

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-508279

(P2015-508279A)

(43) 公表日 平成27年3月19日(2015.3.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 14/155 (2006.01)	C07K 14/155	4B065
C07K 16/10 (2006.01)	C07K 16/10	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C087
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-554913 (P2013-554913)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月24日 (2012.2.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年10月18日 (2013.10.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/053185
 (87) 国際公開番号 W02012/113921
 (87) 国際公開日 平成24年8月30日 (2012.8.30)
 (31) 優先権主張番号 11382051.8
 (32) 優先日 平成23年2月25日 (2011.2.25)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/446,595
 (32) 優先日 平成23年2月25日 (2011.2.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500031124
 ラボラトリオス・デル・ドクトル・エステ
 ベ・ソシエダッド・アノニマ
 スペイン、エー08041バルセロナ、ア
 ベニーダ・マレ・デ・ドゥ・デ・モンセラ
 ット221番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIVGP-120 変体の迅速選択法

(57) 【要約】

本発明は、中和抗体に提示される表面ポリペプチドのランダム化変体を含む組換えウイルスのライブラリーの結合に基づく免疫原の迅速選択 (RIS) 法に関する。本発明はまた、ウイルスによって引き起こされる疾患の治療のための医薬における、および患者における中和抗体の同定のための診断における、本発明の RIS 法によって単離される免疫原の使用にも関する。

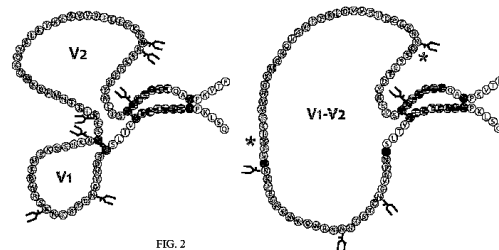


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H I V - 1 g p 1 2 0 の改変体またはその免疫原性フラグメントを含む、ウイルスに対する中和抗体を誘発し得るポリペプチドであって、該ポリペプチドが、配列番号 2 の位置番号に関して、C 1 3 1 Y、T 1 3 2 N、D 1 3 8 G および N 1 6 0 Y 変異を含むものであるか、または該ポリペプチドが、配列番号 2 の位置番号に関して、N 2 0 3 S および G 6 0 4 E 変異を含むものである、ポリペプチド。

【請求項 2】

ウイルスに対する中和抗体を誘発し得るポリペプチドであって、該ポリペプチドが、改変体 H I V - 1 g p 1 2 0 またはその免疫原性フラグメントを含み、該改変体 g p 1 2 0 またはその免疫原性フラグメントが、配列番号 2 の位置番号に関して、位置 8 8、1 3 1、1 3 2、1 3 8、1 6 0、1 9 1、2 0 3、2 2 6、4 7 9、5 0 7、6 0 4 および 6 4 7 からなる群から選択される位置に少なくとも変異を含むポリペプチドからなる群から選択されるものである、ポリペプチド。

10

【請求項 3】

前記変異が、N 8 8 D、C 1 3 1 Y、T 1 3 2 N、D 1 3 8 G、N 1 6 0 Y、N 1 9 1 D、N 2 0 3 S、A 2 2 6 V、M 4 7 9 I、R 5 0 7 W、G 6 0 4 E、および Y 6 4 7 N からなる群から選択されるものである、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントが、配列番号 4、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、および配列番号 3 1 からなる群から選択される配列を含むものである、請求項 3 に記載のポリペプチドまたはその免疫原性フラグメント。

20

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 6】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 7】

配列番号 3 の配列を有してなる、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 8】

請求項 7 に記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 6 に記載の発現ベクターを含んでなる、宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 6 に記載の発現ベクターを含んでなる、免疫原性組成物またはワクチン。

【請求項 11】

医薬に用いられる、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド、請求項 7 に記載の発現ベクター、または請求項 10 に記載の免疫原性組成物またはワクチン。

40

【請求項 12】

H I V 感染によって引き起こされる疾患の治療または予防に用いられる、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド、請求項 7 に記載の発現ベクター、または請求項 10 に記載の免疫原性組成物またはワクチン。

【請求項 13】

所定の病原体に対して特異的な中和抗体を試料中で検出する方法であって、該方法が：
(i) 前記試料を請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドと接触させる工程

50

と、

(i i) 前記ポリペプチドと前記中和抗体との間の免疫複合体の形成を検出する工程とを含んでなる、方法。

【請求項 1 4】

被検体におけるウイルス感染に対する中和抗体応答の検出方法であって、

請求項 1 3 に記載の方法を用いて中和抗体の存在を前記被検体において検出する工程を含んでなり、

コントロール被検体に対する前記被検体における中和抗体の存在を、前記被検体におけるウイルス感染に対する中和抗体応答の指標とする、方法。

【請求項 1 5】

10

前記ウイルスが HIV であり、前記ポリペプチドが請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の gp 1 2 0 変体ポリペプチドまたはそのフラグメントである、請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記試料が HIV - 1 感染患者由来のものであるか、または前記試料がエイズワクチンレシピエント由来のものである、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

ポリペプチドに対する中和抗体を誘発し得る免疫原の同定方法であって、該方法が：

(i) 前記ポリペプチドに特異的な中和抗体を組換えウイルスのライブラリーと接触させる工程であって、前記組換えウイルスの各々が、前記ポリペプチドの変体コードし、かつ前記ポリペプチドを発現するランダム化遺伝子を含むものである、工程と、

20

(i i) 中和抗体への結合能に基づき、中和抗体に結合する組換えウイルスのライブラリーのメンバーを、あまり結合しないメンバーから分離する工程と、

(i i i) 工程 (i i) で選択された組換えウイルスのライブラリーのメンバーに見出される変体ポリペプチドの配列を決定する工程と

を含んでなる、方法。

【請求項 1 8】

前記中和抗体が固定化されてなるものである、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

工程 (i i) で選択されたライブラリーのメンバーに関する、ウイルスの表面に提示される前記変体ペプチドの配列の決定が、中和抗体に結合するライブラリーのメンバー由来の遺伝物質を配列決定することにより行われる、請求項 1 7 または 1 8 に記載の方法。

30

【請求項 2 0】

ライブラリーのメンバーの分離が、結合メンバーの集団由来のウイルスの少なくとも 1 つのポリペプチドを定量することにより決定される、請求項 1 7 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記ウイルスポリペプチドがウイルスカプシドのポリペプチドである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

40

工程 (i i) で選択されたライブラリーのメンバーに関する、ウイルスの表面に提示される前記変体ペプチドの配列の決定が、中和抗体に結合するライブラリーのメンバー由来の遺伝物質を配列決定することにより行われる、請求項 1 7 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記ウイルスがレトロウイルスである、請求項 1 7 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記ランダム化遺伝子が env 遺伝子である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

50

前記レトロウイルスがHIVである、請求項23または24に記載の方法。

【請求項26】

工程(ii)で決定されたウイルスカプシドのポリペプチドがp24である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記中和抗体が4E10 mAb、2F5 mAb、b12 mAb、2G12 mAb、およびPG16 mAbからなる群から選択されるものである、請求項25または26のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、高い中和抗体(nAb)活性を誘発し得る免疫原の迅速な選択法に関する。nAb活性を増強するこれらの免疫原のいくつかの例が開示および例示される。特に、HIV-1 Envエピトープに対する抗体親和性を増加させる免疫原が開示される。

【背景技術】

【0002】

1982年以来、世界中で6000万人を超える人々がヒト免疫不全ウイルスに感染していると推定される。これらの感染者のほぼ半数が、この期間内に、結果として発症した後天性免疫不全症候群(エイズ)で死亡している。このウイルス伝播は、最近では横ばいであるように見えるが、2009年には250万人の新たなHIV感染者が報告された。HIVは今でも主要な公衆衛生問題である。UNAIDSレポート「世界のエイズ流行2010年版」を参照のこと。

20

【0003】

HIV-1は、これまでに報告されている最も遺伝的に多様なウイルス性病原体の一つである。HIV-1系統樹の3つの主要な枝、M(主系統)群、N(新型)群、およびO(分類外)群がある。M群のウイルスは最も広範に存在し、全世界の感染者の99%より多くを占める。この群は現在、主に短いenv(エンベロープ)遺伝子配列に基づき、9つの異なる遺伝的サブタイプまたはクレード(AからK)に分類されている。McCutchan F, AIDS 2000; 14(S3): S31~S44およびRobertson Dら, Science 2000; 288: 55~56を参照のこと。

30

【0004】

Envは最も多様なHIV-1遺伝子であり、クレード間で最大35%の配列多様性を示し、クレード内で20%の配列多様性を示し、そして一人の感染者において最大10%の配列多様性を示す。Kuiken Cら, AIDS 1996; 10: 31~37およびShankarappa Rら, J. Virol. 1999; 73: 10489~10502を参照のこと。クレードBは、欧州、米州、およびオーストラリアで優勢である。Kuiken Cら, AIDS 1996; Am. J. Epidemiol. 2000; 152: 814~822を参照のこと。クレードCは、南アフリカ、中国、およびインドで一般的であり、現在は他のいかなるクレードよりも多くの世界中の人々に感染している。McCutchan, 2000(前出)を参照のこと。クレードAおよびDは、中央および東アフリカで顕著である。

40

【0005】

しかしながら、多くのウイルスは、クレード間組換え体を生じる共流行ウイルスの一般的な混合のために、クレードに分類するのが難しい。Heyndrickx Lら, J. Virol. 2000; 74: 363~370およびMcCutchan Fら, Virology 1999; 254: 226~234を参照のこと。いくつかの組換え型は実際に、組換え型流行株(CRF)と呼ばれる重要な流行性系統を生じている。これらのうち最も一般的な2つは、CRF01(AE)(これはタイで発見され、当初はクレードEに分類されていたが、後にenvのみがクレードEでありゲノムの他の部分はクレードAであることが分かった)およびCRF02(西アフリカで一般的なAG組換え型)である。

50

Robertson, 2000 (前出)を参照のこと。世界的に、クレードAからD、ならびにCRF01 AEおよびCRF02 AG組換え体は、全世界の感染者の90%より多くを占める。

【0006】

ウイルスエンベロープタンパク質(Env)に対する中和抗体(nAb)は、感受性細胞の感染を阻止することによる、HIV-1曝露に対する適応免疫防御の最前線である。Kwong Pら, Nature 1998; 393: 648~659, Moore Jら, J. Virol. 1994; 68: 469~484, Moore Pら, J. Virol. 1996; 70: 1863~1872、およびParren Pら, AIDS 1999; 13: S137~S162を参照のこと。それぞれのウイルスに対するワクチンの効力は、nAbを誘発するそれらのワクチンの能力による。Burton D, Nat. Rev. Immunol. 2002; 2: 706~713およびZinkernagel Rら, Adv. Immunol. 2001; 79: 1~53を参照のこと。しかし、莫大な労力にもかかわらず、有効なHIV-1免疫原の開発に向けた進展はわずかである。Burton, 2002 (前出)、McMichael A, Hanke T, Nat. Med. 2003; 9: 874~880、およびMoore, 1996 (前出)を参照のこと。これらの免疫原の設計には、より良好なnAb応答を誘導し得るエピトープの同定が必要である。残念ながら、広域nAb応答を誘発する免疫原を開発しようとする全ての試みは、現在まで失敗に終わっている。

10

【0007】

従って、より良好なnAb応答を誘導し得る新しいHIV-1免疫原が当該分野で必要である。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、B細胞免疫原として用いられる場合に高いnAb活性を誘発し得る免疫原の迅速な選択(RIS)法に関する。この方法は、i) 目的の野生型エピトープの配列をコードするヌクレオチドをランダムに変異させて、上記エピトープの改変体のライブラリーを作製する工程と、ii) このライブラリーを、野生型エピトープに対して親和性を有することが知られている抗体またはその一部を用いて試験する工程と、iii) 抗体の親和性を高めるエピトープ改変体を選択する工程とを含む。好ましくは、エピトープはHIVエピトープである。より好ましくは、エピトープはEnvエピトープである。

30

【0009】

第二の実施形態において、本発明は、配列番号1および配列番号3のヌクレオチド配列のような、RIS法によって得られるヌクレオチド配列およびペプチドに関する。

【0010】

第三の実施形態において、本発明は、疾患の予防および治療のために、目的の野生型エピトープの作用によって完全にまたは部分的に誘導される、RIS法によって得られるヌクレオチド配列およびペプチドの使用に関する。好ましくは、疾患は、エイズまたはHIV感染によって引き起こされる疾患である。

40

【0011】

第四の実施形態において、本発明は、RIS法の診断的な使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明のRIS法を用いて同定される変異体の配列である。最上の配列は、AC10 gp160ポリペプチドのアミノ酸121~160に対応する。分離クローンにおける対応する領域の配列は、アミノ酸がAC10 gp160のアミノ酸と同一である場合に点で示し、または変異体の配列が野生型の配列と異なる場合にそれらの位置に対応するアミノ酸で示す。

【図2】4E10抗体とLR1-C1特異的変異体との間に提唱されている相互作用であ

50

る。env 遺伝子全体で、3つの潜在的なN結合型グリコシル化部位の欠失を含む11個のアミノ酸置換が示される。C131Y変異は、この置換がC131とC157との間の野生型のジスルフィド結合を除去してV1/V2ループの構造を破壊するため、特に関連性がある。

【図3】本発明によるRIS法を用いて同定されるLR1-C1ビリオンは、広域中和抗体4E10に対する親和性の増加を示す。グラフは、4E10抗体でコートされたかまたは未処理のいずれかのプレートへのAC10野生型分離株およびLR1-C1分離株の添加量を増加していくことによって決定される、4E10抗体でコートされたプレートへのビリオンの結合の滴定を示す。図は、野生型改変体と比較して、LR1-C1に対する4E10抗体の親和性が4倍増加していることを示す。

10

【図4】4E10抗体を用いて、本発明によるRIS法を使用して同定されるLR1-C1ビリオンは、他の広域中和抗体に対する親和性の増加を示さない。グラフは、抗体でコートされたかまたは未処理のいずれかのプレートへのAC10野生型分離株、LR1-C1分離株、またはenv遺伝子に欠失のあるビリオンの添加量を増加していくことによって決定される、2F5(パネルA)、2G12(パネルB)またはb12(パネルC)抗体でコートされたプレートへのビリオンの結合の滴定を示す。

【図5】AC10野生型HXB2配列に対する配列番号31のアラインメント。配列番号31は、PG16抗体に対して親和性を有する。改変配列は以下の2つの変異を示す：i)潜在的なグリコシル化部位におけるN203S、およびii)gp41免疫優勢領域におけるG604E。

20

【発明を実施するための形態】

【0013】

A. 免疫原の迅速選択(RIS)法

本発明は、HIV-1エンベロープタンパク質(env)を免疫原として最適化するための新しいアプローチに関する。このアプローチは、ビリオンへの曝露によって抗体を誘発するエピトープの能力を考慮している。この方法は、ランダムに変異したエンベロープタンパク質を有するビリオンのライブラリーからの、広域nAbに対してより高い親和性を有する改変体の選択に基づく。

【0014】

本発明によれば、HIV株AC10由来の全長env遺伝子を、PCRに基づく方法によってランダムに変異したエンベロープのライブラリーを作製するのに用いる。pNL4-3構成物へクローニングを行い、293T細胞への一過性トランスフェクションによってビリオンを得た。広域nAb 4E10に対してより高い親和性を有するウイルスの選択は、改良型の溶液中ビリオン捕捉アッセイによって行った。捕捉されたウイルス集団からRNAを抽出し、さらに配列決定およびpNL4-3構成物へ再度クローニングするために、逆転写PCRを行って対応するウイルスからenv遺伝子を得た。一回の選択の後、4E10抗体への親和性が4倍増加したエンベロープが分離された。実施例を参照のこと。

30

【0015】

従って、第一の態様において、本発明は、ポリペプチドに対する中和抗体を誘発し得る免疫原の同定方法であって、該方法が：

40

(i)前記ポリペプチドに特異的な中和抗体を組換えウイルスのライブラリーと接触させる工程であって、前記組換えウイルスの各々が、前記ポリペプチドの改変体をコードし、かつ前記ポリペプチドを発現するランダム化遺伝子を含むものである、工程と、

(ii)中和抗体への結合能に基づき、中和抗体に結合する組換えウイルスのライブラリーのメンバーを、あまり結合しないメンバーから分離する工程と、

(iii)工程(ii)で選択された組換えウイルスのライブラリーのメンバーに見出される改変体ポリペプチドの配列を決定する工程と

を含んでなる、方法に関する。

【0016】

50

本明細書で使用される場合、「免疫原」という用語は、個体において適応免疫応答を誘導し得る物質を示すことを意図し、上記適応免疫応答は、免疫学的特徴が免疫原と共通する病原体に有意に結合する免疫応答を誘導し得る。

【0017】

本発明で使用される場合、免疫応答に関して「誘発する」という用語は、免疫応答活性を特異的に制御するかまたはこれに影響を及ぼすことをいい、免疫応答を活性化すること、免疫応答を上方制御すること、免疫応答を増強すること、および/または免疫応答を変化させること（例えば、免疫応答の型を誘発することによって、被検体における免疫応答の流行型を有害または無効なものから有益または防御的なものへと順に変化させることなど）を包含する。

10

【0018】

「中和抗体」という用語は、病原体に結合し、その病原体が細胞に感染するおよび/または被検体において疾患を引き起こす能力を妨げる、任意の抗体またはその抗原結合フラグメントをいう。典型的には、本発明の方法で使用される中和抗体は病原体の表面に結合し、その病原体による感染を、当該（複数の）抗体の非存在下またはネガティブコントロールの存在下での病原体による感染と比較して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%だけ阻害または減少させる。次に、本明細書中に提供される任意の方法を用いて、これらのnAbが中和活性またはBNAb活性を有するか否かを決定するために試験され得る。非ヒト動物において中和抗体またはBNAbが増加した場合、ヒトへの投与に適した抗体を作製するために、非ヒトフレームワークからヒトフレームワークへCDR（相補性決定領域）を移動させ得る。抗体がnAbであるか否かを決定する方法は、当該分野で記載されている。Li Mら, *J. Virol.* 2005; 79: 10108~10125, Wei Xら, *Nature* 2003; 422: 307~312、および Montefiori D, *Curr. Protoc. Immunol.* 2005; Jan, Chapter 12: Unit 12.11を参照のこと。これらの方法は、レポーター遺伝子をコードするウイルスを用いた受容細胞株を用いる1回のウイルス感染後のレポーター遺伝子発現の減少の決定に基づく。

20

30

【0019】

本明細書で使用される場合、「ウイルス」という用語は、生物体の生細胞内でのみ複製し得る小さな感染因子をいう。本発明の方法で用いられ得るウイルスファミリーの非限定的な例としては、アデノウイルス科、アフリカ豚コレラ様ウイルス、アレナウイルス科、アルテリウイルス、アストロウイルス科、パキユロウイルス科、ビルナウイルス科、ブニヤウイルス科、カリシウイルス科、サーコウイルス科、コロナウイルス科、デルタウイルス、フィロウイルス科、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科、ヘペウイルス科、ヘルペスウイルス科、オルトミクソウイルス科、パラミクソウイルス科、ピコルナウイルス科（picomaviridae）、ポックスウイルス科（poxviridae）、レオウイルス科、レトロウイルス科およびラブドウイルス科が挙げられる。

40

【0020】

A.1 接触工程

第一の工程において、本発明の方法は、上記ウイルスの表面に提示されるポリペプチドに特異的な中和抗体を組換えウイルスのライブラリーと接触させる工程を含み、上記組換えウイルスの各々は、ウイルスの表面に提示される上記ポリペプチドの改変体をコードするランダム化遺伝子を含む。

【0021】

本明細書で使用される場合、「ライブラリー」という用語は、異なる組換えポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む多様なポリヌクレオチドの集合物または混合物をいう。本発明の方法で使用されるライブラリーのサイズおよび複雑度は異なってもよ

50

い。例えば、本発明の方法を用いて、500000までの異なるメンバーを有するライブラリー、あるいは 1×10^6 、 1×10^8 またはそれ以上のメンバーを有するライブラリーをスクリーニングし得る。典型的なウイルスライブラリーは $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{13}$ のメンバーを有し、このようなライブラリーは本発明の方法を用いてスクリーニングされ得る。実際に、このようなライブラリーが好ましいが、ずっと小さなライブラリー（例えば、1000～50,000、50～1000、または100～500、または10～100、または5～100メンバーを有するライブラリー）をスクリーニングするために本方法を用いることも明らかに可能である。改変体ライブラリーの多様性は、DNAトリプレットレベルでの改変体をコードする遺伝子の変異誘発により形成することができ、その結果、個々のコドンが多様化される（例えば、PCR反応において部分的にランダム化された配列のプライマーを用いることによって）。

10

【0022】

本明細書で分子のライブラリーをいう場合、この用語は、核酸またはタンパク質レベル（すなわち、コードされるタンパク質の発現が起こる前または後）でこのようなライブラリーをいうために使用され得る。しかしながら、明確には、このような発現ライブラリーは、相互作用結合パートナーの選択が起こるようにタンパク質レベルで存在しなければならない。従って、接触工程（a）がうまく起こるように、このライブラリーはタンパク質レベルで存在しなければならない（もっとも、初めは核酸レベルで存在してもよい）。

【0023】

好ましい実施形態において、ポリペプチドはウイルス中で発現され、このポリペプチドに対して中和抗体が工程（i）で用いられる。好ましい実施形態において、ポリペプチドは「ウイルスの表面に」提示される。本明細書で使用される場合、この用語は、ウイルス構造を破壊する必要なく抗体などの試薬に到達し得る任意のポリペプチドをいう。当然のことながら、表面に提示されるポリペプチドは、非エンベローブウイルスではカプシドポリペプチドであっても、エンベローブウイルスではエンベローブポリペプチドであってもよい。好ましい実施形態において、ウイルスの表面に提示されるポリペプチドはエンベローブポリペプチドである。

20

【0024】

組換えウイルス（該組換えウイルスの各々が、上記ポリペプチドの改変体をコードするランダム化遺伝子を含んでいる）のライブラリーを得るために、任意のウイルスエンベローブタンパク質が操作され得る。抗原の具体例としては、インフルエンザウイルス赤血球凝集素、ヒトRSウイルスG糖タンパク質、デングウイルスのコアタンパク質、基質タンパク質または他のタンパク質、麻疹ウイルス赤血球凝集素、単純ヘルペスウイルス2型糖タンパク質gB、ポリオウイルスI VP1、HIV-1またはHIV-IIのエンベローブもしくはカプシド糖タンパク質、B型肝炎表面抗原、ジフテリア毒素、連鎖球菌24Mエピトープ、淋菌ピリン、仮性狂犬病ウイルスg50（gpD）、仮性狂犬病ウイルスII（gpB）、仮性狂犬病ウイルスgIII（gpC）、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質H、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質E、伝染性胃腸炎糖タンパク質195、伝染性胃腸炎基質タンパク質、ブタロタウイルス糖タンパク質38、ブタバルボウイルスカプシドタンパク質、セルプリナ・ヒドジセンテリエ（*Serpulina hydodysenteriae*）感染防御抗原、ウシウイルス性下痢症糖タンパク質55、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集素ノイラミニダーゼ、ブタインフルエンザ赤血球凝集素、ブタインフルエンザノイラミニダーゼ、口蹄疫ウイルス、ブタコレラウイルス、ブタインフルエンザウイルス、アフリカブタコレラウイルス、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ（*Mycoplasma liyopneutii*）ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス、ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス糖タンパク質E、糖タンパク質G、伝染性喉頭気管炎ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス糖タンパク質Gまたは糖タンパク質I、ラクロスウイルス（*Lacrosse virus*）の糖タンパク質、新生仔ウシ下痢ウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス、プントロウイルス、マウス白血病ウイルス、マウス乳癌ウイルス、B型肝炎ウイルスコアタンパク質およびB型肝炎ウイルス表面抗原またはそ

30

40

50

のフラグメントもしくは誘導体、ウマインフルエンザウイルスまたはウマヘルペスウイルスの抗原（ウマインフルエンザウイルス A 型 / アラスカ 9 1 ノイラミニダーゼ、ウマインフルエンザウイルス A 型 / マイアミ 6 3 ノイラミニダーゼ、ウマインフルエンザウイルス A 型 / ケンタッキー 8 1 ノイラミニダーゼ、ウマヘルペスウイルス 1 型糖タンパク質 B、およびウマヘルペスウイルス 1 型糖タンパク質 D を含む）、ウシ R S ウイルスまたはウシパラインフルエンザウイルスの抗原、ウシ R S ウイルス付着タンパク質（B R S V G）、ウシ R S ウイルス融合タンパク質（B R S V F）、ウシ R S ウイルスヌクレオカプシドタンパク質（B R S V N）、ウシパラインフルエンザウイルス 3 型融合タンパク質、ウシパラインフルエンザウイルス 3 型赤血球凝集素ノイラミニダーゼ、ウシウイルス性下痢症ウイルス糖タンパク質 4 8、および糖タンパク質 5 3 から選択される抗原が挙げられる。

10

【0025】

好ましくは、組換えウイルスのライブラリーはレトロウイルスのライブラリーである。「レトロウイルス」という用語は、その RNA ゲノムから DNA を生成するために逆転写酵素により宿主細胞内で複製される、レトロウイルス科に属する任意の RNA ウイルスを意味する。

【0026】

「レトロウイルス」という用語は、本明細書で通常の意味で使用され、遺伝物質が一本鎖 RNA であり、宿主においてウイルス RNA を DNA に転写するために逆転写酵素を用いるウイルスのクラスを一般に包含する。本明細書で意図されるレトロウイルスは、詳細にはウイルスファミリーレトロウイルス科に属してもよく、より詳細にはオンコウイルス亜科、レンチウイルス亜科またはスプマウイルス亜科に属してもよい。本明細書で意図されるレトロウイルスは病原性であってもよい。Env 配列は、HIV、MuLV、SMRV、SFV、HPV、MMTV、SRVs、HTLV-I、HTLV-II、BLV、BIV、SIV、ピスナウイルス、EIAV、FIV、および EIAV を含むがこれらに限定されない任意の既知のレトロウイルス、および任意のレトロウイルス亜科（例えば、オンコウイルス亜科、レンチウイルス亜科、またはスプマウイルス亜科）に由来し得る。HIV-1 クローンを含む多くのレトロウイルスクローンは、十分に特徴付けされており、入手可能である。

20

【0027】

本明細書で特に意図されるのは、動物に感染するレトロウイルスであり、より好ましくは温血動物のレトロウイルスであり、さらにより好ましくは脊椎動物のレトロウイルスであり、さらにより一層好ましくは哺乳動物のレトロウイルスであり、さらになお一層好ましくは霊長類のレトロウイルスであり、そして最も好ましくはヒトのレトロウイルスである。本明細書で特に好ましいのは、HIV-1、HIV-2、HTLV-I および HTLV-2 を含むがこれらに限定されないヒトレトロウイルスである。HIV（および他のレトロウイルス）の配列情報の十分に確立されたりポジトリとしては、GenBank、EMBL、DDBJ および NCBI が挙げられる。十分に特徴付けされた HIV-1 クローンとしては、Hall-Lら, J. Virol. 1992; 66(9): 5553~5560 を参照のこと。

30

40

【0028】

好ましい実施形態において、組換えウイルスのライブラリーは、少なくとも 1 つの表面ポリペプチドのランダム化によって得られる HIV ウイルスのライブラリーである。本明細書で用いられる「HIV」という頭字語は、一般にヒト免疫不全ウイルスをいい、ヒト免疫不全ウイルス 1（HIV-1）およびヒト免疫不全ウイルス 2（HIV-2）のすべてのクレードおよび / または株を包含し、例えば HTLVIII および LAV などの HIV についての古い用語と同義である。

【0029】

より好ましい実施形態において、HIV ライブラリーの異なるメンバーは、env 遺伝

50

子においてランダム化される。本明細書で使用される場合、env 遺伝子という用語は、HIVのエンベロープタンパク質をコードするウイルスゲノムのポリヌクレオチドを示す。本明細書で使用される場合、「Envポリペプチド」または「エンベロープポリペプチド」という用語は、HIVエンベロープタンパク質に由来する分子をいう。HIVのエンベロープタンパク質は、約160kdの糖タンパク質(gp160)である。宿主細胞のウイルス感染中、gp160は宿主細胞のプロテアーゼにより切断されて、gp120および膜内在性タンパク質gp41を形成する。

【0030】

「gp120ポリペプチド」は、Envポリペプチドのgp120領域由来の分子である。成熟gp120野生型ポリペプチドは、一次配列に約500アミノ酸を有する。Gp120は高度にN-グリコシル化され、120kDの見かけの分子量を生じる。gp120のアミノ酸配列は、およそ511アミノ酸である。Gp120は、5つの可変ドメイン(V1~V5)が散在する5つの比較的保存されたドメイン(C1~C5)を含む。これらの可変ドメインは、大規模なアミノ酸置換、挿入および欠失を含む。「gp120ポリペプチド」は、単一サブユニットおよび多量体の両方を含む。gp41タンパク質は、ペリオンの膜二重層に係留され(且つ、これを貫通し)、一方gp120セグメントは周囲の環境に突出する。gp120のレセプター結合ドメインは、このタンパク質のN末端側の半分に局在している。この後に、融合機構に結合するレセプターに伝達するためのヒンジまたはトリガーのいずれかとして働くことが提唱されている、プロリンリッチ領域(PRR)が続く。gp120のC末端は高度に保存されており、gp41と相互作用する。wt gp160ポリペプチドの具体的な配列は入手可能である。GenBankアクセッション番号AAB05604およびAAD12142を参照のこと。

【0031】

env 遺伝子のランダム化は、env 遺伝子の完全な配列にわたって行われてもよく、好ましくはgp120のコード領域に相当するenv 遺伝子の一部にわたって行われてもよい。なぜならこれは、標的細胞上のレセプターと相互作用し、中和抗体に結合する最良の候補を構成する分子だからである。さらに、gp120をコードするenv 遺伝子の領域のランダム化は、gp120ポリペプチドの完全な配列にわたって行われてもよく、1つまたはそれ以上のドメインについて行われてもよい。従って、本発明によるRIS法は、gp120の任意の保存されたループ(C1~C5)、gp120の任意の可変ループ(V1~V5)、または保存領域と可変ループの好ましい組み合わせにおけるランダム化によって得られるHIVライブラリーの使用が考慮される。好ましい実施形態において、ランダム化はenv 遺伝子全体にわたって行われる。別の実施形態において、ランダム化はgp120に相当するenv 遺伝子の領域で行われる。別の実施形態において、ランダム化はgp120のV1および/またはV2領域に相当するenv 遺伝子の領域で行われる。

【0032】

任意の変異誘発技術を用いて、核酸分子に変異を導入し得る。Sambrook Jら、「Molecular Cloning. A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US, 1989)、Bishop Tら、「Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach」(IRL Press, Oxford, England, 1987)、Reznikoff W編、「Maximizing Gene Expression」(Butterworths Publishers, Stoneham, MA, US, 1987)、Davis Lら、「Basic Methods in Molecular Biology」(Elsevier Science Publishing Co., New York, NY, US, 1986)、Schleef M編、「Plasmid for Therapy and Vaccination」(Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany

10

20

30

40

50

2001), Adereth Yら, *Biotechniques* 2005, 38: 864~868, Allan Jら, *Biotechniques* 1995; 18: 746~750, Bubeck Aら, *J. Virol.* 2004, 78: 8026~8035, Doran B, *US Pat. Pub.* 20070111201, Locher Cら, *DNA Cell Biol.* 2005; 24: 256~263, Vasl Jら, *Biotechniques* 2004; 37: 726~730, Weiss Gら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 8950~8954, および Delcourt M, *US 6,924,112* を参照のこと。変異誘発ストラテジーとしては、ランダム変異誘発、Ala スキャン変異誘発、部位特異的変異誘発、およびキメラ組換えが挙げられる。変異誘発キットおよびサービスは、広く市販されている。

10

【0033】

「中和抗体」という用語は、BNA bのサブクラスを包含する。本明細書で使用される場合、「広域中和抗体」または「BNA b」は、有効量で送達される場合、7株より多いHIV、好ましくは8株、9株、10株、11株、12株、13株、14株、15株、16株、17株、18株、19株、20株より多いかそれ以上の株のHIVに対してHIV感染またはエイズの予防もしくは治療のための治療薬として用いられ得る、任意の方法によって得られる抗体と理解される。本発明によるRIS法に用いられるのに適した中和抗体としては、膜近位外部領域(MPER)に対して直接作用する抗体、CD4結合部位に対して直接作用する抗体、および高マンノースグリカンに対して直接作用する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、本発明によるRIS法に用いられるのに適した中和抗体としては、下記からなる群から選択される1つまたはそれ以上の抗体が挙げられる：

20

a) ウイルス膜に隣接したgp41外部ドメインのセグメントを認識する4E10抗体。Cardoso Rら, *Immunity* 2005; 22: 163~173, PHS Lアクセッション番号90.091703, NIH ARRRPカタログ番号10091, およびKatinger Hら, *US 5,753,503* を参照のこと；

b) ウイルス膜に隣接したgp41外部ドメインのセグメントを認識する2F5抗体。Ofek Gら, *J. Virol.* 2004; 78: 10724~10737, PHS Lアクセッション番号90.091704, NIH ARRRPカタログ番号1475, およ

30

c) HIV-1の2つの異なる抗原決定基に結合する、EP0822941に記載の抗体であって、これらの抗原決定基はgp160のフラグメントであり、HIV-1分離株BH10のプロセシングされたgp120のアミノ酸配列79~184および326~400に相当する。PHS Lアクセッション番号95032240および95032241を参照のこと；

d) gp120の表面外部に存在する糖質を認識する2G12(mAb 2G12)。Trkola Aら, *J. Virol.* 1996; 70: 1100~1108, EACCアクセッション番号93091517, およびNIH ARRRPカタログ番号1476を参照のこと；

40

e) CD4結合部位を認識するb12抗体。Burton Dら, *Science* 1994; 266: 1024~1027, NIH ARRRP カタログ番号2640およびBurton Dら, EP0675904を参照のこと；および

f) 中和抗体PG9、PG16、PG20、PGG14、およびPGC14。Chan-Hui Pら, *WO 2010107939* を参照のこと。

【0034】

抗体がnAbであるか否かを決定する方法は、当該技術分野で説明されている。これらの方法のいくつかは、レポーター遺伝子をコードする受容細胞株を用いた1回のウイルス感染後のレポーター遺伝子発現の、抗体の効果による減少の決定に基づく。Li, 2005, Wei, 2003, Montefiori, 2005(前出)、およびAlvin

50

C, WO 2009 117661を参照のこと。

【0035】

本発明により用いられる抗体の中和能は、IC50（すなわち、標的細胞の感染を50%減少させる抗体の濃度）によって特徴付けされ得る。好ましくは、本発明により用いられる中和抗体は、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下（ $0.15\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.125\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.10\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.075\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.025\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.02\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.015\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.0125\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.0075\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満、 $0.005\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満または $0.004\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満（抗体濃度 10^{-8} 以下、好ましくは 10^{-9}M 以下、好ましくは 10^{-10}M 以下、すなわち 10^{-11}M 、 10^{-12}M 、 10^{-13}M 以下）のIC50を有する。これは、インビトロでのHIVの臨床分離株の50%中和には、非常に低濃度の抗体しか必要としないことを意味する。力価は、当該技術分野で記載される標準的な中和アッセイを用いて測定され得る。

10

【0036】

接触工程は、中和抗体に特異的に結合し得る組換えウイルスのライブラリーのメンバーが、上記抗体に実際に結合するように、適切な条件下で行われる。

【0037】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」という用語（またはその派生語）は、結合ペア（例えば、2つのタンパク質または化合物）の間の相互作用をいう。いくつかの実施形態において、相互作用は、最大 10^{-6} モル/リットル、最大 10^{-7} モル/リットル、または最大 10^{-8} モル/リットルの親和定数を有する。一般に、「特異的に結合する」というフレーズは、ある化合物と別の化合物との特異的結合をいい、任意の標準アッセイ（例えば、イムノアッセイ）によって測定される結合のレベルは、アッセイのバックグラウンドコントロールよりも統計学的に有意に高い。

20

【0038】

接触工程中の条件は、当業者によって通例の方法で決定され得る。具体的な「接触」条件は、15分から4時間まで（例えば、4、37または室温で、1時間）のインキュベーションを含み得る。しかしながら、これらの条件は、例えば、相互作用する結合パートナーの性質などによって、適切に変動され得る。試料は、必要に応じておよび好ましくは、穏やかな振動、混合または回転に付され得る。さらに、非特異的結合を減少させるブロッキング剤のような他の適切な試薬が添加され得る。例えば、1~4%BSAまたは他の適切なブロッキング剤（例えば、ミルク）が用いられ得る。しかしながら、接触条件は、スクリーニング法の目的に応じて、当業者によって変動および適合され得ることが理解される。例えば、インキュベーション温度が、例えば室温または37である場合、これらの条件下で安定なバインダー（例えば、37でのインキュベーションの場合、ヒトの体内で見出される条件下で安定なバインダー）を同定する可能性が高くなり得る。このような性質は、一方または両方の結合パートナーが何らかの治療用途に用いられる候補（例えば、抗体）である場合、極めて有利であり得る。このような適合は、当業者の範囲内である。

30

【0039】

好ましい実施形態において、接触工程で用いられる中和抗体は、当業者に公知の種々の技術を用いて固体支持体上に固定化することができ、これらの技術は特許および科学文献に十分に記載されている。固体支持体は、抗体が付着され得る、当業者に公知の任意の物質であり得る。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレートのテストウェルまたはニトロセルロースフィルターもしくは他の適切な膜であってよい。あるいは、支持体は、ビーズまたはディスク（例えば、ガラス、ガラス繊維、ラテックス、またはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニルのようなプラスチック材料）であってよい。支持体はまた、磁性粒子または光ファイバーセンサーであってよい。Jorgenson Rら、US 5,359,681を参照のこと。

40

【0040】

50

抗体は、当業者に公知の種々の技術を用いて固体支持体上に固定化することができ、これらの技術は特許および科学文献に十分に記載されている。本発明に関して、固定化は、非共有結合性会合（例えば、吸着）および共有結合（これは抗原と支持体上の官能基との間の直接結合であっても、架橋剤による結合であってもよい）の両方を包含する。マイクロタイタープレート中のウェルへのまたは膜への吸着による固定化が好ましい。このような場合、吸着は、抗体を、適切な緩衝液中で、固体支持体と適切な時間接触させることによって達成され得る。接触時間は温度によって変化するが、典型的には約1時間から1日の間である。一つの実施形態において、プラスチックマイクロタイタープレート（例えば、ポリスチレンまたはポリ塩化ビニル）のウェルと、約10 ng ~ 約1 μg、好ましくは約100 ~ 200 ngの範囲の量の抗体との接触は、適切な量のポリペプチドを固定化するのに十分である。

10

【0041】

抗体の固体支持体への共有結合はまた、支持体を、支持体と抗体上の官能基（例えば、ヒドロキシル基またはアミノ基）の両方と反応する二官能性試薬と最初に反応させることによって達成されてもよい。例えば、抗体は、周知の技術を用いて、ベンゾキノンを用いるか、または支持体上のアルデヒド基と結合パートナー上のアミンおよび活性水素との縮合によって、適切なポリマーコーティングを有する支持体に共有結合的に付着され得る。

【0042】

あるいは、共有結合的または非共有結合的のいずれかで支持体に中和抗体を固定化する代わりに、本発明は、Fcまたは抗Fc抗体フラグメントに特異的な一次抗体（これは先に支持体に固定化されている）へ結合させることによって抗体を固定化する可能性を考慮する。抗体の捕捉を補助することに加え、一次抗体は、ウイルスライブラリーのメンバーへの結合に有効な固定化抗体の割合が増加するように中和抗体を方向付ける。例えば、固定化は、中和抗体試料への親和性を示すライブラリーのウイルスが固定化抗体に結合できるように、固体支持体（通常、マイクロタイタープレートのウェル）上に固定化されている抗体をライブラリーと最初に接触させることによって実施され得る。非結合の試料は、次いで固定化抗体-ウイルス複合体から除去される。より詳細には、一旦抗体が上記のように支持体上に固定化されると、支持体上の残りのタンパク質結合部位は通常ブロックされる。

20

【0043】

A.2 分離工程

第二の工程において、本発明のRIS法は、中和抗体への結合能に基づき、中和抗体に結合する組換えウイルスのライブラリーのメンバーを、あまり結合しないメンバーから分離する工程を含む。

30

【0044】

上記分離工程は、反応混合物からの固相の物理的分離（例えば、ビーズまたはFACS）または除去を言ってもよく、あるいは反応混合物の他の成分を除去するために固相が一回以上の洗浄工程に付される工程を言ってもよい。固相の物理的分離または除去が行われる実施形態において、次いで、好ましくは、固相は一回以上の洗浄工程にも付される。

【0045】

洗浄工程は、固相およびそれに付着している相互作用結合パートナーの性質に応じて、任意の適切な方法で行われ得る。粒子状固相の洗浄の適切な方法は、当業者に周知である。例えば、固相が粒子状である場合、洗浄工程は、上清が除去されつつ粒子がペレットを形成するような条件下で粒子を遠心分離することによって行われ得る。次いで、粒子は適切な水性媒体（例えば、接触工程で用いたものと同じ媒体）中に再懸濁され得る。洗浄（または実際には、接触工程）のストリンジェンシーは、例えばバックグラウンドまたは非特異的結合を減少させるために、当業者に周知の適切な試薬（例えば、Tween）を添加することによって変更され得る。このようなペレット形成および再懸濁の工程は、一回の洗浄を構成する。任意の適切な回数 of 洗浄が行われ得る。しかしながら、固相が磁性である場合、洗浄工程は、接触工程が行われている容器に磁場をかけ、上清を除去して固相

40

50

を適切な水性媒体中に再懸濁することによって便宜的に行われ得る。このような磁気分離および再懸濁の工程は、一回の洗浄工程を構成し、任意の適切な回数 of 洗浄が行われ得る。固相が非粒子状である（例えば、プレート、ディッシュまたはフィルターのような平面である）場合、このような固相を洗浄する適切な方法もまた当業者に周知である。

【0046】

上記の任意の洗浄工程と同様に、一回またはそれ以上の洗浄工程はまた、RIS法における任意の他の適切な段階でも行われ得ることに留意すべきである。例えば、固相を洗浄する一回またはそれ以上の工程はまた、任意の固定化工程が行われた後に、例えば、固相に結合していない中和抗体を除去するために行われてもよい。実際に、このような洗浄工程は好ましい。また、一回またはそれ以上の洗浄工程は、例えば非結合物質を除去する方

10

【0047】

一旦、中和抗体に弱く結合するかまたは非特異的に結合する反応混合物の成分が除去されると、分離工程は最後に、中和抗体に特異的に結合する組換えウイルスのライブラリーのメンバーを溶出することによって行われる。固定化のタイプに応じて、上記溶出工程は、任意の適切な方法によって（例えば、アルカリ、界面活性剤、または非共有結合を破壊する同様の化学物質を用いることによって）行うことができ、続いて相互作用パートナーがリフォールディングされて互いに結合できるように中和される。ピオチン標識の場合、一般に、このような標識を含むライブラリー構築物は、プロテアーゼ部位、制限酵素部位、またはジチオスレイトール（DTT）で開裂され得る切断可能なS-Sリンカー部分のような、ある種の切断部位を含むように操作される。TEAも用いられ得る。上記のような切断部位は、溶出を可能または容易にするために、任意の型の標識と共に用いられ得る。

20

【0048】

溶出工程の結果として起こる中和抗体からのウイルスの遊離は、典型的には、上清中の一つまたはそれ以上のウイルスポリペプチドの存在を測定することによって行われ得る。好ましい実施形態において、アッセイされるポリペプチドはウイルスカプシドポリペプチドである。特にHIVライブラリーが用いられる場合、本明細書に示される実施形態での使用に適切であり得るHIVタンパク質の非限定的な例としては、HIV gagタンパク質 p53、p24、p17、p7、p6、p2またはp1、HIV env糖タンパク質 gp120、gp41またはgp160、HIV酵素（インテグラーゼ（p31）、逆転写酵素（p51またはp66）、RNase H（p15）、プロテアーゼ（p10）を含む）、HIV nefタンパク質（p25/p27）、HIV vifタンパク質 p23、HIV revタンパク質 p19、HIV vprタンパク質（p12/p10）、HIV vpuタンパク質（p16）あるいはHIV tatタンパク質（p16/p14）が挙げられる。好ましい実施形態において、選択されたウイルスが中和抗体から効率的に溶出されているか否かを立証するためにアッセイされるHIVポリペプチドは、p24である。

30

【0049】

本明細書で使用される場合、「HIV p24」という用語は、約24,000ダルトンの見かけの相対分子量を有するとして特徴付けられるHIVのgag領域の遺伝子産物をいう。「HIV p24」という用語はまた、p24の免疫学的活性を有するp24の改変物およびフラグメントもいう。

40

【0050】

P24は酵素免疫アッセイで測定され得るのに対して、結合p24の検出は、複合体を解離するために酸による前処理を必要とする。手順は製造業者によって異なるが、HIV p24抗原試験は、抗体ではなく抗原を検出するように改変したELISA技術を用いる。例えば「抗体サンドイッチ」型のような代表的なアッセイにおいて、HIV p24に対する特異的モノクローナル抗体は固相（マイクロタイタープレートウェルまたはポリ

50

スチレンビーズ)に付着され、添加された試料中のウイルス抗原を「捕捉」するように働く。界面活性剤(例えば、トリトンX100)を添加してビリオンを破壊し、そして抗原が媒体中に存在すれば、抗原は固相上のモノクローナル抗体に付着する。

【0051】

A.3 検出工程

第三の工程において、本発明によるRIS法は、工程(i i)で選択されるライブラリーのメンバーに関してウイルスの表面に提示される上記改変体ペプチドの配列を決定する工程を包含する。

【0052】

一旦、ウイルスライブラリーの一組またはそれ以上の相互作用メンバーが、本発明の方法に従って選択または単離されると、これらはさらなる分析に付される。上記さらなる分析または使用には、一般に、中和抗体から脱離、除去、単離または溶出され、そしてさらに発現または生成されるための候補結合パートナーが必要である。従って、本発明の方法は、中和抗体と特異的に相互作用し得るウイルスライブラリーの上記メンバーが、互いからの単離において脱離、除去、溶出、または好ましくは単離、あるいは発現または生成される工程をさらに包含する。上記さらなる分析は、一般に、結合ウイルスからのRNAの単離、ウイルスRNAをcDNAへ逆転写すること、および上記cDNAを適切な発現ベクターにクローニングすることによる、個々の相互作用ライブラリーメンバーの単離を含む。

10

【0053】

一旦、結合パートナーをコードするDNAが適切な発現ベクターにクローン化されると、結合パートナーをコードするDNAが配列決定され得るか、またはタンパク質が可溶性で発現されて、タンパク質レベルで候補をさらに特徴付けするために適切な結合試験に付され得る。適切な結合試験は、結合パートナーの性質によって決まり、ELISA、フィルタースクリーニングアッセイ、FACSまたは免疫蛍光アッセイ、BiaCore親和性測定または結合定数を定量するための他の方法、組織スライドまたは細胞の染色および他の免疫組織化学的方法が挙げられるが、これらに限定されない。このような方法は文献において十分に確立されており、一つまたはそれ以上のこれらの方法は、選択されたエンペロータンパク質改変体を分析するのに用いられ得る。

20

【0054】

上記のように、個々の相互作用結合パートナーを分析するのに適した方法は、当該技術分野で公知である。一つの好ましい方法は、中和抗体に特異的に結合するライブラリーのウイルスの遺伝物質を配列決定することである。

30

【0055】

典型的には、RNAを遺伝物質として有するレトロウイルスの場合、検出工程は、RNAの単離、一本鎖cDNAを得るためのRNAの逆転写、二本鎖DNAを得るための一本鎖DNAの処理、および最適ベクターへの二本鎖cDNAのクローニング、およびcDNAの配列決定を含む。

【0056】

逆転写は当業者に公知の方法を用いて行われ、等温的に、かつRNA依存性DNAポリメラーゼ(AMV、クローン化AMV、MMLV、Superscript II、Reverse Transcriptase、Tth逆転写酵素、B型肝炎逆転写酵素、カリフラワーモザイクウイルス逆転写酵素、細菌逆転写酵素、およびThermoscriptが挙げられるが、これらに限定されない)の存在下で耐熱性RNAポリメラーゼを用いることによって、行われ得る。本発明で利用される酵素としては、RNase H活性が低減されたか、実質的に低減されたかまたは完全に除去された酵素が挙げられる。「実質的に低減されたRNase H活性」を有する酵素とは、対応する野生型またはRNase H+酵素(例えば、野生型モロニー Maus 白血病ウイルス(M-MLV)、トリ骨髄芽球症ウイルス(AMV)またはラウス肉腫ウイルス(RSV)逆転写酵素)の約20%未満、好ましくは約15%未満、10%未満または5%未満、そして最も好ましくは約2%未満のRNase

40

50

H活性を有する酵素を意味する。任意の酵素のRNase H活性は、多様な公知のアクセシによって決定され得る。Kotewicz Mら, Nucl. Acids Res. 1988; 16: 265~277, Gerard Gら, Focus 1992; 14(5): 91~93、およびKotewicz Mら、US5, 244, 797を参照のこと。本発明における使用に特に好ましいポリペプチドとしては、M-MLV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、RAV(ラウス関連ウイルス)逆転写酵素、MAV(骨髄芽球症関連ウイルス)逆転写酵素、およびHIV逆転写酵素が挙げられるが、これらに限定されない。Kotewicz Mら、US5, 244, 797、およびGerard Gら、WO1998047912を参照のこと。しかしながら、リボ核酸分子からDNA分子を生成し得る(すなわち、逆転写酵素活性を有する)任意の酵素が、本発明の組成物、方法およびキットに等しく用いられ得ることは当業者に理解される。

10

20

30

40

50

【0057】

一本鎖cDNAは、当該技術分野で公知の任意の方法を用いて二本鎖DNAを得るために処理され得る。好ましくは、一本鎖cDNAの二本鎖DNAへの変換は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、核酸配列ベース増幅(NASBA)、鎖置換増幅(SDA)、転写媒介増幅(TMA)、分岐DNA技術(bDNA)、リンカー補助DNA増幅(LADA)、Qベータレプリカーゼ増幅(Qベータ)、ループ媒介等温増幅(LAMP)およびローリングサークル増幅技術(RCAT)のようなインビトロ増幅技術、または他のインビトロ酵素的増幅技術を用いて行われる。増幅工程は、アダプター領域の配列に対応するプライマーを用いて行われる。得られた二本鎖DNAは、精製カラム(プライマーが付着する電磁ビーズ)を用いるか、またはアガロースゲルでの電気泳動によって精製され得る。

【0058】

得られた二本鎖DNAは、次いで、当該技術分野で公知の方法を用いて最適ベクターに挿入され得る。好ましい実施形態において、PCR増幅工程で用いられるプライマーは、その5'領域内に、最適ベクターに存在する部位にコンパチブルな末端を生成する制限エンドヌクレアーゼ標的部位を含む。エンドヌクレアーゼ標的部位により、ポリヌクレオチドを適切なベクターにクローニングするのに用いられ得る付着末端の生成が可能になる。

【0059】

配列決定工程は、例えば化学配列決定(Maxam-Gilbert)、Sangerジデオキシ配列決定、パイロシーケンシング、蛍光検出配列決定および質量分析DNA配列決定のような任意の公知の配列決定手段を用いて行われ得る。

【0060】

B. 免疫原性ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクターおよび宿主細胞

本発明による免疫原の迅速選択(RIS)法により、ウイルスの表面に提示されるポリペプチドの改変体であり、中和抗体を生成するための(従って、免疫原性組成物またはワクチンとして用いるための)候補である、ポリペプチドの同定が可能になる。従って、別の態様において、本発明は、本発明の方法により同定されるポリペプチドに関する。

【0061】

本明細書でタンパク質と同義的に使用される「ポリペプチド」という用語は、異なるアミノ酸がペプチド結合またはジスルフィド架橋によって互いに連結されている、任意の長さのアミノ酸の鎖をいう。

【0062】

本発明の方法により選択されるウイルスがレトロウイルスである特定の場合において、ポリペプチドは、エンベロープタンパク質の改変体である。好ましい実施形態において、レトロウイルスはHIVであり、本発明によるポリペプチドはgp120改変体である。

【0063】

本発明のRIS法により同定されるポリペプチドは、好ましくは、C1定常領域、V1可変領域、V2可変領域、C2定常領域、C5定常領域およびgp41外部ドメインからなる群から選択される領域に少なくとも1つの変異を含む。

【0064】

より好ましい実施形態において、C1定常領域における変異は、位置88での変異である。より好ましい実施形態において、位置88での変異残基はAspである。さらにより好ましい実施形態において、C1定常領域における変異は、N88D変異である。

【0065】

より好ましい実施形態において、V1可変領域における変異は、位置131、132および138からなる群から選択される1つまたはそれ以上の位置での変異である。より好ましい実施形態において、V1領域における位置131、132および138での変異残基は、それぞれY、Nおよび/またはGである。さらにより好ましい実施形態において、V1領域における変異は、C131Y、T132Nおよび/またはD138Gである。

10

【0066】

より好ましい実施形態において、V2可変領域における変異は、位置160および187からなる群から選択される1つまたはそれ以上の位置での変異である。より好ましい実施形態において、V2領域における変異残基は、位置160でYおよび/または位置187でAspである。さらにより好ましい実施形態において、V2領域における変異は、N160Yおよび/またはN191Dである。

【0067】

より好ましい実施形態において、C2定常領域における変異は、位置219での変異である。より好ましい実施形態において、C2領域における位置219での変異残基はValである。さらにより好ましい実施形態において、C2領域における変異は、I219V

20

【0068】

より好ましい実施形態において、C5定常領域における変異は、位置479および507からなる群から選択される1つまたはそれ以上の位置での変異である。より好ましい実施形態において、C5領域における位置479および507での変異残基は、それぞれIleおよびTrpである。さらにより好ましい実施形態において、C5領域における変異は、M475Iおよび/またはR507Wである。

【0069】

より好ましい実施形態において、本発明変異体によるgp120改変体またはそのフラグメントは、C131Y、T132N、D138GおよびN160Y変異を有する。

30

【0070】

より好ましい実施形態において、本発明変異体によるgp120改変体またはそのフラグメントは、N88D、C131Y、T132N、D138G、N160Y、N191D、A226V、M479I、R507WおよびY647N変異を有する。

【0071】

別の実施形態において、本発明によるgp120改変体またはそのフラグメントは、N203SおよびG604E変異を有する。

【0072】

より好ましい実施形態において、gp41外部ドメインにおける変異は、T643Nである。

40

【0073】

上記の位置番号は、配列番号2に示される、HIV AC10HXb2分離株のenv遺伝子(配列番号1)によってコードされるgp160タンパク質前駆体の配列をいい、これは配列番号1に示されるenv遺伝子によってコードされる。Li, 2005(前出)およびNCBIアクセッション番号AY835446を参照のこと。

【0074】

好ましい実施形態において、本発明による免疫原性ポリペプチドは、配列番号3のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントによってコードされる、LR1-C1分離株のenvポリペプチド(配列番号4)を含む。LR1-C1分離株は、配列番号2の位置番号に関して、N88D、C131Y、T132N、D138G、T132N、N160Y、N

50

191D、A226V、M479I、R507WおよびY647N変異を含む。

【0075】

好ましい実施形態において、本発明による免疫原性ポリペプチドは、PG16抗体を用いて単離されたクローン10のenvポリペプチド(配列番号31)またはそのフラグメントを含む。改変配列は、N203SおよびG604E変異を示す。

【0076】

好ましい実施形態において、本発明による免疫原性gp120改変体またはそのフラグメントは、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、および配列番号31からなる群から選択される配列を含む。

10

【0077】

中和抗体に対してより高い親和性を示すgp120変異体が本明細書で決定されており、AC10 HIV分離株から誘導されているが(NCBIアクセッション番号AY835446および配列番号1で示されるenv遺伝子)、本発明による免疫原性ポリペプチドは、他のHIV分離株から、該他のHIV分離株のenv遺伝子の対応する位置を置換することによって誘導され得ることが理解される。他のHIV分離株の対応する位置は、任意の適切な配列アラインメントアルゴリズムを用いて苦もなく決定され得る。

【0078】

比較のための配列のアラインメントの方法は、当該技術分野で周知である。比較のために最適な配列のアラインメントは、例えば、Smith-Waterman局所相同性アルゴリズムによって、Needleman-Wunsch相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson-Lipman類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実行によって、または手動アラインメントおよび目視検査によって行われ得る。Smith T, Waterman M, Adv. Appl. Math. 1981; 2: 482~489; Needleman S, Wunsch C, J. Mol. Biol. 1970; 48: 443~453; Pearson W, Lipman D, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 2444~2448; GAP, BESTFIT, FASTAおよびTFASTAプログラム, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, US; Ausubel Fら編, 「Short Protocols in Molecular Biology」, 第4版(John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, US)を参照のこと。

20

30

【0079】

「フラグメント」は、親配列よりも長さが短い本発明のHIV-1エンベロープポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのユニークな部分である。同様に、「フラグメント」という用語は、最大で規定のペプチド配列の全長よりも一アミノ酸残基少ないものを含む本発明のHIV-1エンベロープポリペプチドおよびそのコードヌクレオチド配列をいう。例えば、フラグメントは、5~2500個の近接ヌクレオチドまたはアミノ酸残基を含み得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、または他の目的に用いられるフラグメントは、少なくとも5個、10個、15個、16個、20個、25個、30個、40個、50個、60個、75個、100個、150個、250個、500個もしくは少なくとも700個の近接ヌクレオチドまたはアミノ酸残基の長さであり得る。フラグメントは、分子の特定の領域から優先的に選択され得る。例えば、ポリペプチドフラグメントは、特定の規定の配列に示されるようなポリペプチドの最初の250または500アミノ酸(あるいは最初の25%または50%)から選択される特定の長さの近接アミノ酸を含み得る。明確には、これらの長さは例示であり、本明細書(配列表、表、および図面を含む)によって支持される任意の長さが本実施形態に包含され得る。

40

【0080】

50

本開示は、H I V - 1の抗原性 g p 1 2 0ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸構築物に関する。これらのポリヌクレオチドとしては、目的のポリペプチドをコードするDNA、cDNAおよびRNA配列が挙げられる。

【0081】

本発明で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、種々の数のモノマーによって形成されるポリマーをいい、ここでモノマーは、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドの両方を含むヌクレオチドである。ポリヌクレオチドは、メチル化により修飾されたモノマーおよび未修飾形態を包含する。「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本発明で同義的に使用され、mRNA、cDNAおよび組換えポリヌクレオチドを包含する。本発明で使用される場合、ポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチドに限定されず、非天然ヌクレオチド類似体およびヌクレオチド間結合を含むポリヌクレオチドを包含する。

10

【0082】

ベクターへの本発明の核酸の操作および挿入の方法は、当該技術分野で周知である。Sambrook, 1989 (前出)、およびAusubel Fら編, 「Short Protocols in Molecular Biology」, 第4版 (John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, US, 2002) を参照のこと。

【0083】

典型的には、本発明の g p 1 2 0ポリペプチドをコードする核酸構築物はプラスミドである。しかしながら、他のベクター (例えば、ウイルスベクター、ファージ、コスミド) が、核酸を複製するために利用され得る。本発明に関して、核酸構築物は典型的には、挿入された遺伝子配列の効率的な転写を促進するプロモーター配列を含む発現ベクターである。発現ベクターは典型的には、複製起点、プロモーター、および形質転換細胞の表現型選択を可能にする特定の核酸配列を含む。

20

【0084】

より一般的には、本発明の g p 1 2 0ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞への導入後に核酸の発現を駆動できる任意のプロモーターおよび/またはエンハンサーに作動可能に連結され得る。プロモーターは、核酸の転写を指示する核酸制御配列のアレイである。プロモーターは、ポリメラーゼII型プロモーター (TATA因子) の場合のように、転写開始部位近く (に存在し得る) に必要な核酸配列を含む。プロモーターは、転写開始部位からほぼ数千塩基対付近に位置し得る遠位エンハンサーまたはリプレッサー因子も含み得る。構成性および誘導性プロモーターの両方が含まれる。Bitter Gら, Meth. Enzymol. 1987; 153: 516~544を参照のこと。

30

【0085】

このような核酸構築物を作製するために、g p 1 2 0ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、プラスミド発現ベクターのような適切な発現ベクター中に挿入される。g p 1 2 0ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を作製する手順およびそれらの配列をインピット口で操作する手順は、当業者に周知である。Sambrook, 1989、およびAusubel, 2002 (前出) を参照のこと。

40

【0086】

免疫原性 g p 1 2 0ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列の挿入または組み込みができるように操作され得るプラスミド、ウイルスまたは他のビヒクルが挙げられるが、これらに限定されない発現ベクター中に挿入することができ、そして原核生物または真核生物のいずれかで発現され得る。宿主としては、微生物、酵母、昆虫、および哺乳類の生物体が挙げられ得る。原核生物中で真核生物またはウイルスの配列を有するDNA配列を発現させる方法は、当該技術分野で周知である。宿主中で発現および複製できる生物学的に機能的なウイルスおよびプラスミドDNAベクターは、当該技術分野で公知である。

50

【0087】

組換えDNAによる宿主細胞の形質転換は、当業者に周知の通常の技術によって行われ得る。宿主が大腸菌などの原核生物である場合、指数増殖期後に回収され、続いて当該技術分野で周知の手順を用いてCaCl₂法により処理された細胞から、DNA取り込みが可能なコンピテント細胞が調製され得る。あるいは、MgCl₂またはRbClを用いてもよい。形質転換は、必要に応じて宿主細胞のプロトプラスト形成後に行ってもよく、またはエレクトロポレーションによって行ってもよい。

【0088】

宿主が真核生物である場合、リン酸カルシウム共沈、通常の機械的手順（例えばマイクロインジェクション）、エレクトロポレーション、リボソーム封入プラスミドの挿入、またはウイルスベクターのようなDNAのトランスフェクション方法が用いられ得る。免疫原性gp120ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と共に、選別可能な表現型をコードする第二の外来DNA分子（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子）を用いて、真核細胞を同時形質転換することもできる。別の方法は、真核生物ウイルスベクター（例えば、シミアンウイルス40（SV40）またはウシバピローマウイルス）を用いて、真核細胞を一過的に感染または形質転換させ、タンパク質を発現させる。Gluzman Y編、「Eukaryotic Viral Vectors」（Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US, 1982）を参照のこと。

10

【0089】

C. 抗体

本発明によるgp120改変体およびそのフラグメントは、HIVウイルスまたはその粒子が被検体の生体液中に存在する場合にHIVを認識および中和することができる抗体を生成するために用いてもよい。従って、別の態様において、本発明は、本発明による免疫原性ポリペプチドに特異的に結合する抗体に関する。

20

【0090】

本発明で使用される場合、「抗体」という用語は、所定の抗原に結合する能力を有し且つ免疫グロブリン分子の軽鎖または重鎖可変領域の全部または一部を含む少なくとも一つのポリペプチドを含む、単量体または多量体タンパク質に関する。本発明の抗体としては、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体（tria body）、四重特異性抗体（tetra body）、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化（camelized）抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、単ドメイン抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント（すなわち、抗体の最小機能モジュール）、単鎖Fv（scFv）、ジスルフィド安定化Fv（dsFv）、Fd、V_H、V_L、V_H-V_L、および抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体）、細胞内抗体、および上記の任意のエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、抗体はモノクローナル抗体である。他の実施形態において、抗体は、V_HおよびV_L領域を含むFvフラグメントである。

30

【0091】

これらの抗体は、本発明のペプチドを用いて通常的手段で生成され得る。Kieber-Emmons Tら、WO1991004273を参照のこと。例えば、ポリクローナル抗体は、上記で同定されたペプチドの一方もしくは両方、または多価構築物を用いて選択された動物の免疫系を従来の方法で刺激し、それらに対する自然抗体を免疫系に産生させ、そしてこの動物の血液または他の生体液からこれらの抗体を収集することによって生成され得る。高力価ポリクローナル抗体は、抗原として上に記載した多価構築物を用いることによって得ることができる。得られた抗体は、感染被検体の生体液に選択されたHIV抗原が出現したとき、これを結合することができる。

40

【0092】

さらに、本発明のペプチドを用いて、ペプチド配列中に含まれる中和エピトープ構造の

50

内部イメージを有する抗イディオタイプ抗体を生成するための鑄型として用いられ得る抗体を生成してもよい。これらの抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）は次に、ワクチン製剤または能動免疫療法に用いられ得る。従って、本発明はまた、ペプチドの内部イメージを有するモノクローナルまたはポリクローナル抗体、およびこれらの抗体を生成する方法も包含する。K i e b e r - E m m o n s（前出）を参照のこと。

【0093】

本発明の組成物および方法のためのモノクローナル抗体（MAb）を得ることおよび利用することが望ましい場合、周知の従来技術を用い、入手可能な腫瘍細胞株を用いることによって所望のMAbを発現するハイブリドーマ細胞株が生成され得る。K o h l e r G, M i l s t e i n C, N a t u r e 1975; 256(5517): 495 ~ 497を参照のこと。

10

【0094】

組換え抗体は、公知の産生技術を用いて生成され得る。H u s e Wら, S c i e n c e 1989; 246: 1275 ~ 1281を参照のこと。所望の高力価抗体はまた、これらの抗原に対して発現するモノクローナルまたはポリクローナル抗体に、公知の組換え技術を適用することによって生成されてもよい。A m i t Rら, S c i e n c e 1986; 233: 747 ~ 753、Q u e e n Cら, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1988; 86: 10029 ~ 10033; R i e c h m a n n Lら, N a t u r e 1988; 332: 323 ~ 327、およびB a r b a s Cら, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1992; 89: 4457 ~ 4461およびW i n t e r P, G B 2188638を参照のこと。

20

【0095】

D. 中和抗体を生成し得る免疫原性組成物

本明細書で開示されるgp120変体ポリペプチドおよび変体gp120ポリペプチドをコードする核酸分子は、例えばHIV-1感染またはその関連症状を予防、軽減または制御するために、gp120またはgp120発現ウイルスに対する免疫応答を誘発する免疫原（免疫原性組成物）としてまたは免疫原を産生するために用いられ得る。治療有効量の本開示の治療用組成物の投与後、被検体は、HIV-1感染、HIV-1感染に関連する症状、またはその両方についてモニターされ得る。従って、別の態様において、本発明は、本発明によるHIV-1 gp120変体ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントを含む免疫原性組成物、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいは上記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターに関する。

30

【0096】

免疫原性組成物における使用に適した適切なgp120の免疫原性フラグメントとしては、約5 ~ 100個のアミノ酸サイズ（例えば、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、または約100個）のような、比較的小さなサイズのペプチドが挙げられる。従って、gp120ポリペプチドのフラグメント（例えば、エピトープまたは他の抗原性フラグメント）、例えば本明細書に記載される任意のgp120ポリペプチドまたはそのフラグメントは、免疫原として用いられ得る。

40

【0097】

「免疫原性組成物」という用語は、特定の免疫原に対して抗体を産生する免疫応答または細胞性免疫応答を誘発する組成物をいう。注射用組成物は、例えば、溶液、懸濁液、およびエマルジョンとして調製され得る。「抗原性組成物」という用語は、宿主免疫系によって認識され得る組成物をいう。例えば、抗原性組成物は、宿主免疫系の体液性（例えば抗体）および/または細胞性（例えばTリンパ球）成分によって認識され得るエピトープを含む。

【0098】

「ワクチン」という用語は、疾患、特にウイルス疾患に対する防御を付与するための、霊長類であり得る宿主（特にヒト宿主）へのインビボ投与のための免疫原性組成物をいう

50

。

【0099】

本発明による免疫原性組成物は、HIV感染によって引き起こされる疾患の治療または予防に有用である。さらなる態様において、本発明は、HIV-1感染によって生じる疾患の治療または予防に用いる本発明によるペプチド、核酸、ベクター、免疫原性組成物またはワクチンに関する。あるいは、本発明は、HIV-1感染によって生じる疾患の治療または予防のための医薬の製造のための本発明によるペプチド、核酸、ベクター、免疫原性組成物またはワクチンの使用に関する。あるいは、本発明は、HIV-1感染によって生じる疾患の被検体における治療または予防方法に関し、この方法は本発明によるペプチド、核酸、ベクター、または免疫原性組成物またはワクチンの上記被検体への投与を含む

10

。

【0100】

本明細書の任意の個所で使用される場合、「治療」という用語は、本明細書に記載されるような臨床状態に対する感受性を終結、予防、改善および/または軽減することを目的とする任意のタイプの治療を包含する。好ましい実施形態において、治療という用語は、予防的治療（すなわち、臨床状態、障害または本明細書で定義されるような状態の感受性を軽減するための療法）に関する。

【0101】

従って、本明細書で使用される場合、「治療」、「治療すること」などは、所望の薬理学的および/または生理学的効果を得ることをいい、ヒトを含む哺乳類における病的状態または障害の任意の治療を包含する。効果は、その障害または症状を完全にまたは部分的に予防する点で予防的であり、そして/あるいは障害および/または障害に起因する悪影響の部分的なまたは完全な治癒の点で治療的であり得る。すなわち、「治療」は、(1)被検体において障害が生じるか再発するのを予防すること、(2)障害を阻害すること、例えばその進行を阻止すること、(3)宿主がもはや障害またはその症状で苦しむことのないように障害または少なくともそれに関連する症状を停止または終結させること（例えば、失われた、欠損したまたは不完全な機能を回復または修復すること、あるいは非効率的なプロセスを刺激することによって、障害またはその症状の退縮を引き起こすことなど）、あるいは(4)障害またはそれに関連する症状を解放、軽減、または改善すること（この場合の改善は、例えば炎症、疼痛、および/または免疫不全などのパラメータの大きさの少なくとも減少をいう広い意味で使用される）を包含する。

20

30

【0102】

本明細書で使用される場合、「予防する」、「予防すること」、および「予防」という用語は、動物における病的細胞の出現の減少をいう。予防は、完全（例えば、被検体における病的細胞の完全な非存在）であり得る。予防はまた、例えば被検体における病的細胞の出現が本発明を用いない場合に出現すると考えられるものよりも少ないというように、部分的であってもよい。予防はまた、臨床状態に対する感受性の低下もいう。

【0103】

本発明による免疫原性組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含み得る。

【0104】

本明細書で同義的に使用される「薬学的に許容される担体」、「薬学的に許容される希釈剤」、または「薬学的に許容される賦形剤」、または「薬学的に許容されるビヒクル」は、無毒性の固体、半固体もしくは液体の充填剤、希釈剤、カプセル封入材料または任意の従来型の製剤助剤をいう。薬学的に許容される担体は、使用される投与量および濃度ではレシipientに対して実質的に無毒性であり、製剤の他の成分と適合性がある。例えば、ポリペプチドを含む製剤のための担体は、酸化剤およびポリペプチドに有害であることが知られている他の化合物を通常含まない。適切な担体としては、水、ブドウ糖、グリセロール、生理食塩水、エタノール、およびこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。担体は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、または製剤の有効性を高めるアジュバントなどの薬剤をさらに含み得る。アジュバントは、例えば以下からなる群から

40

50

選択され得る：AlK(SO₄)₂、AlNa(SO₄)₂、AlNH₄(SO₄)、シリカ、ミョウバン、Al(OH)₃、Ca₃(PO₄)₂、カオリン、炭素、水酸化アルミニウム、ムラミルジペプチド、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-DMP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(CGP 11687、ノル-MDPともいう)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(CGP 19835A、MTP-PEともいう)、2%スクワレン/Tween-80(登録商標)エマルジョン中のRIBI(MPL+TDM+CWS)、リポドAを含めたりポ多糖およびその種々の誘導体、フロイントの完全アジュバント(FCA)、フロイントの不完全アジュバント、Merckアジュバント65、ポリヌクレオチド(例えば、ポリICおよびポリAU酸)、結核菌由来のワックスD、Corynebacterium parvum、Bordetella pertussis、およびブルセラ菌属のメンバーに見られる物質、Titermax、ISCOMS、Quil A、ALUN、リポドA誘導体、コレラ毒素誘導体、HSP誘導体、LPS誘導体、合成ペプチドマトリックスまたはGM DP、インターロイキン1、インターロイキン2、Montanide ISA-51およびQS-21、CpGオリゴヌクレオチド、ポリI:CおよびGM-CSF。Hunter R、US5,554,372、およびJager E, Knuth A, WO1997028816を参照のこと。

10

【0105】

20

本発明による改変体gp120ポリペプチドは、抗原性分子が結合され得る免疫原性高分子である担体に共有結合的に連結され得る。担体に結合されると、結合ポリペプチドはより免疫原性になる。結合分子の免疫原性を高めるように、かつ/または診断的に、分析的に、および/もしくは治療的に有益な担体に対するより高い力価の抗体を誘発するように、担体を選択される。担体への分子の共有結合は、増強された免疫原性およびT細胞依存性を与え得る。Pozsgay Vら, PNAS 1999; 96: 5194~5197, Lee Sら, J. Immunol. 1976; 116: 1711~1718およびDintzis Rら, PNAS 1976; 73: 3671~3675を参照のこと。有用な担体としては、反応物部分が付着可能な1つまたはそれ以上の官能基を含む天然材料(例えば、細菌またはウイルス由来の多糖類、ポリペプチドまたはタンパク質)、半合成材料または合成材料であり得る高分子担体が挙げられる。キーホールリンペットヘモシアニン、カプトガニヘモシアニン、エデスチン、哺乳類血清アルブミン、および哺乳類免疫グロブリンなど高等生物由来のタンパク質だけでなく、細菌生成物およびウイルスタンパク質(例えば、B型肝炎の表面抗原およびコア抗原)もまた、担体として用いられ得る。担体として用いられるさらなる細菌生成物としては、細菌壁タンパク質および他の生成物(例えば、連鎖球菌またはブドウ球菌の細胞壁およびリポ多糖(LPS))が挙げられる。

30

【0106】

本発明はさらに、HIV感染に関連する症状を予防または軽減することに関する。これらの症状としては、例えば帯状疱疹、皮疹および爪の感染症、口腔痛、再発性の鼻咽頭感染症、および体重減少を含む、HIV感染の軽度の症候性期に関連する症状が挙げられる。さらに、HIV感染の重度の症候性期に関連するさらなる症状としては、例えば、口腔および膺の鷲口瘡(カンジダ)、持続性の下痢、体重減少、持続性の咳、再活性化結核、および口唇ヘルペス(単純ヘルペス)などの再発性ヘルペス感染が挙げられる。本発明によって治療され得る末期エイズの症状としては、例えば、下痢、悪心嘔吐、鷲口瘡および口腔痛、持続性の再発性膺感染および子宮頸癌、持続性全身性リンパ節腫(PGL)、重篤な皮膚感染、疣贅および白癬、呼吸器感染、肺炎(特に、ニューモシスチスカリニ肺炎(PCP))、帯状ヘルペス(または帯状疱疹)、神経系障害(手足における痛み、知覚麻痺または「しびれ」など)、神経学的異常、カポジ肉腫、リンパ腫、結核、および他の日和見感染が挙げられる。

40

50

【0107】

本発明のペプチド、核酸およびベクターの有益な効果としては、例えば、HIVが曝露された個体の初期感染を予防または遅延させること；HIVに感染した個体におけるウイルス負荷を減少させること；HIV感染の無症候性期を延長すること；抗レトロウイルス療法（ART）によりウイルスレベルが低下しているHIV感染患者において低ウイルス負荷を維持すること；薬物未投与の患者およびARTで治療される患者においてHIV-1特異的および非特異的の両方のCD4 T細胞のレベルを増加するかまたはCD4 T細胞の減少を軽減すること、エイズに罹患している個体における健康全般または生活の質を向上させること；そしてエイズに罹患している個体の平均余命を延長することが挙げられる。臨床医は、治療前の患者の状態または未治療の患者の予期される状態と、免疫化の

10

【0108】

免疫原性組成物は、例えば、筋肉内、皮下または静脈内注射、および経口、経鼻、または経肛門投与によるなど、当業者に公知の任意の手段によって投与され得る。Therapeutic Peptides and Proteins (Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, US, 1995)のBanga A, 「Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins」を参照のこと。ペプチドまたはタンパク質が応答を刺激するために利用可能な期間を延長するために、ペプチドまたはタンパク質は、インプラント、油性注射剤として、または粒子系として提供され得る。粒子系は微粒子、マイクロカプセル、ミクロスフェア、ナノカプセル、または同様の粒子であり得る。Banga, 1995 (前出)を参照のこと。合成高分子に基づく粒子状担体は、制御された放出を提供することに加え、免疫応答を増強するためのアジュバントとして作用することが示されている。アルミニウム塩もまた、免疫応答を生じるためのアジュバントとして用いられ得る。

20

【0109】

免疫原性組成物は、正確な投薬量の個別投与に適した単位投薬形態で処方され得る。パルス用量では、開示された免疫原を含む免疫原性組成物のボーラス投与が提供され、その後開示された免疫原が被検体に投与されない期間が続き、その後2回目のボーラス投与が続く。治療的有効量の免疫原性組成物は、単回用量で、または複数回用量で、例えば毎日、治療過程中に投与され得る。特定の非限定的な例において、開示された免疫原を含む免疫原性組成物のパルス用量は、1日の治療の中で、1週間の治療の中で、または1ヶ月の治療の中で投与される。

30

【0110】

免疫原性組成物は、効果（例えば、HIV-1感染の徴候、症状、または検査結果の低下）が所望される場合はいつでも投与され得る。一般に、用量は、被検体に許容できない毒性を生じることなく疾患の症状または徴候を治療するかまたは改善させるのに十分である。全身投与または局所投与が利用され得る。

【0111】

治療用途に有効な量は、疾患の重篤度および患者の年齢、体重、全身状態、および他の臨床学的因子に応じて変化し得る。従って、適切な治療レジメンの最終決定は、担当の臨床医によって行われるであろう。典型的には、インビトロで用いられる投薬量は、医薬組成物のインサイチュ投与に有効な量において有効なガイダンスを提供することができ、そして動物モデルを用いて特定の障害の治療に有効な投薬量が決定され得る。Gilman Rら編, Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第8版 (Pergamon Press, New York, NY, US, 1990)、およびGennaro A編, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 (Mack Publishing Co., Easton, PA, US, 1990)

40

50

)を参照のこと。典型的には、gp120ポリペプチドのための用量範囲は、約0.1 μg/kg体重～約100 mg/kg体重である。他の適切な範囲としては、約1 μg/kg～10 mg/kg体重が挙げられる。一つの例において、用量は約1.0 μg～約50 mg、例えば1 μg～1 mg（例えば、被検体当り1 mgペプチドなど）である。投薬スケジュールは、ペプチドに対する被検体の感受性および疾患の速度などの臨床学的因子に応じて、毎日からわずか年一回まで変化し得る。従って、被検体は、開示された治療的分子の初回用量を受け、次いで、例えば少なくとも一日後（例えば少なくとも一週間後）など、その後のある時点で第二回用量（または、さらに多回の用量）を受ける。

【0112】

本明細書に開示される医薬組成物は、用量単位で調製および投与され得る。固体用量単位としては、錠剤、カプセル剤、経皮送達系、および坐薬が挙げられる。治療量の投与は、個別の用量単位または数個のより小さな用量単位の形態での単回投与、および特定の間隔での細分された用量の複数回投与の両方によって行われ得る。適切な単回または分割用量としては、約0.01、0.1、0.5、1、3、5、10、15、30、または50 μgタンパク質/kg/日が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0113】

本明細書に記載される抗原gp120ポリペプチドをコードする核酸構築物は、治療、例えば、予防レジメン（ワクチンなど）に用いるための医薬組成物（医薬）として、例えば、組み合わせて用いられ、そして被検体（例えば、ヒト被検体などの霊長類被検体）に投与されて、HIVの一つまたはそれ以上のクレードまたは株に対する免疫応答を誘発する。例えば、本明細書に記載される組成物は、HIVによる感染の前にヒト（または非ヒト）被検体に投与されて、ウイルスによる感染またはウイルスの複製を抑制し得る。従って、上記の医薬組成物は、HIVに対する防御免疫応答を誘発するために被検体に投与され得る。免疫応答を誘発するために、治療的に有効な（例えば、免疫学的に有効な）量の核酸構築物が、ヒト（または非ヒト）被検体などの被検体に投与される。

20

【0114】

核酸構築物による免疫化は、当該技術分野で周知であり、例えば以下に教示される。Robinson Hら、US5,643,578（細胞性または体液性応答を誘発するために所望の抗原をコードするDNAを導入することによって脊椎動物を免疫化する方法を記載）；Weiner Dら、US5,593,972およびWeiner Dら、US5,817,637（抗原をコードする核酸配列を、発現を可能にする制御配列に操作可能に連結することを記載）、およびUrban Rら、US5,880,103（生物体に対する免疫原性ペプチドまたは他の抗原をコードする核酸のいくつかの送達方法を記載）を参照のこと。これらの方法には、核酸（または合成ペプチド自体）のリポソーム送達、およびコレステロールとQUILA（登録商標）（サポニン）の混合の際に自然発生的に形成される30～40 nmのサイズの負に荷電したケージ様構造である免疫刺激構築物またはISCOMS（登録商標）が含まれる。

30

【0115】

gp120核酸分子の投与について、核酸は、例えば、レトロウイルスベクターの使用によって、直接注入によって、微粒子衝撃（例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont Corp, Delaware, DE, US）の使用、脂質、細胞表面レセプターまたはトランスフェクション剤でのコーティングによって、あるいは核に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドに連結させて投与すること等によって、細胞内にあるように投与される適切な核酸発現ベクターからの発現により、細胞内に送達され得る。Morgan Jら、US4,980,286、およびJoliot Aら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991；88：1864～1868を参照のこと。本発明は、ゲノム内に組み込まれるかまたは組み込まれない、合成オリゴ、ネイキッドDNA、プラスミドおよびウイルスを含めた、すべての形態の核酸送達を包含する。

40

【0116】

免疫化に核酸を用いる別のアプローチにおいて、免疫原性gp120ポリペプチドは、

50

弱毒化ウイルスの宿主もしくはベクターまたは細菌ベクターによっても発現され得る。組換えワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、または他のウイルスベクターは、ペプチドまたはタンパク質を発現するために用いることができ、それによりCTL応答を誘発する。例えば、TB免疫化プロトコルに有用なワクシニアベクターおよび方法は、本発明のペプチドのための他の有望なビヒクルを提供する。Paolletti Eら、US 4,722,848、およびStover Cら、Nature 1991;351:456~460を参照のこと。

【0117】

一つの例において、ウイルスベクターが利用される。これらのベクターとしては、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、またはレトロウイルスのようなRNAウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。一つの例において、レトロウイルスベクターは、マウスまたはトリのレトロウイルス由来のものである。単一の外来遺伝子が挿入され得るレトロウイルスベクターの例としては、モロニーマウス白血病ウイルス(MoMuLV)、ハーベイマウス肉腫ウイルス(HaMuSV)、マウス乳癌ウイルス(MuMTV)、およびラウス肉腫ウイルス(RSV)が挙げられるが、これらに限定されない。被検体がヒトである場合、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)などのベクターが利用され得る。さらに多数のレトロウイルスベクターが、複数の遺伝子を組み込み得る。これらベクターの全てが、形質導入細胞を同定および作製できるように、選択可能なマーカー遺伝子を移入または組み込み得る。gp120ポリペプチドをコードする核酸配列を、例えば、特定の標的細胞上のレセプターに対するリガンドをコードする別の遺伝子と共に、ウイルスベクターに挿入することによって、このベクターはその時点で標的的特異的である。レトロウイルスベクターは、例えば、糖、糖脂質またはタンパク質を付着させることによって標的的特異的にされ得る。レトロウイルスベクターを標的とする抗体を用いることによって標的化を行うことが好ましい。gp120ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むレトロウイルスベクターを標的的特異的に送達できるようにレトロウイルスゲノム中に挿入され得るかまたはウイルスエンベロープに付着され得る特異的ポリヌクレオチド配列は、当業者に公知であるか、または過度の実験を行うことなく容易に確認できる。

【0118】

核酸構築物に適した製剤としては、水系および非水系溶液、等張滅菌溶液(これらは、抗酸化剤、緩衝剤、および静菌剤を含み得る)、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含み得る水系および非水系滅菌懸濁液が挙げられる。製剤は、アンブルおよびバイアルなどの単位用量または複数用量を密封した容器で提示され、使用直前に、滅菌液体担体(例えば、水)の添加のみを必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存され得る。即席の溶液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。好ましくは、担体は緩衝化生理食塩水溶液である。より好ましくは、本発明の方法に用いられる組成物は、投与の前に核酸構築物を損傷から保護するように処方される。例えば、組成物は、発現ベクターを調製、保存または投与するために用いられるデバイス(ガラス器具、シリンジ、または針など)上でのアデノウイルスベクターの損失を低減するように処方され得る。組成物は、成分の光感受性および/または温度感受性を減少させるように処方され得る。この目的のために、組成物は、好ましくは、薬学的に許容される液体担体(例えば、上記のものなど)、ならびにポリソルベート80、L-アルギニン、ポリビニルピロリドン、トレハロースおよびこれらの組合せからなる群から選択される安定剤を含む。

【0119】

治療用途において、治療有効量の組成物は、HIVへの曝露またはHIVによる感染の前もしくは後に被検体に投与される。曝露の前に投与される場合、この治療用途は、予防投与(例えば、ワクチンの形態で)と呼ばれ得る。組成物の単回または複数回投与は、被検体が必要とし、かつ被検体に許容される投薬量および頻度に応じて施される。一つの実施形態において、投薬量は、ポラスとして一回で投与されるが、別の実施形態において、防御免疫応答などの治療の結果が得られるまで定期的に適用されてもよい。一般に、用

10

20

30

40

50

量は、被検体が許容できない毒性を生じることなく、疾患の症状または徴候を治療または改善させるのに十分である。全身投与または局所投与が利用され得る。

【0120】

核酸ワクチンに関して、自然免疫に関与するレセプターに結合しかつ刺激する、天然に存在するかまたは合成の免疫賦活性組成物が、gp120ポリペプチドをコードする核酸構築物と共に投与され得る。例えば、特定のToll様レセプター（TLR7、TLR8およびTLR9など）を刺激する薬剤が、gp120ポリペプチドをコードする核酸構築物と組み合わせて投与され得る。いくつかの実施形態において、核酸構築物は、免疫賦活性CpGオリゴヌクレオチドと組み合わせて投与される。

【0121】

gp120ポリペプチドをコードする核酸構築物は、ネイキッドDNAプラスミドとしてインビボで導入され得る。DNAベクターは、トランスフェクション、エレクトロポレーション（例えば、経皮的エレクトロポレーション）、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿法、遺伝子銃の使用、またはDNAベクタートランスポーターの使用が挙げられるがこれらに限定されない当該技術分野で公知の方法によって、所望の宿主細胞に導入され得る。Wu Cら, J. Biol. Chem. 1992; 267: 963~967、Wu C and Wu G, Biol. Chem. 1988; 263: 14621~14624、およびWilliams Rら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 2726~2730を参照のこと。ネイキッドDNAを哺乳類筋肉組織に処方および投与する方法も公知である。Felgner Pら、US 5, 580, 859、およびUS 5, 589, 466を参照のこと。他の分子、例えばカチオン性オリゴペプチド、DNA結合タンパク質に由来するペプチド、またはカチオン性ポリマーなども、インビボでの核酸のトランスフェクションを促進するのに有用である。Bazile Dら, WO 1995 021931、およびByk Gら, WO 1996 025508を参照のこと。

【0122】

gp120免疫原をコードする核酸構築物を宿主細胞に導入するのに用いられ得る、別の周知の方法は、粒子衝撃（別名、バイオリスティック形質転換）である。バイオリスティック形質転換は、一般に、いくつかある方法のうちの一つで行われる。一つの一般的な方法は、細胞において不活性または生物学的に活性な粒子を発射する工程を含む。Sanford Jら、US 4, 945, 050、US 5, 036, 006、およびUS 5, 100, 792を参照のこと。

【0123】

あるいは、ベクターは、リポフェクションによってインビボで導入され得る。カチオン性脂質の使用により、負に帯電した核酸のカプセル封入を促進することができ、そしてさらに負に帯電した細胞膜との融合も促進される。Felgner P, Ringold G, Science 1989; 337: 387~388を参照のこと。核酸の移入のための特に有用な脂質化合物および組成物が記載されている。Felgner Pら、US 5, 459, 127、Behr Jら, WO 1995 018863、およびByk G, WO 1996 017823を参照のこと。

【0124】

免疫原性ポリペプチドと同様に、核酸組成物は、HIVに対する免疫応答を誘発するために、単回用量で投与され得るか、または複数回用量が時間間隔をあけて投与され得る。例えば、2回用量、または3回用量、または4回用量、または5回用量、または6回用量またはそれ以上が、数週間、数ヶ月間または数年間にもわたって、免疫応答を最適化するために被検体に投与され得る。

【0125】

本明細書で開示される免疫原性組成物を、タンパク質、ペプチド、抗体、および他の抗HIV薬剤などの他の薬剤と共に投与することが有利であり得る。このような抗HIV治療剤の例としては、ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター（例えば、アバカビル、AZT

10

20

30

40

50

、ジダノシン、エムトリシタピン、ラミブジン、スタブジン、テノホビル、ザルシタピン、ジドブジンなど)、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター(例えば、デラビルジン、エファビレンツ、ネビラピンなど)、プロテアーゼインヒビター(例えば、アンブレナビル、アタザナビル、インジナビル、ロピナビル、ネルフィナビル、ホスアンブレナビル(*osamprenavir*)、リトナビル、サキナビル、チプラナビルなど)、および融合タンパク質インヒビター(例えば、エンフビルチドなど)が挙げられる。特定の実施形態において、免疫原性組成物は、他の抗HIV治療剤と同時に投与される。特定の実施形態において、免疫原性組成物は、他の抗HIV治療剤と連続的に(例えば、他の薬剤の前または後などに)投与される。当業者には、連続投与が直後または適切な期間の後(数時間、数日、数週間、数ヶ月、または数年もの後など)を意味し得ることが分かるであろう。

10

【0126】

E. 生物試料中の抗HIV抗体の検出方法および中和抗体応答の検出方法

本発明に記載される免疫原は、この免疫原に特異的な抗体を患者由来の試料中で同定するのに適している。本発明による免疫原は中和抗体を特異的に結合するので、この免疫原は、中和抗体を発現した患者の検出に用いられ得る。従って、これらの抗体は、患者が中和抗体を有するか否かに基づく個別治療の同定を補助し得る。従って、別の態様において、本発明は、ウイルスに対して特異的な中和抗体を試料中で検出する方法であって、

(i) 前記試料を本発明によるポリペプチドと接触させる工程と、

(ii) 前記記ポリペプチドとの間の免疫複合体の形成を検出する工程とを含む、方法に関する。

20

【0127】

「中和抗体」、「ウイルス」、「ポリペプチド」という用語および表現は、上記に詳述されている。

【0128】

好ましい実施形態において、ウイルスはHIVであり、そしてポリペプチドは上記で定義されるようなgp120改変体ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントである。より好ましい実施形態において、試料はHIV-1感染患者由来であるか、またはエイズワクチンレシピエント由来である。

【0129】

任意の多種多様なアッセイフォーマットが、本発明の方法によって用いられ得る。このようなフォーマットは、不均一であっても均一であってもよく、連続的であっても同時的であってもよく、競合的であっても非競合的であってもよい。Peterson Mら、US 5,563,036, Cheng Aら、US 5,627,080, Lee Jら、US 5,633,141, Peterson Mら、US 5,679,525, Draetta Gら、US 5,691,147, Lucas Fら、US 5,698,411, Yan Cら、US 5,747,352, Davidson R、US 5,811,526, Oh Cら、US 5,851,778およびLandrum Eら、US 5,976,822を参照のこと。このようなアッセイは、抗HIV抗体の濃度または量を測定するために定量的であるようにフォーマットされてもよいし、あるいは抗HIV抗体の存在または非存在を測定するために定性的であるようにフォーマットされてもよい。本発明の原理による使用に適合され得るイムノアッセイのさらなる記載は、科学文献で入手可能である。Gnann Jら、Methods Enzymol. 1989; 178: 693~714, Dopel Sら、Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1991; 29: 331~337, Manocha Mら、Immunol. Lett. 2003; 85(3): 275~278, Brattegaard Kら、AIDS 1995; 9(6): 656~657, Beristain Cら、J. Clin. Lab. Anal. 1995; 9: 347~350, Modrow Sら、J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1989; 2: 141~148, Gueye-Ndiaye Aら、AIDS 1993; 7: 475~481, Sabatie

30

40

50

r J \bar{r} , AIDS 1989; 3: 215 ~ 220, Sommerfelt M \bar{r} , Expert Opin. Biol. Ther. 2004; 4: 349 ~ 361, Alcaro M \bar{r} , Curr. Protein Pept. Sci. 2003; 4: 285 ~ 290, Smith R \bar{r} , Arch. Pathol. Lab. Med. 1990; 114: 254 ~ 258, Petrov R \bar{r} , Biomed. Sci. 1990; 1: 239 ~ 244, Zolla-Pazner S, Nat. Rev. Immunol. 2004; 4: 199 ~ 210, Baillou A \bar{r} , J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 1387 ~ 1391、およびMcGaughey G \bar{r} , Curr. HIV Res. 2004; 2: 193 ~ 204を参照のこと。

【0130】

10

不均一イムノアッセイ技術は、典型的には反応生成物が結合する固相材料の使用を含むが、非固定化抗原と抗体の結合（すなわち、溶液相イムノアッセイ）を含むように適合され得る。反応生成物は、固相を反応混合物から除去することにより（例えば、洗浄により）、過剰の試料、アッセイ試薬、および他の物質から分離される。本発明に従って用いられ得る固相イムノアッセイの一つのタイプは、サンドイッチイムノアッセイである。サンドイッチアッセイでは、試料中に存在する分析物が多いほど、固相上に存在する標識の量も多くなる。このタイプのアッセイフォーマットは、特に低い分析物濃度の可視化のために一般に好ましく、それは固相上の標識の出現がより容易に検出されるからである。

【0131】

20

本発明の好ましい実施形態によれば、抗HIV抗体と特異的に反応する本発明のペプチドは、固体支持体に結合（すなわち、固定化）され、抗HIV抗体の存在が試験される生物試料との接触下でインキュベートされる。非特異的結合を減少させるためにブロッキング剤を添加してもよい。

【0132】

理解されるように、ペプチドは、非結合状態で生物試料とインキュベートされた後、続いて固体支持体に結合（すなわち、固定化）され得る。支持体は次いで、存在するが結合ペプチドに結合し損ねた非HIV抗体を実質的に除去するために、好ましくは徹底的に処理される（例えば、洗浄によって）。このような処理の結果、ペプチドと抗HIV抗体との間で免疫複合体が形成される。

【0133】

30

次に、検出可能に標識された二次抗体（一次抗体に結合することができる（例えば、抗ヒトIgG抗体））を好ましくは添加し、存在し得る任意の抗HIV抗体に二次抗体が結合可能となる十分な条件下で支持体をインキュベートする。支持体は次いで、任意の非結合二次抗体を実質的に除去するために、好ましくは徹底的に処理される（例えば、洗浄によって）。抗HIV抗体が試験試料中に存在する場合、次いで2つの抗体は固定化ペプチドと免疫複合体（すなわち、二次抗体/抗HIV抗体/固定化ペプチドサンドイッチ）を形成するであろう。このようなアッセイにおいて、支持体に結合した二次抗体の検出は、試験される試料中の抗HIV抗体の指標となる。Schuurs A \bar{r} , US 3, 791, 932およびUS 4, 016, 043、およびPankratz T \bar{r} , US 5, 876, 935を参照のこと。二次抗体は、非ヒト種から単離された天然免疫グロブリン（例えば、抗ヒトIgGマウス抗体、抗ヒトIgGヤギ抗体、抗ヒトIgMヤギ抗体）であり得るか、または組換え的にまたは合成的に生成され得る。二次抗体は、インタクトな免疫グロブリンまたは免疫グロブリンフラグメント（例えば、Fab、F[A b]₂）であり得る。所望により、他の結合分子（抗HIV抗体に結合することができる）をこのような二次抗体と合わせてまたはその代わりに用いてもよい。例えば、抗HIV抗体はビオチン化することができ、そして二次抗体は標識アビジンまたはストレプトアビジンと置き換えることができる。

40

【0134】

バウンド/フリー分離工程を削除し、化学的結合アッセイに必要な時間および器具を削減するために、均一アッセイフォーマットが代わりに用いられ得る。このようなアッセイ

50

において、結合ペアの1つの成分は、固定化されたままであり得る；しかしながら、結合ペアの第二の成分の存在は、バウンド/フリー分離なしで検出される。均一光学的方法の例は、蛍光消光の検出によって機能するEMIT法(Syva, Sunnyvale, CA, US)；光散乱における変化を検出することにより機能するBehringwerke(Marburg, DE)のレーザーネフェロメトリーラテックス粒子凝集法；LPIAラテックス粒子凝集法(三菱化成工業株式会社, Tokyo, JP)；TDX蛍光偏光解消法(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, US)；および蛍光エネルギー移動法(Cis Bio International, Paris, FR)である。任意のこのようなアッセイは、本発明の目的に従って用いるために適合され得る。

10

【0135】

本発明の結合アッセイは、競合的アッセイとして設定され得る。競合的アッセイでは、試験試料中に存在する抗HIV抗体が多いほど、固相上に存在する標識の量は少なくなる。

【0136】

サンドイッチアッセイと同様の方法において、競合的アッセイは、規定量の標識抗HIV抗体を提供し、そして試験される液体が、支持体への結合に対して標識抗体と競合するであろう抗HIV抗体を含むか否かを決定することによって実施することができる。このような競合的アッセイにおいて、捕捉される標識抗体の量は、試験試料中に存在する分析物の量に反比例する。このようないくつかのアッセイは、当該技術分野で記載されている。

Smith Dら、US 4,401,764、Clagett Jら、US 4,746,631、Li Cら、US 4,661,444、Chieriegatt Eら、GB 2084317、Mochida Eら、US 4,185,084、Sadeh Dら、US 4,243,749、Lucas Fら、US 5,698,411、Landrum(前出)、Leuvering J、US 4,313,734、Gribnau Tら、US 4,373,932、およびBaugher Bら、US 5,501,985を参照のこと。検出可能な標識として、酵素(特に、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、またはウレアーゼ)の使用(すなわち、酵素イムノアッセイまたはEIA)が好ましい。

20

【0137】

酵素標識の存在は、発色性基質(蛍光、UV、可視光を放出または吸収するものを含む)を用いて、酵素標識による触媒作用に応じて検出され得る。より好ましくは、化学標識が用いられ得る(例えば、コロイド金、ラテックスビーズ標識)。

30

【0138】

標識の検出は、多重検出器、マルチパスフィルター、格子、またはスペクトル的に異なる蛍光を用いて達成することができる。Ward Dら、US 5,759,781を参照のこと。酵素標識としてペルオキシダーゼを、特に発色性基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)、OPDまたはABTSと合わせて用いることが、特に好ましい。酵素としてペルオキシダーゼで抗体を標識化する場合、過ヨウ素酸法またはパートナーがヘテロ二官能性試薬で連結されると報告されている方法を用いることが可能である。

Nakane Pら、J. Histochem. Cytochem. 1974; 22: 1084~1090を参照のこと。任意の多種多様な固体支持体が、本発明のイムノアッセイにおいて用いられ得る。固体支持体に適切な材料は、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、または他の合成高分子などの合成物質、セルロースなどの天然高分子、および酢酸セルロースまたはニトロセルロースなどの誘導体化した天然高分子、およびガラス、特にガラス繊維である。支持体は、球、棒、チューブ、およびマイクロアッセイまたはマイクロタイタープレートの形態をとることができる。紙片、小板および膜のようなシート状の構造も同様に適切である。担体の表面は、水溶液に対して透過性および不透性であり得る。

40

【0139】

50

前述の記載は、液体（例えば、血清、血液、尿、唾液、涙液、脳脊髄液、精液）である生物試料中の抗HIV抗体の存在についてアッセイすることに関するが、任意の流体の生物試料（例えば、組織またはバイオプシー抽出物、便抽出物、痰）も同様に本発明のアッセイに用いられ得ることが理解されるであろう。最も好ましくは、アッセイされる生物試料は血清または血漿である。

【0140】

本発明による免疫原は、広域中和抗体の産生を誘導し得るので、これらの免疫原は、患者における病原体に対する中和抗体応答の検出にも用いられ得る。従って、別の態様において、本発明は、本発明による中和抗体を検出する方法を用いて中和抗体の存在を被検体において検出する工程を含む、被検体におけるウイルス感染に対する中和抗体応答の検出方法であって、ここで、コントロール被検体に対する前記被検体における中和抗体の存在を、前記被検体における前記ウイルス感染に対する中和抗体応答の指標とする、方法に関する。

10

【0141】

好ましい実施形態において、ウイルスはHIVであり、ポリペプチドは本発明によるgp120変体ポリペプチドまたはそのフラグメントである。より好ましい実施形態において、試料はHIV-1感染患者由来であるか、またはエイズワクチンレシピエント由来である。

【0142】

一般的手順

20

1. 試薬

以下の試薬を用いた：

(a) プラスミド。pNL4.3プラスミドは、National Institute of Health AIDS Research and Reference Reagent Program (NIH ARRRP, NIH, Bethesda, MD, US) から入手した。pcDNA3.1プラスミドは、Invitrogen (Carlsbad, CA, US) から入手した。

(b) HIV-1分離株。クレードBのHIV-1初代分離株 (AC-10) を用いた (NeutNet consortium, Milan, IT)。

(c) 細胞株。TZM-bl細胞 (CD4⁺ CXCR4⁺ CCR5⁺) は、NIHリポジトリ (NIH, Bethesda, Maryland, US) から入手した。293TおよびTZM-bl細胞は、10%ウシ胎仔血清、20mM L-グルタミン、100Uペニシリン/ml、および100μgストレプトマイシン/mlを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で維持した。

30

(d) 抗体。広域中和活性を有する抗Env-HIV-1モノクローナル抗体 (MAb) (エピトープ特異性を括弧内に示した) を用いた (NIH ARRRP, NIH, Bethesda, MD, US; Polymun AG, Vienna, AT)。これらとしては、4E10 (膜近位外部領域; MPER)、2F5 (MPER)、b12 (CD4結合部位)、2G12 (gp120高マンノースグリカン)、およびPG16 (gp120ウイルススパイク) が挙げられる。

40

【0143】

2. インビトロランダム変異誘発

変異は、Genemorph IIランダム変異誘発キット (Stratagene, La Jolla, CA, US) を用いてHIV-1 AC-10 env中に誘導した。キメラHIVビリオンのライブラリーは、ランダムに変異したエンベロープをpNL4-3およびpcDNA3.1プラスミドに移入することによって作製した。移入は、ウイルス配列を保存している制限部位の導入と、酵素XbaIおよびNotI (New England Biolabs, Ipswich, MA, US) での消化を介して行った。

【0144】

3. クローニングおよびライブラリー作製

50

PCR産物は、Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を用い、製造業者の仕様書に従って、ベクターpNL4.3およびpcDNA3.1にクローニングした。pNL4.3およびpcDNA3.1の組換えベクターを、MAX Efficiency (登録商標)Stbl2 (商標)コンピテントセルおよびMAX Efficiency (登録商標)DH5 (商標)コンピテントセル (Invitrogen, Carlsbad, CA, US)にそれぞれ導入し、3 mLの容量で攪拌しながら30 で一晩 (ON) 増幅した。多様性の損失を回避するためにいくつかの形質転換を同時に行い、そして増幅をアップスケールする状態において混ぜ合わせた (250 mL、30、攪拌しながら一晩)。インキュベーションの後、20 μ Lをプレーティングし、プラスミドDNAをPure Yield (商標)Plasmid Maxi prep System (Promega, Madison, WI, US)を用いて精製した。env 遺伝子の存在を確認するために、両方の産物をさらにXbaIおよびNotIで消化した。陽性の場合、クローンを配列決定し、そして/またはトランスフェクションに用いた。pNL4.3 構築物を用いる293Tの一過性同時トランスフェクションによってウイルスを作製した。ビリオンを含む細胞培養上清を、トランスフェクション後2日で回収し、Amicon (登録商標)超遠心フィルターユニットを用いてビリオンを濃縮した。ビリオンをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に再懸濁した。

10

【0145】

4. ビリオン捕捉アッセイ

20

マイクロタイターウェルを、4 で一晩、ポリクローナル抗Fc (100 μ lのPBS中5 μ g/mL)でコートした。ウェルを、37 で1時間、PBS中3%ウシ血清アルブミン (BSA)でブロックした。ライブラリー由来のウイルス (1000 ng/mL) 100 μ lをマイクロタイターウェルに添加した。5 μ Lの捕捉MAb (100 ng/mL)を対応するウェルに添加し、プレートを攪拌 (450 rpm)しながら37 でインキュベートした。2時間のインキュベーションの後、ウェルをPBSで6回洗浄し、そしてウイルス当量をp24酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)によって定量し、またはRNAをHigh Pure Viral RNA Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, US)を用いて製造業者の使用説明書に従って抽出した。

30

【0146】

5. ネステッドRT-PCR HIV-1 env RNA増幅

単離したHIV-1 env RNAを、RT-PCR Kit (The GeneAmp (登録商標)Gold RNA PCR Reagent Kit; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, US)およびExpand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を用いて逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)によって増幅した。8 μ L容量のRNA鋳型をRT-PCR反応に用い、RNAを50 で20分間、プライマー102 (逆方向)で逆転写した。5 μ L容量のcDNAからプライマー101 (順方向)および104 (逆方向)でenv領域を増幅し、続いて2 μ L容量の鋳型を用いてプライマー179 (順方向)および180 (逆方向)でネステッドPCRを行った。表1を参照のこと。両方のenv PCR増幅の条件は以下のとおりであった: i) 94 で2分間を1サイクル、ii) 94 で2分間、55 で1分間および72 で3分間を35サイクル、iii) 72 で7分間を1サイクル、そしてiv) 4 で停止。得られた増幅産物 (2583 bp)を、SYBR (登録商標)Safe DNA gel stainで染色した1.0%アガロースゲル中で1 Kb分子量マーカーと共に電気泳動した。

40

【0147】

6. env 遺伝子のクローニングおよび配列決定

前工程のPCR産物を、上記のようなpNL4.3およびpcDNA3.1ベクターに

50

クローニングした。Stb12およびDH5 コンピテント細胞を、先に示したようにこれらのプラスミドで形質転換した。プラスミドDNAを、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, US) を用いて精製し、env 遺伝子の存在を確認するためにXbaIおよびNotIでさらに消化した。env 陽性クローンを、BigDye (登録商標) Terminator v3.1ならびにプライマー183 (順方向)、185 (順方向)、186 (順方向)、190 (逆方向)、192 (逆方向) および193 (逆方向) を用いて配列決定した。表1を参照のこと。

【0148】

7. 配列分析

ヌクレオチド配列のアラインメントを、CLUSTAL Wプログラム (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/FTP/>, February 2011) およびBioEdit 7.0.9.0バージョンに組み込まれたContig Assembly Program (CAP) アプリケーションを用いて行い、次いで手動で編集した。Thompson Jら, Nucl. Acids Res. 1994; 22(22): 673~4680 およびHuang X, Genomics 1992; 14(1): 18~25を参照のこと。

【0149】

【表1】

プライマー ID	配列	ゲノム位置	配列番号
101	TAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAG	5853-5877	5
102	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT	8936-8913	6
104	AGCTGGATCCGTCTCGAGATACTGCTCC CACCC	8916-8882	7
179	GTAGTACATGTAATGCAACC	6050-6069	8
180	AGCTCGTCTCATTCTTTCCC	8865-8846	9
183	CCAATTCCCATACATTATTGTGC	6858-6880	10
185	GGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC	7794-7817	11
186	GAGTTAGGCAGGGATACTCACC	8344-8365	12
190	GCCAGGACTCTTGCCCTGGAGCTG	7969-7947	13
192	CTTGTATTGTTGTTGGGTC	7135-7117	14
193	CATGGCTTTAGGCTTTGATCCC	6580-6559	15

表1: プライマー配列および遺伝子位置。遺伝子位置は、HIV-1 HXB2ゲノムに基づく (GenBankアクセッション番号K03455)。¹Wei Xら, Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46(6): 1896~1905。

【0150】

8. 組換えウイルスの作製

該当する変異 (潜在的なグリコシル化部位の欠失およびV1/V2ループ構造の変化) を有する4E10特異的なエンベロープ糖タンパク質を発現するクローンを、250mLの容量中30 で攪拌しながら一晩増幅した。プラスミドDNAを、PureYield (商標) Plasmid Maxiprep System (Promega, Madi

son, WI, US) を用いて精製し、そして293T細胞の一過性同時トランスフェクションに用いた。偽ウイルスを含む上清を、トランスフェクションの2日後に回収した。p24レベルをELISAで定量した。

【0151】

9. 結合アッセイ

インタクトなピリオンへのMAb(4E10、2F5、2G12、b12、およびPG16)の結合を、先に記載した捕捉アッセイで決定した。まず、ウイルス-BMAb結合を促進するために、ウイルスを溶液中でBMAbと共にインキュベートした。次いで、ウイルス-BMAb複合体を、先にプレートに固定化した抗FC抗体によって捕捉した。固定化ウイルス-BMAbを、PBS中の1%Triton-Xで溶解した。ウイルス溶解物中のp24を、上記のようにELISAで定量した。Env pNL4.3構築物をネガティブコントロールとして用いた。結合親和性の増加を、野生型AC-10ウイルスとの比較によって決定した。

10

【0152】

本明細書中の上記すべての刊行物は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0153】

前述の発明は、明瞭性および理解の目的で幾分詳細に記載されているが、本発明の真の範囲および添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、形態および詳細における種々の変更が行なわれ得ることは、本開示の解釈から当業者に理解されよう。

20

【図1】

ENV AC10 SECUENCIADO	130	140	150	16
L1-1 CONFIG ENV
L1-2 CONFIG ENV
L1-3 CONFIG ENV
L1-4 CONFIG ENV
L1-5 CONFIG ENV
L1-6 CONFIG ENV
L2-1 CONFIG ENV
L2-2 CONFIG ENV
L2-3 CONFIG ENV
L2-4 CONFIG ENV
L2-5 CONFIG ENV
L3-2 contig env
L3-3 CONFIG ENV
L3-4 CONFIG ENV
L3-5 CONFIG ENV
Contig BR1 CLON1 pcDNA
Contig BR1 CLON2 pcDNA
Contig BR1 CLON3 pcDNA
Contig BR1 CLON4 pcDNA
Contig BR1 CLON 1
Contig BR1 CLON 4
Contig BR1 CLON 6

FIG. 1

【図2】

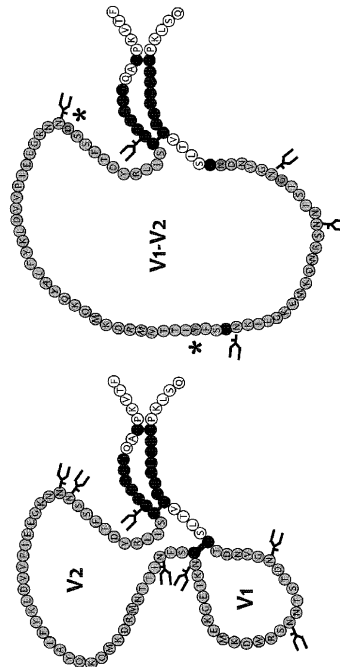


FIG. 2

【 図 3 】

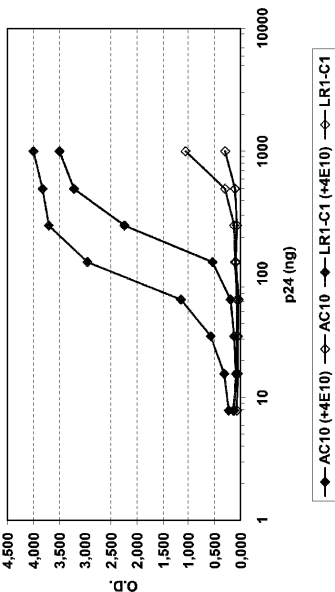
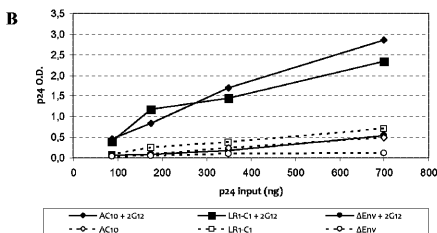
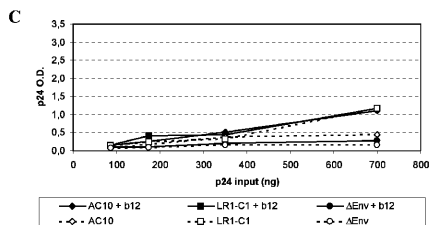


FIG. 3

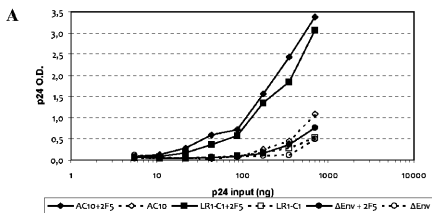
【 図 4 B 】



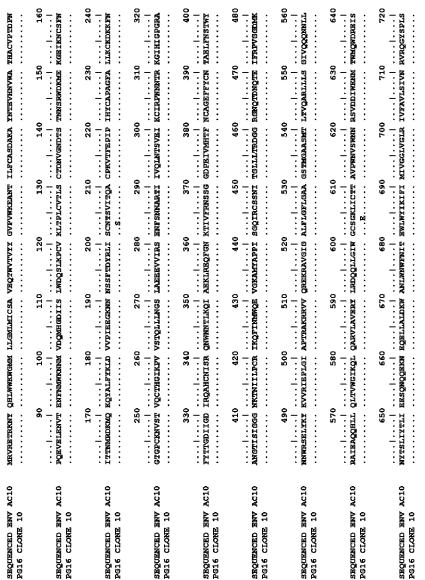
【 図 4 C 】



【 図 4 A 】



【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】

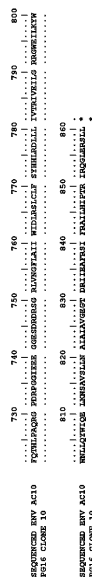


FIG. 5

FIG. 5 (cont.)

【配列表】

2015508279000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/053185

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/16 A61K39/21 G01N33/569 G01N33/68 C12N15/10 ADD.		
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) C07K C12N		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SANCHARI BHATTACHARYYA: "Design of a Non-glycosylated Outer Domain-derived HIV-1 gp120 Immunogen That Binds to CD4 and Induces Neutralizing Antibodies*", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 35, 17 June 2010 (2010-06-17), pages 27100-27110, XP055003376, DOI: 10.1074/jbc.M110.152272 figures 2, 8 table 2 ----- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 May 2012		30/05/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brouns, Gaby

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/053185

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MING LI ET AL: "Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 79, no. 16, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 10108-10125, XP008136718, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005 cited in the application page 10113, paragraph middle	1-16
X	SCHILLING K ET AL: "P05-01. Generation of a HI-viral packaging cell line as scaffolding for a lentiviral display system", RETROVIROLOGY, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 6, no. Suppl 3, 22 October 2009 (2009-10-22), page P77, XP021064194, ISSN: 1742-4690, DOI: 10.1186/1742-4690-6-S3-P77	17-19, 22-25
Y	last paragraph	20,21, 26,27
X	Ralf Wagner: "Immunogen design and gene delivery", 1 January 2006 (2006-01-01), XP055003325, University of Regensburg Retrieved from the Internet: URL:http://www.wagner-lab.de/research/immunogen-design.html [retrieved on 2011-07-21]	17-19, 22-25
Y	paragraph [5.3.2]	20,21, 26,27
A	DERCY SA-FILHO ET AL: "Characterization of the Full-Length Human Immunodeficiency Virus-1 Genome from Recently Infected Subjects in Brazil", AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 23, no. 9, 6 October 2007 (2007-10-06), pages 1087-1094, XP055003469, DOI: 10.1089/aid.2006.0173 figure 3	1-16

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/053185

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	-& D Sa-Filho: "EF637050 HIV-1 isolate BREPM1033 from Brazil, complete genome.", GenBank, 11 October 2007 (2007-10-11), XP055003468, DOI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF637050 Retrieved from the Internet: URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF637050 [retrieved on 2011-07-25] abstract	1-16
Y	----- RAN TAUBE ET AL: "Lentivirus Display: Stable Expression of Human Antibodies on the Surface of Human Cells and Virus Particles", PLOS ONE, vol. 3, no. 9, 11 September 2008 (2008-09-11), page E3181, XP55027886, DOI: 10.1371/journal.pone.0003181 page 4, last paragraph page 5, paragraph 1	20,21,26
Y	----- BURTON DENNIS R ET AL: "HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem", NATURE IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 5, no. 3, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 233-236, XP002411182, ISSN: 1529-2908, DOI: 10.1038/NI0304-233 table 1	27
A	----- JOHANNES H URBAN ET AL: "Retroviral Display in Gene Therapy, Protein Engineering, and Vaccine Development", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 6, no. 1, 20 December 2010 (2010-12-20), pages 61-74, XP55003501, DOI: 10.1021/cb100285n	17-27
A	----- Levin: "Optimizing the affinity and specificity of proteins with molecular display", Molecular Biosystems, 8 November 2005 (2005-11-08), pages 49-57, XP55003287, DOI: 10.1039/b511782h Retrieved from the Internet: URL: http://www.chem.uci.edu/~gweiss/Levin-MolBios-06.pdf [retrieved on 2011-07-20] -----	17-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/053185

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/053185**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

7, 8, 17-27(completely); 1-6, 9-16(partially)

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2012/ 053185

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 7, 8(completely); 1-6, 9-16(partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising C131Y, T132N, D138G and N160Y mutations with respect to the numbering of SEQ ID NO:2.

2. claims: 1-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising N203S and G604E mutations with respect to the numbering of SEQ ID NO:2.

3. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Asn at position 88 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a N88D mutation

4. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Cys at position 131 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a C131Y mutation

5. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Thr at position 132 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a T132N mutation

6. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Asp at position 138 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a D138G mutation

7. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Asn at position 160 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a N160Y mutation

8. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at

International Application No. PCT/ EP2012/ 053185

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

least a mutation of Asn at position 191 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a N191D mutation

9. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Asn at position 203 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a N203S mutation

10. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Ala at position 226 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a A226V mutation

11. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Met at position 479 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a M479I mutation

12. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Arg at position 507 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a R507W mutation.

13. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Gly at position 604 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a G604E mutation.

14. claims: 2-6, 9-16(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Tyr at position 647 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a Y647N mutation.

15. claims: 17-27

Relating to a method for identifying immunogens capable of eliciting neutralizing antibodies using lentiviral display.

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 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N	7/00	
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K	39/21	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
	G 0 1 N	33/569	H

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(71)出願人 513210116

フンダシオ プリバダ インスティトゥト デ レセルカ デラ シダ - カイサ

FUNDACIO PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE LA SIDA - CAIXA

スペイン国 エ - 0 8 9 1 6 バダロナ、カレテラ デ カニエト(番地なし)、オスピタル ウニベルシタリ ヘルマンス トウリアス イ プホル

(74)代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74)代理人 100103447

弁理士 井波 実

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(74)代理人 100180873

弁理士 田村 慶政

(72)発明者 ユステ エランス、マリア エロイサ

スペイン国 エ - 0 8 0 3 6 バルセロナ、カサノバス 1 4 3、オスピタル クリニック

(72)発明者 サンチェス メリノ、ビクトル

スペイン国 エ - 0 8 0 3 6 バルセロナ、カサノバス 1 4 3、オスピタル クリニック

(72)発明者 フェレイラ、カロリナ

スペイン国 エ - 0 8 9 0 3 オスピタレト デ リョブレガト、プリンシパル 2、パリス 1 3

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA35 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04

GA11 HA08

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA97X AA97Y AB01 BA02 CA24 CA45

CA46

4C084 AA13 NA14 ZB331 ZB332 ZC551 ZC552

4C085 AA03 BA69 EE01

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZB33 ZC55

4H045 AA11 AA30 BA09 CA05 CA40 DA75 DA86 EA20 EA53 FA74

专利名称(译)	快速选择HIVGP-120变种		
公开(公告)号	JP2015508279A	公开(公告)日	2015-03-19
申请号	JP2013554913	申请日	2012-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	埃斯蒂文博士实验室股份有限公司 匈奴汤股票期权里瓦达因研究所政党成员阿尔CERCA德拉藤佳兆业 私人艾滋病研究基金会-银行		
申请(专利权)人(译)	实验室男性德尔博士埃斯特维Soshiedaddo , ANONIMA Fundashio Puribada研究所政党成员去Reseruka德拉藤 - 佳兆业		
[标]发明人	ユステエランスマリアエロイサ サンチェスメリノビクトル フェレイラカロリナ		
发明人	ユステ エランス、マリア エロイサ サンチェス メリノ、ビクトル フェレイラ、カロリナ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/155 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 A61K39/21 A61P31/18 A61K48/00 A61K35/76 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/18 C07K14/005 C07K2317/76 C12N15/1037 C12N2740/16043 C12N2740/16122 C12N2799/027 G01N33/6854 G01N2333/162 G01N2469/20 C07K16/1063 G01N33/56988		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/155 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N7/00 A61K39/21 A61P31/18 A61K48/00 A61K35/76 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.H		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA35 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024 /DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA97X 4B065/AA97Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065 /CA45 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C084/ZC551 4C084 /ZC552 4C085/AA03 4C085/BA69 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB33 4C087/ZC55 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA05 4H045 /CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	伊奈美稔 田村 庆政		
优先权	2011382051 2011-02-25 EP 61/446595 2011-02-25 US		
其他公开文献	JP6140614B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及基于重组病毒文库的结合的免疫原快速选择 (RIS) 方法，所述重组病毒文库包含在中和抗体上呈递的表面多肽的随机化变体。本发明还涉及通过本发明的RIS方法分离的免疫原在药物中的用途，所述药物用于治疗由病毒引起的疾病和用于鉴定患者中的中和抗体的诊断。

