は、この部位に抗体を発生させる免疫系の能力を低減あるいは弱化すると信じられている。この考え方はインフルエンザ赤血球凝集素タンパク上のある種のN - 結合ドメインについて提起されているものである [ウィリー (Wiley) ら、Nature, 289:373-387(1981)]。インフルエンザの場合には、CHOの付加はウイルスを免疫攻撃から防御する。そこで、この免疫系において観察されたタンパクを始めとする所与の病原性糖タンパクの主アミノ酸配列に関する知識を用いて分子操作を行い、N - 結合配列を部位指向的に導入したり除去したりすることができる。このようなN - 結合部位の導入は、この部位に対するB細胞の応答を防ぐことを企図するものである。

N - 結合炭水化物付加によるエピトープの免疫弱化の例として、HIV - 1 gp120 / 160の免疫優性V3ループをPCR部位指向突然変異誘発によって、実施例1に記載のように免疫弱化することができる。

#### 実施例 1

##### PCR部位指向突然変異誘発

N - 結合グリコシル化共通部位 (即ちアミノ酸NXTとNXS) をハグチ (Haguchi) の方法によって、PCR部位指向突然変異誘発によってV3ループに導入した [PCR Protocols, pp177-183, アカデミック・プレス、カリフォルニア州、サンジエゴ (1990)]。この文献の開示を本明細書の一部として引用する。即ち、正しいV3配列と希望のN - 結合変異とを担持する相補的プライマー対を合成した。pMCのV3領域を部分的に相補的な2つに分け、それぞれをPCRで増幅した。反応1は、V3 N - 末端システインに隣接する部位であって唯一の自然の状態において存在するPvUII部位 (nts 7082 - 7087) と重複する5'プライマーと、N - 結合インフレーム変異を含む3'プライマーとを含んでいた。反応2は、反応1で用いた3'に対する5'逆転相補体と、V3ループ (nts 7223 - 7228) のC - 末端システインに隣接する無反応のXbaI変異部に重複して含む3'プライマーを含んでいた。両反応をアガロース電気泳動に付し、ゲルから切り出し、ゲルスライスを1.5mlのcostarチューブ (アミコン社) 中で15分遠心分離した。反応1と2から3μlを取り出した。即ち、反応1からは5'V3 PvUIIプライマーを、反応2からは3'V3 XbaIプライマーを取り出して第三のPCR増幅における基質およびプライマーとして用いた。得られた増幅生成物は、希望のN - 結合の組合せを担持している断片を有するPvUII ~ XbaI V3ループを含有した。その後のV3 N - 結合変異体組合せ物の増幅のための基質としては、一種類の変異体を用いた。

図6は、gp120 / 160 (配列番号：1) のV3領域のアミノ酸配列、および本発明におけるこの実施例に従ってこの領域に導入された4つのN - 結合グリコシル化部位を示す。これらの変異部位を、本明細書では変異体1、2、3、4と略称する。表1は、希望のN - 結合グリコシル化シグナルを導入して単一の変異体または各種多数の変異体を得る目的で本発明のこの実施例に従って用いられるPCRプライマーを示す。表1にはまた、

10

20

30

40

50

本明細書の他の箇所に記載する N o t 1 部位の導入に用いる P C R プライマーも合わせて掲載する。

表 1

変異体	プライマー配列	配列番号	
5' 2	TCCGTATCCAGAATGGATCAGGGAGAGCAT	2	
3' 2	ATGCTCTCCCTGATCCATTCTGGATACGGA	3	
5' 3	CCAGGGAGAGCAAATGTTACAATAGG	4	
3' 3	CCTATTGTAACATTTGCTCTCCCTGG	5	10
6' 1	ATACAAGAAAAACATCAGTATCCAGAGAG	6	
3' 1	CTCTCTGGATACTGATGTTTTTTCTTGTA	7	
5' 2:1	GTATCCAGAATGGATCAGGGAGAGCA	8	
3' 2:1	TGCTCTCCCTGATCCATTCTGGATAC	9	
5' 2:3	TCAGGGAGAGCAAATGTTACAATAGG	10	
3' 2:3	CCTATTGTAACATTTGCTCTCCCTG	11	
5' 1:2:3	TCAGTATCCAGAATGGATCAGGGAGA	12	
3' 1:2:3	TCTCCCTGATCCATTCTGGATACTGA	13	20
5' Env-NotI	GGCAAGTGGTCAAAGCGGCCGCTAC	14	
3' End-NotI	GTAGCGGCCGCTTTTGACCACTTGCC	15	
5' Env-NotI	CAGAGAGAAAAAAGATAAGCGGCCGCTGC	16	
3' Env-NotI	GCAGCGGCCGCTTATCTTTTTTCTCTCTG	17	

実施例 1 で得た突然変異ポリヌクレオチドは、実施例 2 に記載のようにしてカセット系に挿入して適切な発現ベクターへと容易に移送することができる。

#### 実施例 2

##### p G E M 1 2 0 カセットの構築

修飾 V 3 ドメインの伝達を容易なものとするために、2つの中間的プラスミドカセットを構築した。この構築が必要とされる理由は、ワクシニア発現ベクターである p S C 6 5 は固有の P v u 1 1 と X b a 1 部位を有しており、これらの部位の存在によって当該ベクターは V 3 P v u 1 1 - X b a 1 移送に阻害的に作用するためである。S a 1 1 - N o t 1 ポリリンカーを S a 1 1 - P v u 1 1 で消化された p G E M - 1 に連結した。g p 1 6 0 の開始コドンに延びる 5' S a 1 1 プライマーと、1 2 0 / 4 1 開裂部位にインフレームの停止コドンを有すると共に当該停止コドンに隣接してある N o t 1 部位を有する 3' プライマーとを用いて、p J J 2 5 の g p 1 2 0 / 1 6 0 配列を増幅した。得られた P C R 産物を S a 1 1 と N o t 1 で分解し、修飾 p G E M - 1 の S a 1 1 - N o t 1 にサブクローニングした。V 3 欠如 g p 1 2 0 / 1 6 0 エンベロープの配列決定の結果、文献に記載された H X B 2 配列と比較して、二つの無反応の変更および二つのアミノ酸の変更が見いだされた [ラトナー (Ratner) ら、AIDS Res. Hum. Retroviruses 7:615(1991)]。このベクター p G E M - B 2 - 1 2 0 を用いて、P v u 1 1 - X b a 1 で消化された N - 結合修飾 V 3 断片を受容し、最終的に修飾 g p 1 2 0 / 1 6 0 をワクシニア発現ベクター内に移送した。

新規 N - 結合グリコシル化シグナルモチーフを構築するための別法を次の実施例 3 で説明する。

#### 実施例 3

新規 N - 結合グリコシル化シグナルモチーフを有する H I V - 1 g p 1 2 0 / 1 6 0 タンパクをコードする核酸配列の構築方法

10

20

30

40

50

部位指向突然変異誘発のための複製連鎖反応 (PCR) プロトコルを用いて N - 結合グリコシル化シグナルを HXB2 の一部である HIV - 1 ゲノム、即ち gp120 / 160 の第 3 の超可変ドメイン (V3 ループ) に対応する HIV - 1 ゲノムに導入した。プラスミド pMCI I は完全長の感染性 HXB2 様ゲノムを担持するが、このプラスミドを PCR 突然変異誘発のテンプレートとして用いた。希望の N - 結合変異を導入するために設計した非適合物含有の相補的合成オリゴヌクレオチドプライマー対は、オペロン・テクノロジー社によって合成された。プラスミド pMCI I の V3 領域の一部相補的な半分体を、実施例 1 に記載の条件下で PCR 増幅した。

上記実施例 3 は、gp120 / 160 の V3 ドメインをコードする遺伝子配列がどのように新規 N - 結合グリコシル化シグナルモチーフをコードするように改変されるのかについて示すものである。本アプローチの基本的な構成要素は、PCR に基づく突然変異誘発のプロトコルの使用、および、変異された V3 ドメインポリヌクレオチド配列を受け入れることができるプラスミドカセットの使用である。

PCR に用いるプライマー群は、gp120 / 160 の V3 ドメイン内の RIR アミノ酸の 3 個をコードする 3 つのコドンを除くように設計、合成した。これらのプライマーを基本的な実施例 3 に記載の通りに使用し、野性型の配列中に存在する RIR アミノ酸配列を除く、全 gp120 / 160 コード配列を有する gp120 / 160 カセットを作製した。本発明者らは、これらの修飾物をリコンビナントワクシニアウイルス発現構築体中に導入するための従来記載の手法と同一の手法を利用した。次いで、V3 ドメイン内に小欠損を有するリコンビナント gp120 / 160 糖タンパクを生産する手段としてこれらの構築物を用いて、培養生育中の細胞を感染させた。これら同一のウイルス構築物に実験動物を感染させ、リコンビナント gp120 / 160 糖タンパクに対する免疫応答を引き起こした。

#### 実施例 4

gp120 / 160 の V3 ドメインをコードする野性型および修飾 DNA 断片を受容するために用いるプラスミドベクターの構築方法

実施例 2 に記載の gp120 / 160 の V3 ドメインをコードする Pvul1 から Xba1 までの DNA 断片を含むサブクローニング操作を容易に行うために、修飾プラスミドベクターを構築した。この修飾プラスミドの使用が必要である理由は、実施例 3 のようにして調製した修飾 DNA 断片を受容することを最終目的として用いられる pSC65 ワクシニア発現プラスミドは、望ましくない Pvul1 および Xba1 制限部位を保持しているためである。そこで、pSC65 プラスミドは、Pvul1 および Xba1 を用いては、変異体 V3 配列を Pvul1 - Xba1 制限断片として適切に受容するようなやり方で 1 ヶ所を切断することができない。修飾プラスミドベクターは、以下のように 2 段階で調整する。プラスミド pGEM1 (プロメガ社) を Sal1 と Pvul1 で開裂する。次いでベクター含有断片を合成 Sal1 - Not1 ポリリンカーオリゴヌクレオチドに連結する。これとは別に、小 Pvul1 - Xba1 スタッファー挿入片を含有する Nco1 から BamHI までの HXB2 様断片を保持するプラスミド pJJ25 に対して分離操作を行った。gp160 の翻訳開始コドンに延びる 5' Sal1 プライマーと、gp120 / 160 / 41 開裂部位にインフレイム停止コドンをもつと共に当該停止コドンに隣接して Not1 部位を有する 3' プライマーとを用いて、pJJ25 の gp120 / 160 配列を増幅した。得られた PCR 産物を Sal1 と Not1 で消化し、修飾 pGEM1 プラスミドの Sal1 - Not1 部位にサブクローニングした。このプラスミド (pGEM - B2 - 120 と称す) を用いて、上記実施例 3 で調製した修飾 V3 領域 DNA 配列を有する Pvul1 - Xba1 DNA 断片を受容した。この結果、修飾 Pvul1 - Xba1 挿入片を含有する変異体構築物の gp120 / 160 コード配列全体が Sal1 - Not1 断片として切断できる。

#### 実施例 5

V3 ドメインに対応する野性型および修飾 DNA 断片を受容可能であって、完全長エンペロープ遺伝子 (gp120 / 41) を再構築するプラスミドの構築

10

20

30

40

50

実施例 3 に記載したもののような V3 領域部位指向による変異体を g p 1 6 0 遺伝子配列本体中に入れるために、プラスミド p G E M - B 2 - 1 2 0 を修飾して付加的な g p 1 6 0 コード配列を含ませた。これは、プラスミド p G E M - B 2 - 1 2 0 の X b a l - N o t I 断片がより大きな X b a l - N o t I 断片 ( 1 2 0 / 4 1 開裂部位の下流部分であって g p 1 6 0 コード配列中に存在する DNA 配列を含む ) で置換された新規プラスミドを創製することによって行った。これを行うにあたって、プラスミド p M C I I を P C R におけるテンプレートとして用いた。この P C R においては、5 ' プライマーは無反応の X b a l 部位を n t s 7 2 2 3 - 7 2 2 8 に導入し、3 ' プライマーは g p 1 6 0 停止コドンのすぐ下流に N o t I 制限部位を導入した。次いで、1 k b の増幅産物を p G E M - B 2 - 1 2 0 プラスミド中のより小さい X b a l - N o t I 断片と交換し、p G E M - B 2 - 1 6 0 と称する新規プラスミドを創製した。そこで、p G E M - B 2 - 1 6 0 プラスミドを P v u l l と X b a l で開裂し、スタッファー断片を除去することによって、実施例 4 に記載のような変異 V3 ドメイン配列を有する P v u l l - X b a l DNA 断片中に連結可能となった。

10

以下の実施例によって変異体が発現可能であることを示す。

#### 実施例 6

N - 結合 g p 1 2 0 / 1 6 0 変異体タンパクの発現を指向するベクターを H e L a 細胞中に構築する方法

変異させたエンベロープ遺伝子セグメントを、合成 S a l l - N t o I ポリリンカーをプラスミドの S a l l - S m a l 部位に導入することによって修飾した、p S C 6 5 ワクシニア発現ベクター中にサブクロニングした。このプラスミドは、合成初期 / 後期プロモーターおよび T K 遺伝子内に配置された l a c Z 遺伝子のコピーを有する。

20

リコンビナントワクシニアウイルスの選択は、アール (Earl) とモス (Moss) によって記載されている [ Current Protocols in Molecular Biology ( グリーン・パブリッシング・アンド・ウィリー - インターサイエンス、補遺 15、ユニット 16.15-16.18 ) ]。この文献の記載を本明細書の一部として引用する。即ち、 $1 \times 10^6$  の C V - 1 細胞をワクシニアウイルス株 W R で M O I 0 . 0 5 にて感染させた。これらの細胞は、N - 結合修飾 H I V - 1 エンベロープを含有する 1 0 ~ 2 0  $\mu$  g のワクシニア発現プラスミドでの感染 2 時間後にトランスファクトした。感染細胞は、ペレット化し、0 . 5 m l の M E M 中に再懸濁し、解凍し ( 3 回 )、逐次希釈して、その後のヒト T K - H e L a 細胞の感染において 1 つのプラークを形成するようにした。これらの細胞を軟寒天と共に 0 . 2 5  $\mu$  g / m l のデオキシプロモウリジンを含む培地中に加え、4 8 時間インキュベートした。プラーク培地、1 / 2 0 0 容積の 4 % X g a l ( ベーリンガー・マンハイム ) および 1 / 1 0 0 容積の天然赤色素 ( 1 0 m g / m l ) を含有する第二の軟寒天を重層した。一夜インキュベート後、リコンビナント候補群 ( 即ち T K - ブループラーク群 ) を選択し、0 . 5 m l の M E M 中に再懸濁し、追加のプラーク精製サイクルに付して処理した。ウイルス DNA を配列決定し、N - 結合変異の存在を確認した。

30

g p 1 2 0 または g p 1 2 0 / 4 1 を発現するリコンビナントウイルスの検証は、以下のようにして行った。H I V - 1 に対する収集血清を用いた全細胞免疫蛍光法、および二次 F I T C 接合抗 - ヒト I g G を用いて膜結合 g p 1 2 0 / 1 6 0 / 4 1 ( 即ち 1 6 0 の発現構築物 ) の存在を明らかにした。g p 1 2 0 のカルボキシ末端に対する抗体、H I V - 1 に対する収集ヒト血清、および F I T C 接合抗ヒト I g G を用いた抗原捕捉を行う E L I S A によって、g p 1 2 0 / 1 6 0 および g p 1 2 0 / 4 1 の両方を発現するウイルスから分泌された g p 1 2 0 を同定した。加えて、g p 1 2 0 / 1 6 0 または g p 1 2 0 / 1 6 0 / 4 1 の存在をウェスタンブロットングで確認した。N - 結合修飾 V3 タンパクの性状解析は、細胞性且つ可溶性の C D 4、0 . 5、一群の診断 V3 抗体、および抗 g p 4 1 に対するこのタンパクの結合能に関してなされるであろう。

40

本発明者らは、下記の 2 つの実施例に記載する方法に従って、変異体 g p 1 2 0 / 1 6 0 タンパクのグリコシル化状態を検証した。

#### 実施例 7

50

### 変異体 V 3 ドメインを示す g p 1 2 0 / 1 6 0 タンパクの N - 結合グリコシル化状態の検証方法

N - 結合オリゴ糖の翻訳後付加のための候補であるリコンビナント g p 1 2 0 / 1 6 0 タンパクに過剰な炭水化物部分が存在するかどうかを試験した。リコンビナントワクシニアウイルス（実施例 6）で感染させた S u p T 1 細胞の溶解産物中の g p 1 2 0 / 1 6 0 タンパクをレンチルレクチン親和反応で富化し、次いで V 8 プロテアーゼで部分的に開裂した。次に開裂産物を 4 ~ 2 0 % のポリアクリルアミドゲル上で S D S 存在下、電気泳動し、ウェスタンブロットティングに付し、V 3 特異抗体で可視化した。野性型 V 3 ドメインを示すタンパクに由来するペプチド断片は、見かけの分子量約 6 9 K D a で移動した。非グリコシル化変異体は、類似の移動度を示すと期待される。炭水化物部分の存在は、本アッセイにおいては、約 2 K D a に相当量、タンパク断片の移動を遅延化した。本発明者らによる結果から、変異体 1 ( R I R ) および 2 ( R G P ) は、野性型の V 3 ペプチド断片と同等の移動度を示すことがわかる。これとは異なり、変異体 3 ( F V T ) および 4 ( N M R ) は、ウェスタンブロットティングにおいてわずかに遅延した移動度を示した。これらの結果は変異体 3 と 4 の V 3 ドメインにおける過剰炭水化物部分の存在と合致する。さらに、変異体 3 と 4 に由来するペプチド断片の分子質量の大きい方へのずれは、このタンパクサンプルをグリコシダーゼで予備処理した時には無かった。この実験計画は、変異体 V 3 ドメイン 2 つが新規なグリコシル化修飾を受けることの決定的証拠を提供するものである。

10

#### 実施例 8

20

#### リコンビナント g p 1 2 0 / 1 6 0 の機能的完全性の検証方法

本発明者らは、天然の g p 1 2 0 / 1 6 0 が、標的細胞結合に関与するとともにリコンビナント g p 1 2 0 / 1 6 0 分子の機能上の完全性を評価するための設計アッセイへのエントリーにも関与していることを利用した。本発明者らは、リコンビナント H I V - 1 g p 1 6 0 N - 結合変異体を細胞中に発現させた。E L I S A アッセイによってこれらの変異体タンパクと溶解性 C D 4 レセプター分子との間の相互作用を試験した。各リコンビナントタンパクに対する g p 1 2 0 / 1 6 0 の濃度は、g p 1 6 0 の C 末端に対する抗体（インターナショナル・エンザイムズ・インク、カリフォルニア州ファルボック）と溶解 C D 4 による捕捉を利用する抗原捕捉 E L I S A プロトコールによって決定した。C D 4 の結合指標は、上記の比率（[ C 末端捕捉による g p 1 6 0 ] / [ C D 4 捕捉による g p 1 6 0 ]）を用いて、これを野性型について決定された比で除して計算した。結果を表 2 に示す。

30

表 2

## V 3 特異抗体 E L I S A

変異体	抗体		
	9 2 8 4	F 5 8 / H 3	0 . 5 β
WT	+++	+++	+++
1	+++	+++	+
2	+	±	-
3	+++	+++	-
4	+++	+++	-
1 : 3	+++	+++	++
1 : 4	+	+++	±
2 : 4	+	-	-
1 : 2 : 4	-	-	-
1 : 2 : 3 : 4	-	-	-

\* 野性型タンパクとの結合に対する、抗体と変異体タンパクとの相対結合は次式で計算した。  
 $\{ (\text{変異体測定濃度}) / (\text{野性型測定濃度}) \} \times 100\%$   
 +++ > 90%、++ 50~90%、+ 10~49%、- 1~9%、結合なし

表 2 の結果から、N - 結合部位指向変異物を有する全タンパクが CD 4 に結合したことがわかる。この表においては、結果は全て野性型の gp 1 6 0 タンパクに関して観察された結合レベルに対して正規化されている。位置 3 の変異体が CD 4 結合において最大の減少を示した。他の変異体は全て野性型エンベロープタンパクで観察されたレベルに比較的近い。この結果によって、独立した評価手段を用いた変異体の機能の完全性の調査が促された。

本発明者らはさらに、この gp 1 2 0 / 1 6 0 エンベロープ遺伝子の V 3 ドメインの中に N - 結合変異を保持するリコンビナント HIV - 1 ゲノムの生存可能性を試験することによって、N - 結合 gp 1 2 0 / 1 6 0 変異体の機能上の完全性を分析した。全部の N - 結合変異が完全な HIV - 1 ゲノムを担持するプラスミド中に導入された。これらの潜在的に感染性の分子クローンを Sup T 1 細胞にトランスフェクトした。感染性の存続可能性は、p 2 4 発現を監視して決定した。最初の p 2 4 スパイクの後、細胞を含有しない上清を未感染 Sup T 1 にトランスフェクトし、p 2 4 と融合細胞産生を監視した。単一種の変異体の 4 つ全てが生存可能である。gp 1 2 0 / 1 6 0 の V 3 ループへの多数のグリコシル化シグナルの導入の結果、全ウイルス構築物は生存可能性を有しなかった。これにより、gp 1 2 0 / 1 6 0 タンパクの V 3 ドメインにおける 1 つのグリコシル化シグナルモチーフの存在は、これがウイルスの生命力を弱める範囲まで gp 1 2 0 / 1 6 0 構造 (conformation) を破壊しない。

## 実施例 9

変異体 V 3 ドメインを有する gp 1 2 0 / 1 6 0 タンパクが改変された抗原特性を示すことを検証する方法

ウェスタンブロットティングプロトコルを用いて変異体 gp 1 2 0 / 1 6 0 タンパクの抗原プロファイルを評価した。異なるエピトープを野性型 HIV - 1 V 3 ドメイン内に認識する抗体試薬のパネルを図 7 の右側に示す。また、これらの試薬の抗原性標的を V 3 アミノ酸配列の下に図示する。当該抗原性標的は実施例 3 に記載のように、部位指向性突然変異誘発によって改変された V 3 ドメイン内の 1 以上の部位を含む。

図 7 において、変異体 1 : 2 : 3 : 4 はいずれの抗体によっても認識されなかった。その他の種類のあるいは多数の変異体は各種抗体との様々な反応性を示した。抗 - gp 4 1

10

20

30

40

50

抗体は全変異体に結合した。よって前述の実施例は、N-結合グリコシル化シグナルの付加によって抗体が免疫優性エピトープに結合する能力が改変されることを確認するものである。

リコンビナントワクシニアウイルス構築物で感染されたHeLa細胞の粗溶解産物(実施例6)を、野性型および変異体のgp120/160タンパクの供給源として用いて、抗体結合を研究した。レンチルレクチンセファロースカラムを用いた親和性クロマトグラフィーによって、高マンノース(manose)含有糖タンパクを富化した。結合糖タンパクは、-メチル-D-マンノース含有カラムから溶出させた。次いでこのタンパクをSDSの存在下、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ウェスタンブロッティングに付した。各種の抗体試薬を用いてプロットを調査(probe)し、野性型gp120/160分子中に 10  
見いだされる様々な抗原性標的の有無をアッセイした。全サンプルに対する抗gp41の染色強度を比較することにより、均一なサンプルローディング(実施)が確認された。抗V3試薬の何れによっても染色が無かったことは、実施に関する人工的変動要因からくるというよりむしろ、抗体がリコンビナント標的を認識する能力を有しないことが原因であると考えられる。

特定の抗体試薬によって認識されるエピトープの存在は、ウェスタンブロッティングにおける染色バンドの存在によって示される。陽性コントロールである野性型gp120/160は、予想されたように全てのV3特異抗体と結合する。逆に、1:2:3:4変異体の抗原特性は野性型のエンベロープ分子の抗原特性とは全く異なるものである。この変異体は、本発明者らの抗体試薬パネルによって検出されうる何れの野性型エピトープをも表示しない。これらの結果は、gp120/160糖タンパクの抗原構造を修飾するという本発明者らによる手法の有効性を裏付けるものである。 20

生来(native)の電荷の変更:

免疫優性エピトープを免疫弱化するための別の方法は、エピトープ上の生来の電荷を変更することである。これは免疫優性エピトープをコードする遺伝子の部位指向性突然変異誘発によって行うことができる。例えば、荷電されたアミノ酸を特徴とするコドンは、反対の電荷のアミノ酸あるいは非極性アミノ酸をコードするように変更することができる。同様に、非極性アミノ酸を特徴とするコドンは、正あるいは負のいずれかの電荷を有する極性アミノ酸に変更することができる。

N-結合グリコシル化シグナルの付加に関連して掲載した上記の各実施例におけるアプローチは、十分一般的なものであるので、適切に選択されたPCRプライマーを用いて各種の変異をgp120/160遺伝子配列のV3コドン部へと導入することができる。V3ドメインの全体としての正味正電荷に寄与するアミノ酸は荷電されていないかあるいは酸性の側鎖を有するアミノ酸で置換可能である。一具体例として図6に示すRIR部位を指向された変異体は、二つの正に荷電したアルギニン残基が非荷電アスパラギンおよびセリン残基によって置換されたものである。 30

抗体マスキングおよび免疫集中(focusing):

免疫応答を免疫優性エピトープから逸らすように再集中させるためのさらに別の方法においては抗体のマスキングを利用するが、このマスキングは、部分的にそのエピトープに結合して行う。同族の抗原ドメインと非可逆的に結合する抗体は、B細胞から見えないう 40  
に標的エピトープを覆い隠す(マスクする)ことができる。免疫応答は、そのような方略によってgp120/160/CD4結合ドメインのような、より保存されたドメインに集中する。例えば、V3特異抗体は、非可逆的に架橋可能で、その複合体は免疫原として現れる。また、非可逆的にgp120/160に結合したsCD4を出発免疫原として用いることもできる。この複合体に対抗して得られる抗血清は、gp120/160に非可逆的に結合することができる。これは、その分子上の非CD4結合ドメインに対して生じ 40  
じる一群の抗体を含む。これによってこの複合体は、免疫原として現れ、抗体をCD4結合ドメインに対して生じさせる。

同族の抗原ドメインに非可逆的に結合する抗体やその他のリガンドは、結合エピトープが免疫サーベイランスを受けないう、これをマスクすることができる。この方略を利用し 50

て、免疫応答を g p 1 2 0 / 1 6 0 の V 3 ループのような免疫優性エピトープから逸らして、g p 1 2 0 / 1 6 0 / C D 4 結合ドメインのようなより保存された分子領域へと集中させることができるであろう。

同族の抗原ドメインに非可逆的に結合可能な抗体、抗体断片、抗体アナログ、あるいはその他のリガンドは、結合したエピトープが免疫サーベイランスを受けないようにマスクすることができる。マスキングされた免疫原の生産と使用に基づくこの方略を利用して、免疫応答を g p 1 2 0 / 1 6 0 の V 3 ループのような免疫優性エピトープから逸らして、g p 1 2 0 / 1 6 0 / C D 4 結合ドメインのようなより保存された分子領域へと集中させることができるであろう。

#### 実施例 1 0

#### 第二の分子を抗原のそのドメインに非可逆的に結合することによる免疫優性エピトープのマスキング方法

H I V - 1 g p 1 2 0 に対するマスキングされた免疫原は、以下のようにして創製される。まず、レンチルレクチンセファロスクロマトグラフィーを用いて、野性型の H I V - 1 に感染した H e L a 細胞培養の上清から g p 1 2 0 を富化する。次いで、V 3 ループ内でエピトープを認識する部位特異性モノクローナル抗体を選択する。0 . 5 と称する抗体が、少なくとも 1 4 個のアミノ酸を包含する V 3 ループ内のエピトープに結合する。次に、適切に緩衝された 0 . 5 溶液と部分的に精製した g p 1 2 0 を合わせてチタス(Titus)らの方法に従って架橋させる [ J . Immunol . , 138 : 4018 - 4022 ( 1987 ) ] 。この文献の開示内容を本明細書の一部として引用する。適切な反応期間の経過後、サンプルを希釈して反応生成物をゲル濾過クロマトグラフィーで分離した。化学的に架橋した g p 1 2 0 / 0 . 5 対を含有するカラム分画を単離し、適切に緩衝された生理食塩水ベースの溶液に対して透析した。架橋複合体は、好適なアジュバンドと共に、標準的免疫プロトコールにおいて使用することができる。

マスキングされたデコトープの起爆（プライミング）と増強（ブースト）：

免疫弱化に関するさらに別のアプローチは、天然抗原への一次免疫に関するものである。例えば、好適に改変されたりコンビナントワクシニアでの感染により動物に天然の H I V - 1 エンベロープでプライミングすることができる。次いで、その動物を V 3 改変 g p 1 2 0 / 1 6 0 で増強して、二次応答を他のエピトープに向かわせることができる。

寛容化配列の挿入：

病原体でコードされた優性エピトープを免疫弱化するために用いることのできる別のアプローチとしては、その抗原の該当領域のアミノ酸配列を、ヒトの免疫系に寛容化されたタンパクモチーフで置換することもある。例えば、V 3 ループの天然のアミノ酸配列は、ヒト B 細胞に寛容化された配列と交換されることができる。これは、任意のヒト B 細胞エピトープを含んでもよいと定めることができる。このアプローチの目的は、病原体の抗原のセグメントがヒトの特徴を示すアミノ酸配列で置換されたような病原体抗原の変異形態のものを創製することにある。これによって、ヒトの免疫系は、もし本発明が適用されない場合は病原体抗原が優性エピトープとして作用病原体の抗原のその領域に対する強力な免疫反応の係止を回避するであろう。

#### 実施例 1 1

#### V 3 ループに寛容化されたヒトエピトープで置換された g p 1 2 0 / 1 6 0 タンパクを発現するリコンビナントワクシニアウイルス の構築

天然抗原の免疫優性ドメインが寛容化ヒト配列により置換されたキメラ状免疫弱化抗原を以下のようにして構築した。本発明者らは、まず、ヒトの免疫系が通常応答しないポリペプチドに対応する一続きのアミノ酸をコードする D N A 制限断片の単離から着手した。このために、ヒト I g M C H 3 ドメインのアミノ酸配列を使用した。このドメインの完全アミノ酸配列は、カバット (Kabat) による Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991) から入手可能である。D N A 制限断片を核酸クローンから単離して、好便に配置された制限部位が利用できるかどうかを確認する。あるいは、P C R プロトコールを用いて適切な制限部位をそのような核酸配列中に導入する。次にそのような D N A 断片を、

10

20

30

40

50

本明細書においてすでに記載した p G E M - B 2 - 1 2 0 および p G E M - B 2 - 1 6 0 プラスミド中に連結する。移植されたヒト抗原配列および g p 1 2 0 / 1 6 0 の翻訳リーディングフレームを保存するように特に注意する。このようにして、野性型 V 3 ドメインのかわりに寛容化ヒト配列が置き代わった置換物を有する修飾 g p 1 2 0 遺伝子カセットおよび修飾 g p 1 6 0 遺伝子カセットが創製される。次にこれらのカセットから得た S a l - N o t I 制限断片を上記の実施例 6 に記載した修飾 p S C 6 5 ワクシニアベクターへと移す。引き続いて、これらの遺伝子配列を、生存能を有するウイルス構築物へと標準法によって組み入れる。

以下の手続きでは実験動物としてモルモットを使用した。当業者はヒトに適用可能な同様のアプローチをもってこれを容易に改変実施できるであろう。

トロンピン開裂：

トロンピンは、H X 1 0 g p 1 2 0 / 1 6 0 を 1 ヲ所 で 開 裂 し て、V 3 ル ー プ の ア ミ ノ 酸 R と A の 間 の 切 断 に よ り 2 つ の 断 片 に す る [ ク レ メ ン ツ (Clements) ら、AIDS Res.Hum.Retroviruses 7:3-16(1991) ]。結合ドメインに上記のアミノ酸を有する中和抗体 ( 1 1 0 . 5 0 . 5 B ) は消化された上記ループには結合しない。その認識配列が直鎖状の完全体を維持するその他の V 3 結合抗体は、開裂されたループ ( 9 2 8 4 ) とやはり結合する。しかしながら、トロンピンでの長時間の処理は二次的部を開裂させ、他の開裂可能な部位に加えて 9 2 3 8 部位をも多少破壊する。よって、トロンピンによる開裂の制御によって V 3 エピトープの中和抗原性のある程度除去できる。

除去：

H I V - 1 e n v 遺 伝 子 を、5 つ の 定 常 ( C ) ド メ イ ン の 間 に 散 在 さ せ た 5 つ の 主 超 可 変 ( V ) 領 域 へ と ク ラ ス タ ー 化 し、C 1 - V 1 - V 2 - C 2 - V 3 - C 3 - V 4 - C 4 - V 5 - C 5 の パ タ ー ン を 得 た。コフィン(Coffin)は、g p 1 2 0 / 1 6 0 構 造 内 の ル ー プ が 分 子 の 機 能 上 の 性 質 と 干 渉 し な い よ う に 上 記 可 変 領 域 が 存 在 す る、と いう 仮 説 を た て た。このことは、g p 1 2 0 / 1 6 0 が 可 変 ド メ イ ン の 配 列 の 異 質 性 と は 無 関 係 に C D 4 に 結 合 す る こ と を 暗 示 し て い る。加えて、g p 1 2 0 / 1 6 0 の 可 変 ド メ イ ン は、免 疫 応 答 を よ り 保 存 さ れ た ド メ イ ン か ら 逸 ら す こ と に よ っ て ウ イ ル ス 株 間 の 抗 原 性 の 変 動 範 囲 に 寄 与 し 得 る。この仮説を検証するために、ヘイウッド(Haigwood)ら(上掲書)は、S F g p 1 2 0 / 1 6 0 の 可 変 領 域 群 を 系 統 的 に 除 去 し、こ れ ら の 除 去 タ ン パ ク を 酵 母 内 で 発 現 さ せ た。彼らは、これらの除去物を免疫原として使用することで、より保存されたエピトープをマスキングしないであろうと仮設した。この研究は、酵母内で発現された変性非グリコシル化物を用いて行われたが、より保存された中和応答を引き出すことができなかつた。更に、試験した除去変異体のいずれもが C D 4 に 結 合 し な かつ た。このことは、著者らが示唆しているように、g p 1 2 0 / 1 6 0 / C D 4 結 合 ド メ イ ン に 対 す る 免 疫 原 性 を 保 持 す る た め に は エ ン ペ ロ ー プ 糖 タ ン パ ク を 天 然 の 状 態 に 保 つ 必 要 が あ る か、あ る い は 上 記 グ リ コ シ ル 化 様 式 が 非 天 然 構 造 だ る こ と を 示 し 得 る。他の研究者らが独立して行った研究では、可変ドメイン V 1、V 2、V 3 を 除 去 し た 除 去 変 異 体 か ら の タ ン パ ク が な お C D 4 に 高 親 和 性 で 結 合 す る こ と か ら、C D 4 に 対 す る 結 合 に は g p 1 2 0 / 1 6 0 の 超 可 変 領 域 は 必 要 で な い こ と が 示 唆 さ れ て い る。C D 4 に 対 す る 結 合 が 明 ら か に 妨 害 さ れ な かつ た が、C D 4 と の 結 合 に 要 求 さ れ る V 4 お よ び V 5 超 可 変 ド メ イ ン を な お 担 持 す る こ の 除 去 体 タ ン パ ク は、g p 1 2 0 / 1 6 0 に 対 し て 得 ら れ た 抗 血 清 に は 結 合 し な かつ た。こ の こ と は 驚 く べ き こ と だ る、な ぜ な ら g p 1 2 0 / 1 6 0 / C D 4 結 合 ド メ イ ン に 対 し て 低 親 和 性 抗 体 が 得 ら れ る こ と が チ ャ ン グ (Chang) に よ っ て 報 告 さ れ て い る か ら だ る。よ っ て こ れ ら の デ ー タ が 示 唆 す る こ と は、V 4 お よ び V 5 が 非 免 疫 原 性 の ド メ イ ン だ る か、あ る い は 当 該 タ ン パ ク の 天 然 構 造 が 除 去 の 結 果 改 変 さ れ て 免 疫 血 清 が そ の 除 去 さ れ た タ ン パ ク を 認 識 で き な い か、の い ず れ か だ る と いう こ と だ る 及 び、後 者 の 可 能 性 が 高 い。そ れ に も か か わ ら ず、こ れ を 免 疫 原 と し て 使 用 す る こ と に は い くら か の 有 望 性 が 残 さ れ、そ れ は 免 疫 応 答 が 潜 在 的 に よ り 保 存 さ れ た g p 1 2 0 / 1 6 0 / C D 4 結 合 ド メ イ ン を 指 向 す る こ と が で き る た め だ る。

G . ワ ク チ ン

10

20

30

40

50

種々の免疫弱化学法についての前記の説明から理解されるように、本発明者らは、ワクチンの手法即ちHIV-1のgp120/160の免疫優性V3ループの免疫弱化学によるモデル系を利用した。しかし、当業者には容易に理解されるように、この手法は本明細書の開示に即して他の病原性有機体にも適用可能なものである。従って、有効なワクチン接種のための処方やプロトコルの開発について、以下HIV-1ワクチンに関連して説明する。但し記載は例示のためのものであり本発明の応用範囲を特定の病原性有機体に限定するものではない。

HIV-1ワクチンの最も効果的な設計は、このウイルスを首尾のよい病原体とした当該ウイルス独特の特徴を利用することによって達成される。HIV-1ウイルスが最初の部位において免疫系を欺くことを防ぐことがこの点における大きな進歩となるものである。よって、本発明者らは、免疫優性エピトープが免疫弱化学されているgp120/160免疫原を生産した。

10

HIV-1病原体によって採用されたと見られる生き残り戦略は、抗原性の変動を受け、ウイルスでコードされた優性なエピトープの表示に部分的に依存するものである。

HIV-1感染の経過において、感染した時と免疫応答発現との時間的なずれは、このウイルスに、誤りがちな逆転写酵素を用いてそのゲノムを複製する機会を与えてしまう。その結果、密接に関連してはいるが中和抵抗性である変異体のサブポピュレーションを出現させてしまうことになる。これらの変異体は、中和抗体の効果から逃れるばかりでなく、親ウイルスに対する抗原性の類似の結果、デコトープの抗原特性が変わっても当初の免疫応答を継続して刺激する。この現象の実際の効果は、交叉反応性によって最も早期のウイルスの表現型に対する免疫エフェクターの応答を継続して生成する指向された免疫刺激応答が締め出されることである。よって、免疫優性デコトープの機能は、免疫系を誘引して一層保存されかつ潜在的に広い範囲で中和するドメインに対して応答しないようすることである。この方略はHIV-1による継続した病原性誘発において非常に重要なものである。

20

gp120/160エンベロープ糖タンパクの第3の超可変ドメイン(V3)は、HIV-1の免疫優性エピトープであって、これは、中和抗体の第一の標的である。このドメインはその可変性にも関わらず、幾らかの保存された構造的な特徴を示す。V3ループは典型的には長さが35アミノ酸であって、ジスルフィド結合を形成していると考えられる2つのシステイン残基に結合している。V3ループは全体として正に荷電され、コンピュータ予測では、ループの頂点であると考えられる所にBターンシートを有する。

30

異なる各種のHIV-1単離物のタンパク配列同士を比較すると、このウイルスはgp120/160のV3ドメインにおけるアミノ酸配列の相当な変動を寛容化することができることと示される。前記ウイルスの生存可能性を危うくすることなくウイルスの免疫優性エピトープ中の配列変化を寛容化する上記能力は、中和表現型からの逃避に直接関連している。異なるV3ドメインを認識する抗体は、免疫化ドメインに対するタイプ特異性を示す。例えば、所与の株のV3ペプチドに対して生成した抗体はその株を中和するが、多くの場合、他のV3エピトープを示すウイルスを中和できない。様々に異なるV3特異性抗体が感染の経過の先の段階で出現するが、それらは感染の初期の期間においてはV3特異抗体を特徴付ける高力価には到達しない。その結果、変異体V3エピトープを指向する後期の体液性および/または細胞性仲介応答は、検査対象の同族ウイルス集団を捕らえるのに不十分である可能性がある。

40

gp120/160構造全体がV3ドメインのように柔軟で変化しやすいとは考えにくい。標的細胞の結合を行う能力および標的細胞に入り込む能力を含む、gp120/160分子に対する機能面での要求は、構造に対して制約を課すものである。gp120/160のCD4結合ドメインは、強く保存された構造を示すと思われる部位の一例である。gp120/160/CD4結合部位が免疫原性を有することを示しているエイズ患者から抗体を単離した。これにもかかわらず、gp120/160CD4結合部位に対する抗体は抗-V3抗体と比較して力価が非常に低い。よって、HIV-1はそのゲノム内容の一部を利用して宿主の免疫応答を惑わして囿のエピトープに向けさせ、より構造的に保存

50

された機能的なドメインから逸らすという仮説は条理にかなったものである。

V3のような可変領域エピトープに対して用意された免疫応答とは対照的に、本発明者らは、より保存されたエピトープに対する応答がウイルスの内転移を制限する可能性が非常に高いことを見いだした。HIV-1への中和応答の多くはV3ドメインおよびCD4結合ドメインに向けられている。今日までワクチンの試みは相同的な免疫的挑戦に耐えることができたに過ぎない。このことは、免疫応答が、免疫化株と侵入してきた(challenge)ウイルスとの構造を区別する優性可変エピトープに対するものであることを強く示唆している。この可変エピトープとしてもっとも可能性の高い候補はgp120/160分子上にあるV3である。

よって本発明者らの方法を用いて、通常では野性型HIV-1単離体のgp120エンペロープ糖タンパクの免疫優性V3ドメインに向けられる、強力な体液性および/または細胞性仲介免疫応答を弱めることができる。本発明者らの手法は、免疫原性を減じるためにV3ドメインの抗原構造を修飾することを含む。この手法の目的はgp120/160分子上のその他のエピトープに対する体液性免疫応答を高めることである。

B細胞はT細胞依存性あるいはT細胞非依存性の経路で抗原に反応する。どちらの場合においても、B細胞レセプターと同族の抗原エピトープとの間の初期相互作用の結果、増殖およびクローン拡大、抗体の親和性成熟、そして最後に高親和性、高特異性の抗体産生をもたらす。本発明者らは、gp120/160-V3とその同族B細胞クローンとの間の初期の相互作用を阻止することを提案する。しかし、同時にgp120/160に対する他のB細胞エピトープ、この構造的完全性V3特異性クローン拡大、さらに拡大、突然変異、および当該分子上の他のB細胞エピトープに対する特異性抗体産生を許容する。

リコンビナントgp120/160タンパク分子を哺乳類細胞中で発現させる一方法においては、実施例6に記載のように、ワクシニアウイルスの発現系を利用する。この発現系の数々の特徴の一つとして、各種リコンビナントタンパクをミリグラム量で生産することができる点が挙げられる。これらのタンパクは、その後、生化学的研究に利用できるとともに免疫原としても使用可能である。

本発明者らは、弱体化させた免疫優性エピトープを新規なワクチン戦略に使用できると予想している。各種の免疫処置経路によって免疫系の特定の分枝を選択的に刺激できるので、ここに記載の技術に基づく個々のワクチンもそれぞれ異なる投与ルートが必要とされるであろう。例えば、中和抗体産生に力点を置くワクチンデリバリーシステムは、もし問題の病原体が細胞性免疫応答によって最も良く戦われるならば、選択されるべき方法ではないであろう。このことは、デリバリーシステムの範囲は本ワクチン技術の新規応用の各件ごとに試験しなければならぬことを暗示している。免疫原の投与経路としては、アンドロップやスプレータイプの目薬による接種、鼻スプレーやエアロゾルの吸引、(経口)摂取、皮下、経皮、または筋肉注射、リコンビナントウイルスベクターによる感染、あるいは宿主細胞に入った後遺伝子発現を指向する裸のDNAの注入などが挙げられるがこれらに限定されるものではない。以下に記載の例は、ヒトのワクチン摂取プロトコルに利用し得る、リコンビナントワクシニアウイルスと精製されたリコンビナントサブユニットとによる方法の一例である。この例はあくまで一例であって、ヒトやその他の哺乳類のワクチン接種を行うのに免疫弱体化された優性エピトープに基づくリコンビナント剤をもってする唯一の手段であることを意味するものではない。

#### 実施例12

#### ワクチンプロトコルにおける、リコンビナントウイルスおよびgp120/160担持修飾V3ドメインの免疫原としての使用

HIV-1に曝される危険にあるヒトに対し、HeLa細胞中で増殖し次いでショ糖濃度勾配バンド法で精製した $10^7 \sim 10^{10}$  p f uの生リコンビナントワクシニアウイルス(実施例6)を皮下注射した。このウイルス調製物は、力価測定の前に冷等張生理食塩緩衝液に対して十分に透析した。同一の生ウイルスの第二回目の投与は4週間後に行った。この時の注射は最初の接種と同じ場所に行った。次に、精製リコンビナントgp120/160タンパクのサブユニットの追加免疫をフーらの記載にしたがって行い、中和抗体の産

10

20

30

40

50

生を高めた [ AIDS Res.Hum.Retroviruses 7:615(1991) ]。レンチルレクチン親和クロマトグラフィーによるリコンビナント糖タンパクの粗精製の後で、注射したタンパクもまた抗 gp 41 モノクローナル抗体を用いて親和クロマトグラフィーでほぼ均質になるまで精製した。冷等張生理食塩緩衝液に対して透析済の上記サブユニットタンパクは、最終濃度  $10 \sim 1000 \mu\text{g} / 200 \mu\text{l}$  の範囲に希釈し、完全フロイドあるいは ISCOM アジュバンド [ モレイン、 Immunol.Lett.25:281-83(1992) ] のいずれかと共に筋注した。ナラらの方法によって中和抗体力価の変化をアッセイした [ AIDS Res.Hum.Retroviruses 3/283-302(1987) ]。

以下の手続は、実験動物としてモルモットを用いて行ったが、同様の手法はヒトにも適用されうるであろう。

10

#### 実施例 13

#### リコンビナントワクシニアウイルスと体液性免疫応答の検出を利用するワクチン接種の開発

本発明者らは、実験動物中に HIV - 1 中和抗体応答を引き出す 2 部ワクチン接種プロトコルを通常的に用いている。まず、本発明者らは、モルモットに生リコンビナント gp 120 / 160 発現ワクシニアウイルスを  $10^7 \sim 10^8$  プラーク形成ユニット ( p f u ) 皮下注射する。生ウイルスの第二回目の投与は約 4 週間後に行う。この感染の効果は、注射した部位での小傷の外見で確認される。次に、本発明者らは、 $10 \mu\text{g}$  のレンチルレクチンセファロース精製した野性型あるいはリコンビナント gp 120 / 160 タンパクを上記動物に注射してサブユニット免疫原で 1 回追加免疫 (boost) する。

20

本発明者らは、体液性免疫応答を、血清サンプルが希釈可能であってかつ野性型 HIV - 1 で細胞のインビトロ感染を 90 % 中和する範囲で定量した。図 6 に示す部位指向変異を有するリコンビナントワクシニアウイルスに感染させた数対のモルモットの血清抗体価を表 3 に記載する。

表 3  
ウイルス中和アッセイ

抗血清	中和抗体価
WT	> 32
1	32
2	8
3	> 32
4	16
1 : 3	32
1 : 4	32
2 : 4	8
1 : 2 : 4	8
1 : 2 : 3 : 4	> 32
ワクシニアウイルス	効果なし
コントロール	効果なし

10

20

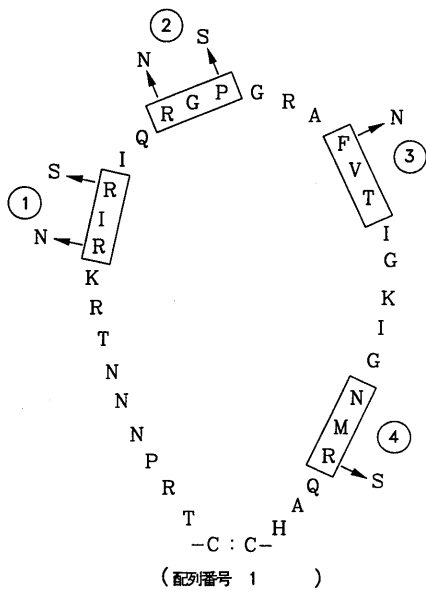
30

血清サンプルを採取し、感染 2 週間後に力価を測定した。ワクシニアコントロールで感染させた試験動物は、インビトロで HIV - 1 感染中和する抗体を引き出すことができなかったが、リコンビナントウイルス 1 : 2 : 3 : 4 による感染では、一匹の動物において中程度の力価、他方の動物においては本発明者らによる陽性コントロールと同等の力価が示された。従来の研究結果では 1 : 2 : 3 : 4 リコンビナントの変異 V 3 ドメインは野性型と比べて全く異なる抗原プロファイルを示すということが判っていることに鑑み、本実験の結果は意義あるものである。野性型と 1 : 2 : 3 : 4 変異体 gp 120 / 160 との間の抗原性の関連度が低いという前提で、表 3 の結果は、免疫弱化された変異体に対する体液性免疫応答は免疫優性 V 3 ループからそらされ、野性型と変異体 gp 120 分子の双方に存在する一層保存されたエピトープへと再指向させられる、というシナリオに合致するものである。

40



【 図 6 】  
FIG. 6



【 図 7 】

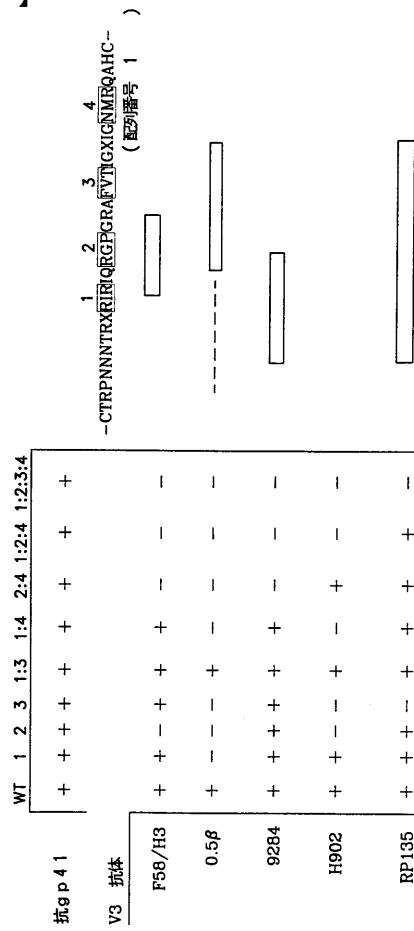


FIG. 7

## フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 加藤 和詳

(74)代理人

弁理士 西元 勝一

(74)代理人

弁理士 福田 浩志

(72)発明者 ギャリティー、ロバート アール.

アメリカ合衆国 21769 メリーランド州 ミドルタウン バレー ロード 8584

(72)発明者 ナラ、ピーター エル.

アメリカ合衆国 21701 メリーランド州 フレドリック サンセット ドライブ 6516

(72)発明者 ゴウトスミット、ヤープ

オランダ国 エヌエル 1105 ア 2 アムステルダム マイベルクドレエス 15 アカデ  
ミック メディカル センター内

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 特表平09-500614(JP,A)

Anders Bolmstedt et al., The Journal of General Virology, 1992年, Vol.73, Part12,  
p.3099-3105Sigvard Olofsson et al., Vaccines93 Modern approaches to new vaccines including preven  
tion of AIDS, Harold S.Ginsberg et al., 1993年, p.183-187

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/21

A61P 31/12

CA(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)

BIOSIS(STN)