

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5978212号
(P5978212)

(45) 発行日 平成28年8月24日 (2016. 8. 24)

(24) 登録日 平成28年7月29日 (2016. 7. 29)

(51) Int. Cl.	F 1				
C 1 2 N 15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	
C 1 2 N 1/15	(2006. 01)	C 1 2 N	1/15		
C 1 2 N 1/19	(2006. 01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N 1/21	(2006. 01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N 5/10	(2006. 01)	C 1 2 N	5/10		

請求項の数 26 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-526120 (P2013-526120)	(73) 特許権者	391008788
(86) (22) 出願日	平成23年8月24日 (2011. 8. 24)		アボット・ラボラトリーズ
(65) 公表番号	特表2013-538059 (P2013-538059A)		ABBOTT LABORATORIES
(43) 公表日	平成25年10月10日 (2013. 10. 10)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/048910		パーク アボット パーク ロード 10
(87) 国際公開番号	W02012/027440		0
(87) 国際公開日	平成24年3月1日 (2012. 3. 1)	(74) 代理人	110001173
審査請求日	平成26年8月21日 (2014. 8. 21)		特許業務法人川口国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	61/376, 590	(72) 発明者	ベルク, ジョナサン
(32) 優先日	平成22年8月24日 (2010. 8. 24)		アメリカ合衆国、ニュー・ハンプシャー・
(33) 優先権主張国	米国 (US)		03753、グランサム、デアイア・ラン
微生物の受託番号	ATCC PTA-2809		・12、ピー・オー・ボックス・740

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIVコアタンパク質に特異的な抗体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

H I V - 1 及び / 又は H I V - 2 コアタンパク質に結合する単離された抗体であって、
H I V - 1 コアタンパク質 (p 2 4) 及び / 又は H I V - 2 コアタンパク質 (p 2 6) に
対して、A . T . C . C 寄託番号 P T A - 2 8 0 9 である細胞系によって産生される抗体
である H I V 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 m A b より大きな抗原結合親和性を示し、前記
抗体は、

配列番号 5、配列番号 6 及び配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む抗体の H 1、H
2 及び H 3 の相補性決定領域 (C D R)、及び、配列番号 1 0、配列番号 1 1 及び配列番
号 1 2 のアミノ酸配列をそれぞれ含む抗体の L 1、L 2 及び L 3 の C D R、並びに

配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含む抗体の H
1、H 2 及び H 3 の C D R、及び、配列番号 1 8、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 のアミ
ノ酸配列をそれぞれ含む抗体の L 1、L 2 及び L 3 の C D R

からなる群から選択される 6 個の C D R を含む、抗体。

【請求項2】

7 p M 未満の平衡解離定数 (K D) で p 2 4 に免疫特異的に結合する、請求項 1 に記載
の抗体。

【請求項3】

請求項 1 又は 2 に記載の抗体であって、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体
、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体

、一本鎖 Fv、単ドメイン抗体、Fab フラグメント、F(ab')₂ フラグメント、ジスルフィド連結 Fv、抗イディオタイプ抗体及びそれらの機能的に活性があるエピトープ結合フラグメントからなる群から選択される、抗体。

【請求項 4】

抗体の重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 46、54、50 及び 58 からなる群から選択される重鎖配列を含む、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

抗体の軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 47、55、51 及び 59 からなる群から選択される軽鎖配列を含む、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 6】

抗体の重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 46 及び 54 からなる群から選択される重鎖配列を含み、抗体の軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 47 及び 55 からなる群から選択される軽鎖配列を含む、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 7】

抗体の重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 50 及び 58 からなる群から選択される重鎖配列を含み、抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 51 及び 59 からなる群から選択される軽鎖配列を含む、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 8】

一本鎖抗体である、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 9】

VL 領域が、GPAKELTPLKEAKVS (配列番号 26) リンカーによって VH 領域に付着している、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

マウスモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 11】

マウス - ヒトキメラ抗体である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

固体の基材に付着している、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体をコードしている核酸。

【請求項 14】

発現カセットの中にある、請求項 13 に記載の核酸。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体をコードしている核酸でトランスフェクトされた細胞であって、核酸によってコードされる抗体を発現する細胞。

【請求項 16】

哺乳動物細胞、昆虫細胞及び真菌細胞からなる群から選択される、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 17】

哺乳動物細胞である、請求項 16 に記載の細胞。

【請求項 18】

CHO 細胞である、請求項 17 に記載の細胞。

【請求項 19】

試験サンプル中における HIV - 1 抗原及び HIV - 2 抗原からなる群から選択される 1 つ又は複数の抗原の存在を検出する方法であって、

試験サンプルを、抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間及び条件下で、ヒト免疫不全ウイルス - 1 タンパク質 p24 及び / 又はヒト免疫不全ウイルス - 2 タンパク質 p26 に結合する請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体の少なくとも 1 つと接触させるステップ；及び

抗体 / 抗原複合体を検出するステップであり、ここで、複合体の存在が試験サンプル中

10

20

30

40

50

における少なくともH I V - 1又はH I V 2抗原の存在を示すステップ；
を含む方法。

【請求項20】

抗体が標識されており、検出が標識を検出することを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

下記ステップをさらに含む、請求項19に記載の方法：

複合体を含む結合した抗原にコンジュゲートを結合させるのに十分な時間及び条件下で、コンジュゲートを抗体/抗原複合体と接触させるステップであり、ここで、コンジュゲートが、検出可能なシグナルを発生できるシグナル発生化合物に付着した二次抗体を含むステップ；及び

シグナル発生化合物によって発生したシグナルを検出することによって試験サンプル中に存在する抗原の存在を検出するステップであり、ここで、シグナルの存在又は強度が、試験サンプル中におけるH I V - 1抗原及びH I V - 2抗原からなる群から選択される少なくとも1つの抗原の存在を示すステップ。

【請求項22】

試験サンプル中におけるH I V - 1抗原及びH I V - 2抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を検出する方法であって、

試験サンプルを、抗体/抗原複体の形成に十分な時間及び条件下で、ヒト免疫不全ウイルス - 1タンパク質 p 2 4 及び/又はヒト免疫不全ウイルス - 2タンパク質 p 2 6 に結合する少なくとも1つの一次抗体と接触させるステップ；及び

結合した抗原にコンジュゲートを結合させるのに十分な時間及び条件下で、得られた抗体/抗原複体にコンジュゲートを添加するステップであり、ここで、コンジュゲートが検出可能なシグナルを発生できるシグナル発生化合物に付着した請求項1～11のいずれか一項に記載の抗体を含むステップ；及び

シグナル発生化合物によって発生したシグナルを検出することによって試験サンプル中に存在する可能性がある抗原の存在を検出するステップであり、ここで、シグナルの存在又は量が、試験サンプル中におけるH I V - 1抗原及びH I V - 2抗原からなる群から選択される少なくとも1つの抗原の存在を示すステップ；

を含む方法。

【請求項23】

試験サンプル中におけるH I V - 1抗原及びH I V - 2抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を検出する方法であって、

1) 固体支持体に結合している、H I V - 1 p 2 4 抗原及び/又はH I V - 2 p 2 6 抗原に結合する一次抗体、2) 試験サンプル及び3) シグナル発生化合物が付着している、H I V - 1 p 2 4 抗原及び/又はH I V - 2 p 2 6 抗原に結合する二次抗体を含む指示薬を接触させて混合物を形成させるステップであり、ここで、一次抗体及び/又は二次抗体が請求項1～11のいずれか一項に記載の抗体であるステップ；及び

抗体/抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間及び条件下で、混合物をインキュベートするステップ；及び

シグナル発生化合物によって発生した測定可能なシグナルの存在を検出するステップであり、ここで、シグナルの存在又は量が、試験サンプル中におけるH I V - 1抗原及びH I V - 2抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を示すステップ；

を含む方法。

【請求項24】

一次抗体が、請求項1～11のいずれか一項に記載の抗体である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

二次抗体が、請求項1～11のいずれか一項に記載の抗体である、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

10

20

30

40

50

試験サンプル中におけるH I V - 1抗原及びH I V - 2抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を検出するキットであって、

H I V - 1 p 2 4 抗原及び/若しくはH I V - 2 p 2 6 抗原に結合する一次抗体；及び/又は

シグナル発生化合物が付着している、H I V - 1 p 2 4 抗原及び/又はH I V - 2 p 2 6 抗原に結合する二次抗体を含む指示薬

を含み、一次抗体及び/又は二次抗体が、請求項1～11のいずれか一項に記載の抗体である、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本出願は、2010年8月24日に提出した米国特許出願公開第61/376,590号の優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、高い結合親和性でヒト免疫不全ウイルス-1(H I V - 1)及びヒト免疫不全ウイルス(H I V - 2)コア抗原に特異的又は優先的に結合する抗体、前記抗体を産生し選択する方法、これらの抗体を利用する、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)を検出するためのイムノアッセイ及びこれらの抗体を含有している治療用組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

20

ヒト免疫不全ウイルス(H I V)は、レンチウイルス(レトロウイルスファミリーのメンバー)である(Gondaら、(1985)、Science、227:173-177頁;Stephanら、(1986)、Science、231:589-594頁)。H I V感染症は、後天性免疫不全症候群(A I D S)の原因になり得る。H I Vの伝染は通常、避妊手段をとっていない性行為、汚染された注射針、母乳を通して、及び出産時に感染している母親から乳児へと起こる。

【0004】

H I Vは、円錐形カプシドに封入された2コピーのプラス一本鎖RNAを有するレトロウイルスである。P 2 4は、1カプシドに約2000コピーのp 2 4が入っているカプシドの主構造タンパク質である。(McGovernら、(2002)、J. Med. Chem.、45(8):1712-1722頁)。ウイルスゲノムは、gag、pol(ポリメラーゼをコードしている)、env(エンベロープ糖タンパク質をコードしている)遺伝子を含めたいくつかの遺伝子を含有する。gag遺伝子は、Pr 55^{G a 8}と命名されたコア前駆体をコードしており、コア前駆体はp 1 7(ミリストイル化gagタンパク質)、p 2 4(主構造タンパク質)、p 7(核酸結合タンパク質)、及びp 9(高プロリンタンパク質)に切断される。

30

【0005】

H I V抗原診断用として最も一般的なマーカーは、ウイルス構造タンパク質である。主要なカプシド構造タンパク質として、p 2 4抗原試験はH I V抗原試験に広く使用されており、抗体試験と並んで初期のH I V感染を診断するのに役立っている。p 2 4抗原のレベルは、感染後1-3週間で著しく増加する。

40

【0006】

アミノ酸配列の高い相同性により、H I V - 1グループM、H I V - 1グループO及びH I V - 2ウイルス由来の主要な成分タンパク質は、抗原性が類似している。H I V - 1グループM、H I V - 1グループO及びH I V - 2のコアタンパク質は、関連性があるが同一ではない。H I Vの遺伝的多様性の決定は予測されておらず、経験的所見に頼っている。H I V種とサブタイプとの間で共有しているエピトープが存在する可能性があるが存在しない可能性もある。H I V 115B-151-423モノクローナル抗体(mAb)は、H I V - 1グループM及びH I V - 1グループOに特異的に結合し、H I V - 2と交差反応する。

50

【0007】

p 2 4 抗原を測定するためのイムノアッセイなど、リガンド結合性アッセイが市販されている。現在のARCHITECT（登録商標）及びPRISM（登録商標）instruments（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）の両方のHIVコンボアッセイは、サンドイッチ形式イムノアッセイにおいてp 2 4 抗原を検出するためのコンジュゲートとしてHIV 115B-151-423モノクローナル抗体（mAb）を利用する。HIV 115B-151-423mAbは、HIV-1グループM及びHIV-1グループOに特異的に結合し、HIV-2と交差反応する。

【0008】

10

米国特許第7,531,642号（以下「642」特許と記載する）は、p 2 4 上の様々なエピトープに対して単一特異的に反応する単離されたHIV抗体を開示している。より具体的には、「642」特許は、単離されたHIV 115-151-423モノクローナル抗体について記載している。HIV 115-151-423モノクローナル抗体は、A.T.C.C寄託番号PTA-2809である細胞系によって産生される。「642」特許は、生体サンプル中のHIV-1抗原及びHIV-2抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を決定するためのイムノアッセイにおける抗体の使用についても記載している。

【0009】

現在最も優れたHIVイムノアッセイは、患者サンプル1mL当たり約10pgのp 2 4 抗原の検出限界を持つ高感度であるにもかかわらず（Abbott HIV Ab/Agコンボアッセイ）、その感度は核酸試験（NAT）よりまだ500-1000倍低い（Johansonら、（2001）、J. Virological Meth.、95:81-92頁）。Abbott HIV Ab/Agコンボアッセイは、患者サンプルを微小球体と一緒に18分間インキュベートする。他のいくつかの刊行物（Ondoaら、（2009）、Cytometry Part B (Clinical Cytometry)、76B:231-236頁；Ishikawaraら、（1998）、J. Clin. Lab. Anal.、12(6):343-350頁）は、20時間などかなり長いインキュベーション時間で約1pg/mlのより高い感度を報告した（上記Ishikawaraら（1998））。イムノアッセイの感度を増加させるために研究されている全ての手段に共通して、結合抗体の抗原結合親和性を増加させるにつれて、特定の時間内により多くの抗原に結合することにより直接に感度の改善がもたらされ得る。改良された感度を持つイムノアッセイは、速いサンプル処理時間及び低コストを含めた利点により、NATに対抗することができる。

20

30

【0010】

HIVイムノアッセイなどのイムノアッセイに使用される抗体の特異性及び感度は極めて重要である。1つ又は複数の抗体の特異性及び感度の両方を増加させる1つの方法は、目的とする標的（すなわち抗原）に対する抗体の結合親和性を改良することである。目的とする標的に対して改良された結合親和性を有する抗体は、特異性及び感度の増加を示すはずである。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】米国特許第7,531,642号明細書

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Gondaraら、（1985）、Science、227:173-177頁

【非特許文献2】Stephanら、（1986）、Science、231:589-594頁

50

【非特許文献3】McGovernら、(2002)、J. Med. Chem.、45(8) : 1712 - 1722頁

【非特許文献4】Johansonら、(2001)、J. Virological Meth.、95 : 81 - 92頁

【非特許文献5】Ondoaら、(2009)、Cytometry Part B (Clinical Cytometry)、76B : 231 - 236頁

【非特許文献6】Ishikawaraら、(1998)、J. Clin. Lab. Anal.、12(6) : 343 - 350頁

【発明の概要】

【0013】

10

(発明の要旨)

本発明は、HIVコア抗原に結合する新規な抗体の同定に関する。特定の実施形態において、単離された抗体が提供され、その抗体はHIV-I及び/又はHIV-2コアタンパク質に結合し、HIV-1コアタンパク質(p24)及び/又はHIV-2コアタンパク質(p26)に対してHIV 115B-151-423 mAbより高い抗原結合親和性を示す。特定の実施形態において、抗体は、約7 pM未満の平衡解離定数(K_D)、約5 pM未満の平衡解離定数、より好ましくは約1 pM未満の平衡解離定数でp24に免疫特異的に結合する。様々な実施形態において、抗体は相補性決定領域L1、L2及びL3を含む軽鎖可変ドメイン並びに相補性決定領域H1、H2及びH3を含む重鎖可変ドメインを含み、ここで軽鎖可変ドメインのL1、L2若しくはL3 CDRの1つ若しくは複数のアミノ酸配列は、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のL1、L2及び/若しくはL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、並びに/又は重鎖可変ドメインのH1、H2若しくはH3 CDRの1つ若しくは複数のアミノ酸配列は、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のH1、H2及び/若しくはH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。特定の実施形態において、抗体のL3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のL3 CDRのアミノ酸配列を含み、並びに/又はこの抗体のH2及び/若しくはH3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のH2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。特定の実施形態において、抗体のH2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のH2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。特定の実施形態において、抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、並びに/又はこの抗体のL1、L2及びL3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のL1、L2及びL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。特定の実施形態において、抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、この抗体のL1、L2及びL3 CDRは、115B-151-423 AM1のL1、L2及びL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。特定の実施形態において、抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM2のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、この抗体のL1、L2及びL3 CDRは、115B-151-423 AM1のL1、L2及びL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。特定の実施形態において、抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM2のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

20

30

40

50

【0014】

様々な実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、一本鎖Fv、単ドメイン抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、ジスルフィド連結Fv、抗イディオタイプ抗体及びそれらの機能的に活性があるエピトープ結合フラグメントからなる群から選択される。特定の実施形態において、抗体の重鎖のアミノ酸配列は、図1-4に示される重鎖の配列を含む。特定の実施形態において、抗体の軽鎖のアミノ酸配列は、図1-4に示される軽鎖の配列を含む。特定の実施形態において、抗体の重鎖のアミノ酸配列は、図1-4に示される重鎖の配列を含み、この抗体の軽鎖のアミノ酸配列は、図1-4に示される軽鎖の配列を含む。様々な実施形態において、抗体は一本鎖抗体である。様々な実施形態において、VL領域は、表3に示されるリンカーによってVH領域に付着される。特定の実施形態において、VL領域はGPAKELTKLKEAKVS（配列番号26）リンカーによってVH領域に付着されている。特定の実施形態において、抗体はマウスモノクローナル抗体である。特定の実施形態において、抗体はマウス-ヒトキメラ抗体である。特定の実施形態において、抗体は固体の基材に付着されている。

10

【0015】

様々な実施形態において、核酸が提供され、この核酸は本明細書に記載の任意の1つ又は複数の抗体をコードする。様々な実施形態において、核酸は発現カセットの中にある。そのような核酸でトランスフェクトされた細胞が提供され、この細胞は核酸によってコードされる抗体を発現する。特定の実施形態において、細胞は哺乳動物細胞、昆虫細胞及び真菌細胞からなる群から選択される細胞である。特定の実施形態において、細胞は哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）である。

20

【0016】

様々な実施形態において、試験サンプル中におけるHIV-1抗原及びHIV-2抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を検出する方法が提供される。この方法は通常、試験サンプルを、抗体/抗原複合体の形成に十分な時間及び条件下で、ヒト免疫不全ウイルス-1タンパク質p24及び/又はヒト免疫不全ウイルス-2タンパク質p26に結合する本明細書に記載の抗体の少なくとも1つと接触させるステップ；抗体/抗原複合体を検出するステップであって、この複合体の存在は試験サンプル中における少なくともHIV-1又はHIV-2抗原の存在を示すステップを含む。特定の実施形態において、抗体は標識されており、検出はこの標識を検出することを含む。特定の実施形態において、この方法はさらに、複合体を含む結合した抗原にコンジュゲートを結合させるのに十分な時間及び条件下で、コンジュゲートを抗体/抗原複合体と接触させるステップであって、このコンジュゲートが検出可能なシグナルを発生できるシグナル発生化合物に付着した二次抗体を含むステップ；シグナル発生化合物によって発生したシグナルを検出することによって試験サンプル中に存在する抗原の存在を検出するステップであって、このシグナルの存在又は強度が、試験サンプル中におけるHIV-1抗原及びHIV-2抗原からなる群から選択される少なくとも1つの抗原の存在を示すステップを含む。

30

【0017】

特定の実施形態において、試験サンプル中におけるHIV-1抗原及びHIV-2抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を検出する方法が提供され、この方法は、試験サンプルを、抗体/抗原複合体の形成に十分な時間及び条件下で、ヒト免疫不全ウイルス-1タンパク質p24及び/又はヒト免疫不全ウイルス-2タンパク質p26に結合する少なくとも1つの一次抗体と接触させるステップ；結合した抗原にコンジュゲートを結合させるのに十分な時間及び条件下で、得られた抗体/抗原複合体にコンジュゲートを添加するステップであって、このコンジュゲートは検出可能なシグナルを発生できるシグナル発生化合物に付着した（又は付着できる）本明細書に記載の抗体を含むステップ；シグナル発生化合物によって発生したシグナルを検出することによって試験サンプル中に存在する可能性のある抗原の存在を検出するステップであって、シグナルの存在又は

40

50

量は、試験サンプル中におけるH I V - 1 抗原及びH I V - 2 抗原からなる群から選択される少なくとも1つの抗原の存在を示すステップを含む。

【0018】

特定の実施形態において、試験サンプル中におけるH I V - 1 抗原及びH I V - 2 抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を検出する方法が提供され、この方法は、1) 固体支持体に結合している、H I V - 1 p 2 4 抗原及び/又はH I V - 2 p 2 6 抗原に結合する一次抗体、2) 試験サンプル及び3) シグナル発生化合物が付着している、H I V - 1 p 2 4 抗原及び/又はH I V - 2 p 2 6 抗原に結合する二次抗体を含む指示薬を接触させて混合物を形成させるステップであって、この一次抗体及び/又は二次抗体は本明細書に記載の抗体であるステップ; 抗体/抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間及び条件下で、混合物をインキュベートするステップ; シグナル発生化合物によって発生する測定可能なシグナルの存在を検出するステップであって、シグナルの存在又は量は、試験サンプル中におけるH I V - 1 抗原及びH I V - 2 抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を示すステップを含む。特定の実施形態において、一次抗体及び/又は二次抗体は、本明細書に記載の抗体である。

10

【0019】

様々な実施形態において、試験サンプル中におけるH I V - 1 抗原及びH I V - 2 抗原からなる群から選択される1つ又は複数の抗原の存在を検出するためのキットが提供される。特定の実施形態において、このキットは、H I V - 1 p 2 4 抗原及び/若しくはH I V - 2 p 2 6 抗原に結合する一次抗体; 及び/又はシグナル発生化合物が付着している、H I V - 1 p 2 4 抗原及び/又はH I V - 2 p 2 6 抗原に結合する二次抗体を含む指示薬を含み、一次抗体及び/又は二次抗体は本明細書に記載の抗体である。

20

【0020】

定義

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを意味するために本明細書において互換的に使用される。これらの用語は、1つ又は複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的類似体であるアミノ酸ポリマー及び天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。この用語は、ポリペプチドを組成しているアミノ酸を接合する従来のペプチド結合の変異体も含む。好ましい「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、その炭素がペプチド結合によって連結しているアミノ酸の鎖である。特定の実施形態において、ペプチドを含むアミノ酸残基は「L型」アミノ酸残基であるが、様々な実施形態において、「D」アミノ酸がこのペプチドに組み込まれることがあると認識される。ペプチドは、1つ又は複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的類似体であるアミノ酸ポリマー及び天然に存在するアミノ酸ポリマーも含む。加えて、この用語は、ペプチド結合によって接合されているアミノ酸又は他の「修飾された結合」(例えばペプチド結合が - エステル、 - エステル、チオアミド、ホスホンアミド、カルボメート、ヒドロキシルなどと置き換えられ(例えば、Spatolaら、(1983)、Chem. Biochem. Amino Acids and Proteins、7:267-357頁を参照のこと)、アミドが飽和アミンで置き換えられる(例えば、Skilesら、U.S. Pat. No. 4,496,542、参照により本明細書に組み込む、及びKaltenbrunnら、(1990)、969-970頁、第11回 American Peptide Symposium、ESCOM Science Publishers、The Netherlands、などを参照のこと。))によって接合されているアミノ酸に適用される。

30

40

【0021】

本明細書において、「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子若しくは免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって実質的にコードされている1つ若しくは複数のポリペプチドからなるタンパク質又はそのような「前駆体」から得られるタンパク質(例えば、親和性成熟、チェーンシャッフリングなどによる)を意味する。認識されている免疫グロブリン遺伝

50

子には、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 及び μ の定常領域遺伝子並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、 κ 又は λ として分類されている。重鎖は、 μ 、 γ 、 δ 又は ϵ として分類されており、これらは免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEをそれぞれ定義している。

【0022】

本明細書において、用語「抗体（単数）」及び「抗体（複数）」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体（完全に又は部分的にヒト化されている）、動物抗体（例えば、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウス）、ヒト以外の霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジーなどのサル）を含めた哺乳動物から得られる）、組換え抗体、キメラ抗体、一本鎖Fvs (scFv)、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、ジスルフィド連結Fv (sdFv)、化学的に結合しているFv (ccFv)及び抗イディオタイプ（抗Id）抗体（例えば本発明の抗体に対する抗Id抗体を含める）、及び上記いずれかの機能的に活性なエピトープ結合フラグメントが含まれる。特定の実施形態において、抗体はアフィボディ、ナノボディ及びユニボディも含む。特定の実施形態において、特定の抗体には免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち抗原結合部位を含有する分子が含まれる。免疫グロブリン分子は、どんな型（例えばIgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂）又はサブクラスであることもできる。

10

20

【0023】

本明細書において、用語「会合速度」、「 k_{on} 」又は「 k_a 」は本明細書において互換的に使用されており、標的抗原に対する抗体の結合強度（程度）を示す値又は以下に示すmAbと抗原との複合体形成の速度を意味する：



会合定数（ k_a ）を決定する方法は、当技術分野において周知である。例えば、BIAcore（登録商標）（GE Healthcare、NJ）など表面プラズモン共鳴アッセイが使用され得る。さらに、Sapidyne Instruments（Boise、Idaho）から入手可能なKINEXA（登録商標）アッセイ（動的排除アッセイ（Kinetic Exclusion Assay））も使用され得る。

30

【0024】

本明細書において、用語「解離速度」、「 k_{off} 」又は「 k_d 」は本明細書において互換的に使用されており、標的抗原からの抗体の解離強度（程度）を示す値又は以下に示すAb - Ag複合体の遊離mAbと抗原への経時的な分離を意味する：



解離定数（ k_d ）を決定する方法は、当技術分野において周知である。例えば、BIAcore（登録商標）（GE Healthcare、NJ）など表面プラズモン共鳴アッセイが使用され得る。加えて、Sapidyne Instruments（Boise、Idaho）から入手可能なKINEXA（登録商標）アッセイ（動的排除アッセイ）も使用され得る。

40

【0025】

本明細書において、用語「平衡解離定数」または「 K_D 」は本明細書において互換的に使用され、会合速度（ k_{on} ）で解離速度（ k_{off} ）を割ることによって得られる値を意味する。会合速度、解離速度及び平衡解離定数は、抗原に対する抗体の結合親和性を表すために使用される。

【0026】

本明細書において、用語「エピトープ（単数）」又は「エピトープ（複数）」は、対象中で抗原活性又は免疫原性活性を有するポリペプチド又はタンパク質の部位又はフラグメントを意味する。免疫原性活性を有するエピトープは、動物において抗体応答を誘発する

50

ポリペプチド又はタンパク質の部位又はフラグメントである。抗原活性を有するエピトープは、当業者に周知の任意の方法、例えばイムノアッセイで決定された抗体が免疫特異的に結合するポリペプチド又はタンパク質の部位又はフラグメントである。

【0027】

本明細書において、用語「ヒト化」抗体は、免疫グロブリン変異体又はそのフラグメントを意味し、ヒト化抗体は所定の抗原に結合することができ、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域及びヒト以外の免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRを含む。通常、ヒト化抗体は、ヒト以外の供給源から導入された1つ又は複数のアミノ酸残基を有する。一般にヒト化抗体は、少なくとも1つ、通常2つの可変ドメイン（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv）の全てを実質的に含む。可変領域のうち、CDR領域の全て若しくは実質的に全てがヒト以外の免疫グロブリンのCDR領域に対応しており、FR領域の全て若しくは実質的に全てがヒト免疫グロブリン共通配列のFR領域である。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、通常はヒト免疫グロブリンのFcの一部を最適に含む。通常抗体は、軽鎖及び少なくとも重鎖可変ドメインの両方を含有する。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含めた任意のクラスの免疫グロブリン並びにIgG₁、IgG₂、IgG₃及びIgG₄を含めた任意のアイソタイプから選択され得る。ヒト化抗体は、1つ以上のクラス又はアイソタイプ由来の配列を含んでよく、特定の定常ドメインを選択して所望のエフェクター機能を最適化することは当技術分野の範囲である。

【0028】

本明細書において、フレーズ「免疫特異的にp24エピトープに結合する」、「免疫特異的にp24に結合する」及びこれらに類似した用語は、p24又はp24フラグメントに特異的に結合し他のペプチドには特異的に結合しないペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質及び抗体を意味する。フレーズ「免疫特異的にp26エピトープに結合する」、「免疫特異的にp26に結合する」及びこれらに類似した用語は、p26又はp26フラグメントに特異的に結合し他のペプチドには特異的に結合しないペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質及び抗体を意味する。本明細書において、フレーズ「免疫特異的にp24エピトープに及び/又はp26エピトープに結合する」、「免疫特異的にp24及び/又はp26に結合する」及びこれらに類似した用語は、p24又はp24フラグメント又はp24エピトープ及び/又はp26、p26フラグメント及び/又はp26エピトープに特異的に結合し、他のペプチドには特異的に結合しないペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質及び抗体を意味する。特定の実施形態において、p24、p26又はp24及び/若しくはp26又はそれらのフラグメント若しくはエピトープに免疫特異的に結合するペプチド、ポリペプチド、タンパク質又は抗体は、例えばイムノアッセイ、BIACore又は他の当技術分野において公知のアッセイによって決定される低い結合親和性で、他のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に結合する可能性がある。

【0029】

本明細書において、核酸分子に関連する用語「単離された」は、核酸分子の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子を意味する。さらに、cDNA分子など「単離された」核酸分子が、組換え技術によって産生される場合に他の細胞物質若しくは培地を実質的に含まなくすること、又は化学的に合成される場合に化学的前駆体若しくは他の化学薬品を実質的に含まなくすることができる。一態様において、核酸分子が単離される。別の態様において、本発明の抗体をコードしている核酸分子が単離される。

【0030】

本明細書において、用語「厳しい条件」は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）中で、約45でフィルタに結合されたDNAにハイブリダイゼーションさせ、それに続けて0.2×SSC/0.1%SDS中で、約50-65で1回又は複数回洗浄する条件を意味する。用語「非常に厳しい条件下」は、6×SSC中で、約45でフィルタに結合された核酸にハイブリダイゼーションさせ、それに続けて0.1×SSC

10

20

30

40

50

／ 0.2% SDS 中で、約 68 で 1 回又は複数回洗浄する条件下、又は当業者に公知の他の厳しいハイブリダイゼーション条件下を意味する（例えば、Ausubel 編、(1989)、Current Protocols in Molecular Biology、第 1 巻、Green Publishing Associates, Inc. 及び John Wiley & Sons, Inc.、New York、6.3.1 - 6.3.6 頁及び 2.10.3 頁を参照のこと）。

【0031】

本明細書において、用語「対象」及び「患者」は、互換的に使用される。本明細書において、用語「対象（単数）」及び「対象（複数）」は、ヒト以外の哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ブタ、有蹄類、イヌ、ウサギ、ヒト以外の霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジーなどのサル））又はヒトを意味する。

10

【0032】

本明細書において、用語「試験サンプル」は、生物、好ましくは哺乳動物の細胞又は組織から得られる生体サンプルを意味する。例示的なサンプルには、対象の血清、血漿、全血、リンパ液、CNS 液、尿若しくは他の体液を含有するサンプル又はこれらから得られるサンプルが含まれるが、これに限定されるものではない。試験サンプルは、当業者に公知の日常的な技術を使用して調製され得る。

【0033】

本明細書において、用語「治療有効量」又は「医薬として有効な量」は、所望の治療結果を達成するのに必要な用量及び期間での有効な抗体又は抗体部分の量を意味する。正確な投薬量は当業者によって確認される。当技術分野において公知であるように、年齢、体重、性別、人種、食事、投与時間、薬物相互作用及び症状の重症度に基づく調整が必要な場合があり、この調整は当業者による日常の実験で確認される。また治療有効量とは、治療上有益な効果が、抗体又は抗体フラグメントのどんな毒性作用又は有害作用も上回る量である。「予防的な有効量」は、所望の予防結果を達成するために必要な用量及び期間での有効量を意味する。通常、予防的投薬量は疾患より前又は疾患の初期段階に対象に使用されるので、予防的な有効量は治療有効量より少なくなる。

20

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図 1】抗体 115B-151-423AM1 mG1k の重鎖（VH）（配列番号 1）及び、軽鎖（VL）のアミノ酸配列を示す図である。

30

【図 2】抗体 115B-151-423AM2 mG1k の重鎖（VH）（配列番号 2）及び、軽鎖（VL）のアミノ酸配列を示す図である。

【図 3】抗体 115B-151-423AM1 hG1k の重鎖（VH）（配列番号 3）及び、軽鎖（VL）のアミノ酸配列を示す図である。

【図 4】抗体 115B-151-423AM2 hG1k の重鎖（VH）（配列番号 4）及び、軽鎖（VL）のアミノ酸配列を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0035】

特定の実施形態において、HIV-1 及び / 又は HIV-2 コアタンパク質（p24 及び / 又は p26）に対して実質的により高い結合親和性を示す新規な HIV 抗体が提供される。この抗体は、115B-151-423mAb（細胞系 PTA-2809 によって分泌される抗体、米国特許第 7,531,640 号を参照のこと）に変異を加工して、抗原結合親和性に約 10 倍以上の改善を示す抗体を産生することによって得られた。

40

【0036】

特定の理論に束縛されるものではないが、新しい抗体は、HIV 115B-151-423 が結合した同じエピトープに結合すると考えられる。より具体的には、特異的に結合する新規な抗体は、HIV-1 グループ M 及び HIV-1 グループ O に結合し、HIV-2 に交差反応すると考えられる（例えば、本明細書の実施例 1 を参照のこと）。

【0037】

50

本明細書に記載の抗体は、診断上妥当なフェムトモル量のH I Vコアタンパク質を検出するために十分高い親和性(K_{eq} 値)を有する。しかし、これらの抗体は、同種であるが同一でないH I V - 1グループM、H I V - 1グループO及びH I V - 2由来のコアタンパク質を等価に検出する広い特異性(すなわち共有反応性)も備えていると考えられる。

【0038】

この抗体は、サンプル中のH I V - 1グループM、H I V - 1グループO及びH I V - 2抗原の検出に十分に適している。この抗体は、H I Vコアタンパク質の単離又は精製にも使用され得る。この抗体は、治療的及び/又は予防的用途における使用も満たす。

【0039】

I . 抗体

前述の通り、特定の実施形態において、新規に単離された抗体が提供され、この抗体はH I Vコアタンパク質に特異的に結合する(免疫特異的に結合する)。抗体はH I V - 1コアタンパク質(p 2 4)に及び/又はH I V - 2コアタンパク質(p 2 6)に結合すると考えられる。抗体は、1つ又は複数の標的抗原に対して米国特許第7, 531, 640号に記載の(細胞系P T A - 2809によって産生された)115B - 151 - 423mAbより実質的に高い結合特異性を示す。特定の実施形態において、抗体は、H I V 115B - 151 - 423mAbより少なくとも約1.5倍、好ましくは少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも約4倍又は少なくとも約8倍及び最も好ましくは少なくとも約10倍高い結合親和性でH I V - 1コアタンパク質及び/又はH I V - 2コアタンパク質に結合する。特定の実施形態において、抗体は、約10 p M未満、より好ましくは約7 p M未満の平衡解離定数(K_D)で、特定の実施形態においては、約7 p Mから約100 f Mの K_D でp 2 4及び/又はp 2 6に結合する。

【0040】

また特定の実施形態において、基材又はエフェクター(例えば、検出可能な標識、二次抗体、サイトカインなど)に付着した本明細書に記載の抗H I V抗体を含む組成物も提供される。エフェクターが二次(又はより高次の)抗体を含む場合、二重特異性(又は多特異性)抗体が提供される。

【0041】

p 2 4及び/又はp 2 6に対してmAb 115B - 151 - 423より実質的に高い結合親和性を有する2つの原型の抗体(115B - 151 - 423AM1及び115B - 151 - 423AM2 CDR2)の重鎖及び軽鎖の相補性決定領域(CDR)が、表1及び表2にそれぞれ示される。これらの抗体のVH及びVLドメインの全長アミノ酸配列を、図1 - 4に示す。特に、図1及び図2は、マウス及びマウス - ヒト(IgG1)キメラ]AM1抗体のアミノ酸配列をそれぞれ示し、図3及び図4はマウス及びマウス - ヒト(IgG1)キメラ]AM2抗体のアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【0042】

10

20

30

【表 1】

表1 野生型(115B-151-423抗体(例えば、米国特許第7,531,642号を参照のこと))と比較した115B-151-423AM1抗体の重鎖および軽鎖CDRのアミノ酸配列。

115B-151-423 AM1 CDRs	配列番号
CDR H1: Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Ser-Tyr-Trp-Ile-Glu (GYTF ^T SYWIE)	5
CDR H2: Glu-Ile-Leu-Pro-Gly- <u>Ala</u> -Gly-Ser-Leu-Asn-Asn-Asn-Glu-Lys -Phe-Arg-Asp (EILPG <u>A</u> GSLNNNEKFRD)	6
野生型 CDR H2: Glu-Ile-Leu-Pro-Gly- <u>Thr</u> -Gly-Ser-Leu-Asn-Asn-Asn-Glu-Lys -Phe-Arg-Asp (EILPG <u>T</u> GSLNNNEKFRD)	7
CDR H3:	
Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Ile-Met-Phe</u> -Tyr (GYRYDGIMFY)	8
野生型 CDR H3:	
Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Trp-Phe-Ala</u> -Tyr (GYRYDG <u>WE</u> FAY)	9
CDR L1: Arg-Thr-Ser-Glu-Asn-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Leu-Ala (RTSENIYSYLA)	10
CDR L2: Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu (NTKTLAE)	11
CDR L3: Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Glu-Val</u> -Leu-Thr (QH ^H YD <u>EV</u> LT)	12
野生型 CDR L3: Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Ser-Pro</u> -Leu-Thr (QH ^H YD <u>SPL</u> T)	13

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

【表 2】

表2 野生型(115B-151-423mAb)と比較した115B-151-423AM2抗体の重鎖及び軽鎖CDRのアミノ酸配列。

115B-151-423 AM2 CDR2	配列番号
<u>CDR H1:</u> Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Ser-Tyr-Trp-Ile-Glu (GYTFTSYWIE)	14
<u>CDR H2:</u> Glu-Ile-Leu-Pro-Gly-Thr-Gly-Ser-Leu-Asn-Asn-Asn-Glu-Lys -Phe-Arg-Asp (EILPGTGSLNNNEKFRD)	15
<u>CDR H3:</u> Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Ile-Met-Phe</u> -Tyr (GYRYDG <u>GIMFY</u>)	16
<i>野生型 CDR H3:</i> Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Trp-Phe-Ala</u> -Tyr (GYRYDG <u>WEAY</u>)	17
<u>CDR L1:</u> Arg-Thr-Ser-Glu-Asn-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Leu-Ala (RTSENIYSYLA)	18
<u>CDR L2:</u> Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu (NTKTLAE)	19
<u>CDR L3:</u> Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Glu-Val</u> -Leu-Thr (QHHYD <u>EVLT</u>)	20
<i>野生型 CDR L3:</i> Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Ser-Pro</u> -Leu-Thr (QHHYD <u>SPLT</u>)	21

【0044】

したがって、特定の実施形態において、相補性決定領域L1、L2及びL3を含む軽鎖可変ドメイン並びに相補性決定領域H1、H2及びH3を含む重鎖可変ドメインを含み、軽鎖可変ドメインのL1、L2若しくはL3 CDRの1つ若しくは複数のアミノ酸配列が、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のL1、L2及び/又はL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、並びに/又は重鎖可変ドメインのH1、H2又はH3 CDRの1つ若しくは複数のアミノ酸配列が、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のH1、H2及び/若しくはH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む抗体が意図されている。特定の実施形態において、抗体のL3 CDRは、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のL3 CDRのアミノ酸配列を含み、並びに/又は抗体のH2及び/若しくはH3 CDRは、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のH2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

【0045】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、抗体のH2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のH2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。特定の実施形態において、抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、並びに/又は抗体のL1、L2及びL3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のL1、L2及びL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

【0046】

特定の実施形態において、抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

10

【0047】

特定の実施形態において、抗体のL1、L2及びL3 CDRは、115B-151-423 AM1及び115B-151-423 AM2からなる群から選択される抗体のL1、L2及びL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

【0048】

特定の実施形態において、抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM1のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、抗体のL1、L2及びL3 CDRは、115B-151-423 AM1のL1、L2及びL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

20

【0049】

特定の実施形態において、抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423 AM2のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、抗体のL1、L2及びL3 CDRは、115B-151-423 AM2のL1、L2及びL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

【0050】

様々な実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、一本鎖Fv、単ドメイン抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、ジスルフィド連結Fv、抗イディオタイプ抗体及びそれらの機能的に活性があるエピトープ結合フラグメントからなる群から選択される。

30

【0051】

様々な実施形態において、抗体はFv抗体であり、可変重(VH)ドメイン及び可変軽(VL)ドメインは化学的に結合している(例えばPEG又は他のリンカーを介して)又は抗体は一本鎖タンパク質(scFv)であり、VH及びVLドメインはペプチドリンカーで接合されている。特定の実施形態において、リンカーは長さ約1、2又は3アミノ酸から約30、約40又は約50アミノ酸の範囲である。特定の実施形態において、ペプチドリンカーは長さ約4から約30アミノ酸の範囲、好ましくは長さ約8から約24アミノ酸の範囲である。例示的なリンカーには表3に示されるペプチドリンカーが含まれるが、これに限定されるものではない。

40

【0052】

【表 3】

表3 一本鎖ペプチドにおいてVH領域とVLドメインとを接合するための例示的ペプチド

リンカー

リンカー	配列番号
GGGS	22
GGGS GGGGS	23
GGGS GGGGS GGGGS	24
GGGS GGGGS GGGGS GGGGS	25
GPAKELTPLKEAKVS	26
GSTSGSGKSSEKKG	27
RPLSYRPPFPFGFPSVRP	28
YPRSIYIRRRHPSPLTT	29
TPSHLSHILPSFGLPTFN	30
RPVSPFTFPRLSNSWLPA	31
SPAAHFPRIPRPGPIRT	32
APGPSAPSHRSLPSRAFG	33
PRNSIHFLHPLLVAPLGA	34
MPSLSGVLQVRYLSPPDL	35
SPQYPSPLTLTLPHPSL	36
NPSLNPPSYLHRAPSRIS	37
LPWRTSLLPSPPLRRRPS	38
PPLFAKGPVGLLSRSFPP	39
VPPAPVVSLRSAHARPPY	40
LRPTPRVRSYTCCPTP	41
PNVAHVLPLLTPWDNLR	42
CNPLLPLCARSPAVRTFP	43

10

20

【0053】

特定の実施形態において、CDRが表1及び表2に示されている並びにノ又は重鎖及び軽鎖が図1-4に示される抗体のアミノ酸配列と比較したとき、誘導された抗体又は変異体抗体は、少なくとも1つの重鎖相補性決定領域(「CDR」)(例えば重鎖CDR1、重鎖CDR2又は重鎖CDR3)の中に少なくとも1つの変異(欠失、付加及びノ又は置換など)を含み、軽鎖CDR領域(例えば軽鎖CDR1、軽鎖CDR2又は軽鎖CDR3)の中に少なくとも1つの変異(欠失、付加及びノ又は置換など)を含むことが意図されている。例えばアミノ酸置換をもたらす部位特異的突然変異及びPCR介在突然変異生成を含めた当業者に公知の標準的な技術を使用して、本発明の抗体をコードしている核酸分子に変異(欠失、付加及びノ又は置換など)を導入することができる。一態様において、この誘導体は、CDRが表1及び表2に示されている及びノ又は重鎖及び軽鎖が図1-4に示される抗体と比較して、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換又は2個未満のアミノ酸置換を含む。

30

40

【0054】

一態様において、誘導体は、1つ又は複数の本質的でないと予測されたアミノ酸残基(すなわち、抗体がHIVタンパク質(例えばp24、p26)と免疫特異的に結合するのに重要でないアミノ酸残基)に作られる保存的なアミノ酸置換を有する。「保存的なアミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の電荷を持つ側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられることである。類似の電荷を持つ側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を持つアミノ酸(例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を持つアミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を持つアミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、無極性側鎖を持つアミノ酸

50

(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β -分枝側鎖を持つアミノ酸(例えばトレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖を持つアミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。別法として、変異がコード配列の全部又は一部にランダムに導入され得(飽和突然変異生成によってなど)、得られた変異体は生物活性に関してスクリーニングされて、p 2 4若しくはp 2 4フラグメント及び/又はp 2 6若しくはp 2 6フラグメントに対して増強された結合親和性を示す変異体を同定することができる。突然変異生成の後、コードされている抗体は発現され得、抗体の活性が決定され得る。

【0055】

A) 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 1 及び/又は 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2 と同じエピトープに結合する他の抗体の同定。

【0056】

本発明の抗体は、CDRが表1-2に列挙され及び/若しくは配列が図1-4に示される特定の抗体並びに/又は上述したその置換体の使用に限定されない。実質的に、これらの各々の抗体はHIV-1及び/又はHIV-2コアタンパク質(p 2 4及びp 2 6)上の標的エピトープを同定しており、これらの抗体を使用してより高い親和性で同じエピトープに結合する他の抗体を容易に同定することができる。したがって、特定の実施形態において、本発明の抗体は、CDRが表1-2に列挙され及び/又は配列が図1-4に示される抗体(例えば1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 1 及び/又は 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2)によって特異的に結合されたエピトープを特異的に結合する1つ又は複数の抗体を含む。

【0057】

そのような抗体は、標的エピトープを含むタンパク質に結合する能力について上で列挙した抗体と競合する能力を全抗体、抗体フラグメント又は一本鎖抗体に対してスクリーニングすることによって容易に同定される。言い換えると、候補抗体は、標的HIVコアタンパク質に対する抗体である1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 1 及び/又は 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2 との交差反応性についてスクリーニングされ得る。交差反応性のアッセイ手段は、当業者に周知である(例えば、Dowbenkoら、(1988)、J. Virol., 62: 4703-4711頁を参照のこと)。

【0058】

例えば、特定の実施形態において、交差反応性は固体支持体に付着したHIVコアタンパク質(又は所望のエピトープを含むフラグメント)を準備し、標的タンパク質に対する結合について試験抗体が1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 1 及び/又は 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2 と競合する能力をアッセイすることによって確認され得る。したがって、競合結合形式のイムノアッセイを使用して交差反応性を決定できる。例えば、一実施形態において、HIVコアタンパク質又はそのフラグメントは、固体支持体に固定化される。試験される抗体(例えばファージディスプレイライブラリから選択して生成した、又は全抗体ライブラリ中に生成した)が、アッセイに添加される。試験される抗体は、固定化されたポリペプチドに対する結合について、CDRが表1-2に列挙されており及び/又は配列が図1-4に示される抗体の1つ又は複数の列挙された抗体と競合する。これらの「原型」抗体が固定化されたタンパク質に結合する能力と競合する試験抗体の能力が比較される。次いで、上のタンパク質のパーセント交差反応性は、標準的な計算法を使用して算出され得る。試験抗体が同等又はより高い結合親和性で1つ又は複数の「原型」抗体と競合する場合、この抗体は本発明における使用に十分に適している。

【0059】

1つの例示の実施形態において、交差反応性はBIAcoreの表面プラズモン共鳴を使用して実施される。BIAcoreのフローセル中で、p 2 4及び/若しくはp 2 6タンパク質又はそのフラグメントがセンサチップにカップリングされる。典型的な5 ml / 分の流速で、100 nMから1 μ M抗体の滴定がフローセル表面上に約5分間注入されて

10

20

30

40

50

、表面をほぼ飽和する抗体濃度が決定される。その後、エピトープマッピング又は交差反応性は、ほぼ飽和する濃度において及び抗体の結合量が少なくとも100RUである抗体の対を使用して評価される。結合した抗体の量が、対の各メンバーについて決定され、次いで2つの抗体が一緒に混合され、個々の抗体の測定に使用した濃度と等しい最終濃度を得る。一緒に注入したとき、異なるエピトープを認識する抗体は、基本的には結合したRUが相加的に増加する一方、同一のエピトープを認識する抗体はRUが最小限しか増加しない。特に好ましい実施形態において、一緒に「注入した」ときに抗体が基本的に相加的な増加（好ましくは少なくとも約1.4倍の増加、より好ましくは少なくとも約1.6倍の増加及び最も好ましくは少なくとも約1.8倍又は2倍、又は4倍、又は8倍、又は10倍の増加）を示す場合、抗体は交差反応性であると言われる。

10

【0060】

本明細書で列挙されている抗体（例えば115B-151-423AM1及び/又は115B-151-423AM2）によって認識されるエピトープでの交差反応性は、いくつかの他の標準的な技術によって確認され得る（例えば、Geysenら、(1987)、J. Immunol. Meth., 102:259-274頁を参照のこと）。

【0061】

加えて、115B-151-423AM1及び/又は115B-151-423AM2抗体が、配列決定された（例えば表1及び表2及び/又は図1-4を参照のこと）。したがって、相補性決定領域（CDR）を含むアミノ酸配列は公知である。この配列情報を使用して、同じ又は類似の相補性決定領域が他の抗体に加工されて、全長キメラ抗体及び/又は抗体フラグメントを産生することができ、例えば、種適合性を確保すること、血清半減期を増加させることなどができる。キメラ抗体を生成する多数の方法は、当業者に周知である（例えば米国特許第5,502,167号、第5,500,362号、第5,491,088号、第5,482,856号、第5,472,693号、第5,354,847号、第5,292,867号、第5,231,026号、第5,204,244号、第5,202,238号、第5,169,939号、第5,081,235号、第5,075,431号、及び第4,975,369号を参照のこと）。

20

【0062】

B) 他の「関連した」抗HIV抗体を選択するためのファージディスプレイ法

1) チェーンシャッフリング法

変更された一本鎖抗体（scFv）の遺伝子レパートリを作製するための1つの手法は、本来のV_H又はV_L遺伝子をV遺伝子のレパートリで置き換えて新しい相手を作製する（チェーンシャッフリング）ことである（Clacksonら、(1991)、Nature、352:624-628頁）。チェーンシャッフリング及びファージディスプレイを使用することにより、ハプテンフェニルオキサゾロン（phOx）に結合したヒトscFv抗体フラグメントの親和性が300nMから1nM（300倍）に増加した（Marksら、(1992)、Bio/Technology、10:779-783頁）。

30

【0063】

したがって例えば、抗HIV抗体（例えば115B-151-423AM1及び/又は115B-151-423AM2など）の親和性を変更するために、115B-151-423AM1及び/又は115B-151-423AM2抗体のCDR1（H1）及び/又はCDR2（H2）及び/又はCDR3（H3）を含むV_H遺伝子並びにヒトV_L遺伝子レパートリ（軽鎖シャッフリング）を含有する変異体scFv遺伝子レパートリが作製される。scFv遺伝子レパートリは、ファージディスプレイベクター、例えばpHEN-1（Hoogenboomら、(1991)、Nucleic Acids Res., 19:4133-4137頁）又は他のベクターにクローニングされ得、形質転換の後、形質転換体のライブラリが得られる。次いで、このライブラリはHIV-1及び/又はHIV-2コアタンパク質標的に対してスクリーニングされ、所望の結合親和性を持つメンバーを同定することができる。高親和性結合体が選択され、要望の通り配列決定され得る。

40

50

【0064】

同様に重鎖シャッフリングの場合には、115B-151-423AM1及び/又は115B-151-423AM2抗体のCDR1(L1)及び/又はCDR2(L2)及び/又はCDR3(L3)を含むV_L遺伝子並びにヒトV_H遺伝子レパートリを含有する変異体scFv遺伝子レパートリが作製される。scFv遺伝子レパートリは、ファージディスプレイベクター、例えばpHEN-1(Hoogenboomら、(1991)、Nucleic Acids Res.、19:4133-4137頁)又は他のベクターにクローニングされ得、形質転換の後に形質転換体のライブラリが得られる。次いで、このライブラリはHIV-1及び/又はHIV-2コアタンパク質標的に対してスクリーニングされ、所望の結合親和性を持つメンバーを同定できる。

10

【0065】

高親和性結合体を選択され、要望の通り配列決定され得る。抗体親和性を増加させるチェーンシャッフリングの詳細な説明については、Schierら、(1996)、J. Mol. Biol.、255:28-43頁、などを参照のこと。

【0066】

2) 結合親和性を改良するための部位特異的突然変異生成

通常、抗原接触アミノ酸側鎖の大多数は相補性決定領域(CDR)に位置し、V_H(CDR1(H1)、CDR2(H2)及びCDR3(H3))に3個及びV_L(CDR1(L1)、CDR2(L2)及びCDR3(L3))に3個位置している(Chothiaら、(1987)、J. Mol. Biol.、196:901-917頁; Chothiaら、(1986)、Science、233:755-758頁; Nhanら、(1991)、J. Mol. Biol.、217:133-151頁)。通常、これらの残基は抗原に対する抗体親和性に関与する結合エネルギー論の大多数に寄与している。他の分子において、リガンドに接触するアミノ酸を変異させることが、あるタンパク質分子のその結合パートナーに対する親和性を増加させる効果的な手段になると示されてきた(Lowmanら、(1993)、J. Mol. Biol.、234:564-578頁; Wells、(1990)、Biochemistry、29:8509-8516頁)。CDRの部位特異的突然変異生成及びHIV-1及び/又はHIV-2コアタンパク質に対するスクリーニングは、改良された結合親和性を有する抗体を産生することができる。

20

【0067】

3) 高親和性ヒトscFvを産生するためのCDRのランダム化

単純な部位特異的突然変異生成を拡張することにより、変異体抗体のライブラリが作製され得、この抗体の部分的又は全てのCDRはランダム化(V_LCDR1(L1)、CDR2(L2)及び/又はCDR3(L3)及び/又はV_HCDR1(H1)、CDR2(H2)及び/又はCDR3(H3))されている。一実施形態において、各CDRは、ひな型として公知の抗体(例えば115B-151-423AM1及び/又は115B-151-423AM2)を使用して、別々のライブラリの形でランダム化される。各CDRライブラリ由来の最も高い親和性の変異体のCDR配列が組み合わせられて、親和性の相加的な増加を得る。類似の手法を使用して、ヒト成長ホルモン(hGH)の成長ホルモン受容体に対する親和性を 3.4×10^{-10} から 9.0×10^{-13} Mに1500倍以上増加させた(Lowmanら、(1993)、J. Mol. Biol.、234:564-578頁)。

40

【0068】

V_H CDR3はしばしば結合ポケットの中心を占有する、したがってこの領域の変異は親和性の増加をもたらす可能性がある(Clacksonら、(1995)、Science、267:383-386頁)。一実施形態において、4つのV_H CDR3残基がヌクレオチドNNSを使用して一度にランダム化される(例えば、Schierら、(1996)、Gene、(169):147-155頁; Schier及びMarks、(1996)、Human Antibodies and Hybridomas.、7:97-105頁、1996年; 及びSchierら、(1996)、J. Mol. B

50

i o l .、263:551-567頁を参照のこと)。

【0069】

例えば、結合親和性をさらに増加させるために、いくつかの実施形態において、115 B-151-423 AM1及び/又は115 B-151-423 AM2のVH及びVL断片は、好ましくは自然免疫応答期間の抗体の親和性成熟に関与するインビボ体細胞突然変異工程に類似の工程で、VHのCDR2領域並びに/又はVLのCDR1領域及び/若しくはCDR2領域内でランダムに変異され得る。このインビボ親和性成熟は、標的にされるCDRの範囲内で各CDRの一部を、3アミノ酸をコードしている縮重一本鎖オリゴヌクレオチドと置き換えることによって達成され得る。各CDRの一部と新しいランダム化配列との置換は、酵母における相同組換えによって達成され得る。これらのランダムに変異されたVH及びVL断片は、scFvとの関連でp24及び/又はp26フラグメントに対する結合について分析され得る。好ましいscFvは、ハイブリドーマ細胞系PTA-2809(米国特許第7,531,640号に記載される)によって産生された115 B-151-423抗体と比較したとき、その平衡解離定数(K_D)において少なくとも約2倍の改善、少なくとも約3倍の改善、少なくとも約5倍の改善、少なくとも約10倍の改善、少なくとも約15倍の改善、少なくとも約20倍の改善、少なくとも約25倍の改善、少なくとも約30倍の改善、少なくとも約35倍の改善、少なくとも約40倍の改善、少なくとも約45倍の改善、少なくとも約50倍の改善、少なくとも約55倍の改善、少なくとも約60倍の改善、少なくとも約70倍の改善又は少なくとも約75倍の改善で対象とするエピトープに対する親和性を示す。

10

20

【0070】

C)他の抗体形状の作製

本明細書に提供されている抗体の公知の配列及び/又は同定された配列(例えばV_H及び/又はV_L配列)を使用することにより、他の抗体形状が容易に作製され得る。そのような形状には、多価抗体、完全抗体、scFv、(scFv')₂、Fab、(Fab')₂、キメラ抗体などが含まれるが、これに限定されるものではない。

【0071】

1)ホモ二量体の作製

例えば、(scFv')₂抗体を作製するには、2つのscFvが直接に又はリンカー(例えば炭素リンカー、ペプチドなど)を通して又は例えば2つのシステイン間のジスルフィド結合を通して接合される。したがって例えば、ジスルフィド結合したscFvを作製するには、システイン残基が部位特異的突然変異生成によって本明細書に記載の抗体のカルボキシ末端に導入され得る。

30

【0072】

scFvはこの構築物から発現され、IMACによって精製され、ゲル濾過によって分析され得る。(scFv')₂二量体を産生するには、システインが1mM 3-メルカプトエタノールとのインキュベーションによって還元され、scFvの半分がDTNBの付加によって遮断される。遮断されたscFvと遮断されていないscFvと一緒にインキュベートされて(scFv')₂が形成され、得られた物質はゲル濾過によって分析され得る。得られた二量体の親和性は、標準的な方法(例えばBIACoreによる)を使用して決定され得る。

40

【0073】

1つの例示の実施形態において、(scFv')₂二量体は、リンカー、例えばペプチドリンカーを通してscFv'フラグメントを接合することによって作製される。これは、当業者に周知の多種多様な手段によって達成され得る。例えば、1つの手法は、Holligerら、(1993)、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、90:6444-6448頁に記載されている(WO1994/013804も参照のこと)。

【0074】

本明細書に提供されたV_H及び/又はV_L配列を使用することにより、Fab及び(Fab')₂二量体もまた容易に調製され得ることに留意されたい。Fabはジスルフィド

50

結合によって $V_H - C_H 1$ に接合された軽鎖であり、当業者に公知の標準的な方法を使用して容易に作製され得る。 $F(ab)'$ ₂ は、例えば $(scFv)'$ ₂ 二量体について上述した通り、 Fab を二量体化することによって産生され得る。

【0075】

2) キメラ抗体

本発明の抗体は「キメラ」抗体も含む。このキメラ抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種から得られる抗体の対応する配列又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属している抗体の対応する配列と同一か又は相同性があり、一方で所望の生物活性を示す限り、この鎖の残部が、別の種から得られる抗体の対応する配列又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属している抗体の対応する配列及びそのような抗体のフラグメントの対応する配列と同一か又は相同性がある（例えば、米国特許第4,816,567号；Morrissonら、(1984)、Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855頁、などを参照のこと）。

10

【0076】

キメラ抗体は、異なる2種に由来する部分（例えばヒトの部分及びヒト以外の部分）を含む抗体である。通常、キメラ抗体の抗原結合領域（又は可変領域）は1種の供給源から得られ、キメラ抗体の定常領域（免疫グロブリンに生物学的エフェクター機能を与える）は別の供給源から得られる。キメラ抗体を生成する様々な方法は当業者に周知である（例えば、米国特許第5,502,167号、第5,500,362号、第5,491,088号、第5,482,856号、第5,472,693号、第5,354,847号、第5,292,867号、第5,231,026号、第5,204,244号、第5,202,238号、第5,169,939号、第5,081,235号、第5,075,431号及び第4,975,369号を参照のこと）。

20

【0077】

一般に、キメラ抗体を産生するのに使用される手順は、以下のステップからなる（いくつかのステップの順序は入れ替えられる可能性がある。）：（a）抗体分子の抗原結合部分をコードしている正しい遺伝子断片を同定し、クローニングする；この遺伝子断片（重鎖のVDJ、可変領域、多様性領域及び接合領域として又は軽鎖のVJ、可変領域、接合領域として、又は単にV若しくは可変領域又は V_H 及び V_L 領域として公知である）は、cDNA形状又はゲノム形状であってよい；（b）ヒト定常領域又はその所望の部品をコードしている遺伝子断片をクローニングする；（c）定常領域に可変領域をライゲーションする、その結果完全なキメラ抗体が転写可能であり翻訳可能な形状でコードされる；（d）選択可能なマーカー及び遺伝子制御領域（プロモータ、エンハンサ及びポリ(A)付加シグナルなど）を含有するベクターにこの構築物をライゲーションする；（e）宿主細胞（例えば、細菌）でこの構築物を増幅する；（f）このDNAを真核生物細胞に導入する（トランスフェクション）殆どの場合哺乳動物のリンパ球；そしてキメラ抗体の発現に適している条件下で宿主細胞を培養する。

30

【0078】

いくつかの特徴ある抗原結合特異性の抗体が、これらの手順で操作され、キメラタンパク質（例えば抗TNP：Boulianneら、(1984)、Nature、312:643頁；及び抗腫瘍抗原：Sahaganら、(1986)、J. Immunol., 137:1066頁）が産生された。同様に、いくつかの異なるエフェクター機能が、抗原結合領域をコードしているこれらのタンパク質に新しい配列を連結することによって、達成された。これらのいくつかは、酵素（Neubergerら、(1984)、Nature、312:604頁）、別の種に由来する免疫グロブリン定常領域及び別の免疫グロブリン鎖の定常領域（Sharonら、(1984)、Nature、309:364頁；Tanら、(1985)、J. Immunol., 135:3565-3567頁）を含む。

40

【0079】

3) 完全ヒト抗体

50

別の実施形態において、本発明はもとのままの、完全にヒト（又は完全にヒト以外の）抗体を提供する。そのような抗体は、キメラヒト抗体を作るのに類似した方式で容易に産生され得る。この事例において、例えばマウスから得られる認識機能を使用する代わりに、本明細書に記載の抗体の完全なヒト認識機能（例えば、 V_H 及び V_L ）が利用される。

【0080】

4) ダイアボディ

特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載のCDRの1つ又は複数を含む V_H 及び/又は V_L ドメインを含むダイアボディを意図している。特定の実施形態において、 V_H 及び/又は V_L ドメインは、115B-151-423AM1及び/又は115B-151-423AM2の V_H 及び/又は V_L 領域を含むCDRの全3つ（CDR1、CDR2、CDR3）を含む。用語「ダイアボディ」は通常、2つの抗原結合部位を有する抗体フラグメントを意味する。このフラグメントは通常、同じポリペプチド鎖（ V_H - V_L ）内に軽鎖可変ドメイン（ V_L ）に接続された重鎖可変ドメイン（ V_H ）を含む。同じ鎖上の2つのドメインが対合できないほど短いリンカーを使用することにより、これらのドメインは別の鎖の相補的なドメインと対合することを強いられ、2つの抗原結合部位が作製される。ダイアボディは、例えばEP404,097; WO93/11161、及びHolligerら、(1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444-6448頁に、全体的に記述される。

10

【0081】

5) ユニボディ

特定の実施形態において、抗HIV抗体はユニボディとして加工される。ユニボディは、特定の小さな抗体形式より長い持続治療域が予想される安定で小さな抗体形式を産生する抗体技術を提供する。特定の実施形態において、ユニボディは抗体のヒンジ領域を除去することによってIgG4抗体から産生される。全長IgG4抗体と異なり、半分の分子フラグメントは極めて安定であり、ユニボディと称される。IgG4分子を半分にすることで、ユニボディ上で標的に結合できる領域は1つしか残らない。ユニボディを産生する方法はPCT公開WO2007/059782に詳細に記述されており、その全体を参照により本明細書に組み込む（Kolfshotenら、(2007)、Science、317:1554-1557頁も参照のこと）。

20

【0082】

特定の実施形態において、ランダム化されたユニボディライブラリが生成され、115B-151-423AM1及び/又は115B-151-423AM2と同等若しくはそれより高いp24及び/又はp26に対する結合特異性及び親和性についてスクリーニングされる。特定の実施形態において、上で同定されたCDRは、ユニボディ骨格/構造に加工される。

30

【0083】

6) アフィボディ

特定の実施形態において、本明細書に記載の抗HIV抗体は、アフィボディとして加工される。アフィボディ分子は、58アミノ酸残基のタンパク質ドメインに基づく親和性タンパク質のクラスであり、スタフィロコッカス(staphylococcus)タンパク質AのIgG結合ドメインの1つから得られる。この三重らせんバンドドメイン(bundle domain)は、コンビナトリアルファージミドリライブラリ構築の骨格として使用されてきた。このライブラリから、所望の分子を標的にするアフィボディ変異体がファージディスプレイ技術を使用して選択され得る（例えばNordら、(1997)、Nat. Biotechnol.、15:772-777頁; Ronmarkら、(2002)、Eur. J. Biochem.、269:2647-2655頁を参照のこと）。アフィボディの詳細及び産生方法は、当業者に公知である（例えば米国特許第5,831,012号を参照のこと、その全体を参照により本明細書に組み込む。）。

40

【0084】

特定の実施形態において、ランダム化されたアフィボディライブラリが生成され、11

50

5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 1 及び / 又は 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2 と同等若しくはそれより高い p 2 4 及び / 又は p 2 6 に対する結合特異性及び親和性についてスクリーニングされる。特定の実施形態において、上で同定された C D R は、アフィボディ構造に加工される。

【 0 0 8 5 】

7) ナノボディ

特定の実施形態において、本明細書に記載の H I V 抗体は、ナノボディ (V_h H 抗体) として加工され得る。V_h H (ナノボディ) を作る方法も、当業者に周知である。ラクダ科重鎖抗体は単一の重鎖のホモ二量体として発見され、重鎖の定常領域を介して二量体化される。これらのラクダ科重鎖抗体の可変ドメインは、V_HH ドメイン又は V_HH と呼ばれ、それ自体がナノボディとして使用され得及び / 又はナノボディを得るための出発点として使用され得る。単離された V_HH は、高い特異性で抗原に結合する能力を保持している (例えば Hamers - Casterman ら、(1 9 9 3)、Nature、3 6 3 : 4 4 6 - 4 4 8 頁を参照のこと)。特定の実施形態において、そのような V_HH ドメイン又はこれらのドメインをコードしているヌクレオチド配列は、ラクダ科種 (例えばラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ及びグアナコ) で生じた抗体から得られる。ラクダ科に加えて他の種 (例えばサメ、フグ) が、機能的な抗原結合性重鎖抗体を産生でき、例えば米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 1 1 0 8 8 号に記述される方法を使用して、これらの種からそのような天然に存在する V_HH (をコードしているヌクレオチド配列) が得られる。

【 0 0 8 6 】

特定の実施形態において、ランダム化されたナノボディライブラリが生成され、1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 1 及び / 又は 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2 と同等若しくはより高い p 2 4 及び / 又は p 2 6 に対する結合特異性及び親和性についてスクリーニングされる。特定の実施形態において、上で同定された C D R はナノボディ構造に加工される。

【 0 0 8 7 】

要するに、日常の方法を使用することにより、C D R が表 1 - 2 に列挙され及び / 又は配列が図 1 - 4 に示される抗体を使用して、同じエピトープに結合する他の抗体 (完全長抗体、抗体フラグメント、一本鎖抗体など) を容易に生成し同定できる。同様に、これらを利用して同じ又は類似の相補性決定領域 (C D R) を有する他の抗体を容易に生成できるが、p 2 4 及び / 又は p 2 6 エピトープに対してより高い特異性及び / 又は親和性を得ることができる。

【 0 0 8 8 】

I I . 抗 H I V 抗体をコードしている核酸

一態様において、上に記載の抗体のいずれかをコードする単離された核酸分子が提供される。したがって例えば本発明は、米国特許第 7, 5 3 1, 6 4 0 号 (例えば、col. 8 を参照のこと) に記載され、ブダペスト条約の条件に基づいて 2 0 0 1 年 1 2 月 4 日にアメリカンタイプカルチャーコレクション (1 0 8 0 1 University Boulevard Manassas, VA 2 0 1 1 0) に預託されている、H I V 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 m A b (P T A - 2 8 0 9 細胞系) と比較したとき、その平衡解離定数 (K_D) において少なくとも約 2 倍の改善、少なくとも約 3 倍の改善、少なくとも約 4 倍の改善、少なくとも約 5 倍の改善、少なくとも約 6 倍の改善、少なくとも約 7 倍の改善、少なくとも約 8 倍の改善、少なくとも約 9 倍の改善、少なくとも約 1 0 倍の改善、少なくとも約 1 1 倍の改善、少なくとも約 1 2 倍の改善、少なくとも約 1 3 倍の改善、少なくとも約 1 4 倍の改善、少なくとも約 1 5 倍の改善又は少なくとも約 2 0 倍の改善で p 2 6 及び / 又は p 2 4 エピトープに結合する抗体をコードしている単離された核酸分子を提供する。

【 0 0 8 9 】

上に記載の H I V 1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 m A b と比較したとき、その平衡解離定数 (K_D) において少なくとも約 2 倍の改善、少なくとも約 3 倍の改善、少なくとも約 4

10

20

30

40

50

倍の改善、少なくとも約5倍の改善、少なくとも約6倍の改善、少なくとも約7倍の改善、少なくとも約8倍の改善、少なくとも約9倍の改善、少なくとも約10倍の改善、少なくとも約11倍の改善、少なくとも約12倍の改善、少なくとも約13倍の改善、少なくとも約14倍の改善、少なくとも約15倍の改善又は少なくとも約20倍の改善でp26及び/又はp24エピトープに結合する抗体をコードする本明細書に記載の核酸分子に厳しい条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子も提供される。

【0090】

特定の実施形態において、核酸は、約10 pM未満の平衡解離定数(KD)、より好ましくは約9 pM未満のKD、さらにより好ましくは約8 pM未満のKD、及び特定の実施形態において、約7 pMから約100 fMのKDでp24及び/又はp26に免疫特異的に結合する抗体をコードする。

10

【0091】

したがって、特定の実施形態において、相補性決定領域L1、L2及びL3を含む軽鎖可変ドメイン並びに相補性決定領域H1、H2及びH3を含む重鎖可変ドメインを含み、軽鎖可変ドメインのL1、L2若しくはL3 CDRの1つ若しくは複数のアミノ酸配列が、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のL1、L2及び/若しくはL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、並びに/又は重鎖可変ドメインのH1、H2又はH3 CDRの1つ若しくは複数のアミノ酸配列が、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のH1、H2及び/若しくはH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む抗体をコードする単離された核酸が意図されている。特定の実施形態において、抗体のL3 CDRは、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のL3 CDRのアミノ酸配列を含み、並びに/又はこの抗体のH2及び/又はH3 CDRは、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のH2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

20

【0092】

特定の実施形態において、核酸は抗体をコードしており、この抗体のH2及びH3 CDRは、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のH2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。特定の実施形態において、この抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、並びに/又はこの抗体のL1、L2及びL3 CDRは、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のL1、L2及びL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

30

【0093】

特定の実施形態において、核酸は抗体をコードしており、この抗体のH1、H2及びH3 CDRは115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のH1、H2及びH3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

40

【0094】

特定の実施形態において、核酸は抗体をコードしており、この抗体のL1、L2及びL3 CDRは、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2からなる群から選択される抗体のL1、L2及びL3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

【0095】

特定の実施形態において、核酸は抗体をコードしており、この抗体のH1、H2及びH3 CDRは、115B-151-423AM1のH1、H2及びH3 CDRのアミノ

50

酸配列をそれぞれ含み、この抗体のL 1、L 2及びL 3 CDRは、1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 1のL 1、L 2及びL 3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

【0096】

特定の実施形態において、核酸は抗体をコードしており、この抗体のH 1、H 2及びH 3 CDRは、1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2のH 1、H 2及びH 3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含み、この抗体のL 1、L 2及びL 3 CDRは、1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2のL 1、L 2及びL 3 CDRのアミノ酸配列をそれぞれ含む。

【0097】

特定の実施形態において、核酸は、図1 - 4に示される抗体をコードする。

【0098】

特定の実施形態において、核酸は抗体をコードする。本発明の誘導された抗体又は変異体抗体は、上に記載の通り少なくとも1つの重鎖相補性決定領域(「CDR」)(例えば重鎖CDR 1、重鎖CDR 2又は重鎖CDR 3)の中に少なくとも1つの変異(欠失、付加及び/又は置換など)を含み、軽鎖CDR領域(例えば軽鎖CDR 1、軽鎖CDR 2又は軽鎖CDR 3)の中に少なくとも1つの変異(欠失、付加及び/又は置換など)を含む。

【0099】

III. 抗体分子の調製

本明細書に記載されている、本明細書に記載の抗体(例えば全長抗体、二重特異性抗体、多特異性抗体、一本鎖抗体、ユニボディ、ナノボディ、アフイボディ、一本鎖抗体、キメラ抗体及びそれらの免疫特異性結合フラグメント)は、当業者に周知である方法によって作られ得る。

【0100】

A) 化学的合成

本明細書に提供された配列情報を使用して、例えば本発明の抗体(例えば1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 1及び/又は1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2など)又はその変異体は、ペプチド合成の既知の方法を使用して化学的に合成され得る。配列のC末端アミノ酸が不溶性支持体に付着され、それに続いて配列の残りのアミノ酸を順次付加する固相合成は、好ましい一本鎖抗体化学合成法の1つである。固相合成に関する技術は、Barany及びMerrifield、「Solid Phase Peptide Synthesis」、The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology.; 3 - 284頁、第2巻、; Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.; Merrifieldら、(1963)、J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 - 2156頁; 及びStewartら、(1984)、Solid Phase Peptide Synthesis、第2編、Pierce Chem. Co., Rockford, Illに記載されている。

【0101】

B) 抗体の組換え発現

特定の好ましい実施形態において、本発明の抗体(例えば1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 1及び/又は1 1 5 B - 1 5 1 - 4 2 3 A M 2など)又はその変異体は、当業者に周知である標準的な技術を使用して調製される。本明細書に提供した配列情報を使用して、所望の抗体をコードしている核酸が当業者に公知のいくつかの標準的な方法にしたがって化学的に合成され得る。オリゴヌクレオチド合成は、好ましくは市販の固相オリゴヌクレオチド合成機械で実施され(Needham - VanDevanterら、(1984)、Nucleic Acids Res. 12: 6159 - 6168頁)、又はBeaucageらによって記載されている固相ホスホラミダイトリエステル法を使用して手作業で合成される(Beaucageら、(1981)、Tetrahedron Lett. 22(20): 1859 - 1862頁)。

【0102】

別法として、抗体をコードしている核酸は、標準的な方法にしたがって増幅及び/又は

10

20

30

40

50

クローニングされ得る。したがって、本明細書に記載の抗体は、例えば、軽鎖及び重鎖をコードしている核酸を宿主細胞中で組換え発現させることによって調製され得る。抗体を組換えで発現させるには、発現される抗体タンパク質が宿主細胞中で発現され、好ましくは宿主細胞が培養されている培地に分泌され、この培地から抗体が回収され得るように、宿主細胞は抗体をコードしている核酸分子を保有する1つ又は複数の組換え発現ベクターでトランスフェクトされる。これらの目的を達成するための分子クローニング技術は、当技術分野において公知である。様々なクローニング法及びインビトロ増幅法が組換え核酸の構築に適している。多くのクローニング訓練を通して熟練者を指導するのに十分なこれらの技術及び説明の例は、Berger及びKimmel、Guide to Molecular Cloning Techniques、Methods in Enzymology、152巻、Academic Press, Inc.、San Diego、CA (Berger); Sambrookら、(1989)、Molecular Cloning - A Laboratory Manual (第2版)第1巻 - 第3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor Press、NY (Sambrook); 及びCurrent Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubelら編、Current Protocols; Greene Publishing Associates, Inc.とJohn Wiley & Sons, Inc.との合併事業(補足1994)(Ausubel)に見られる。組換え免疫グロブリンを産生する方法も、当技術分野において公知である。Cabilly、米国特許第4,816,567号; 及びQueenら、(1989)、Proc. Natl Acad. Sci. USA、86:10029-10033頁を参照のこと。加えて、抗体の発現の詳細な手順も、Liuら、(2004)、Cancer Res.、64:704-710頁、Poulら、(2000)、J. Mol. Biol.、301:1149-1161頁、などに提供されている。

【0103】

本発明の抗体を発現させるには、抗体ドメイン(例えば軽鎖領域及び重鎖領域)をコードしている核酸分子が最初に入手される。これらの核酸分子は、モノクローナル抗体115B-151-423(米国特許第7,531,640号に記載される)を発現しているハイブリドーマ細胞系から入手でき、当技術分野において周知である手段(部位特異的突然変異など)によって変更されて本発明の抗体を生成できる。

【0104】

様々な実施形態において、抗体をコードしている核酸配列は、当業者に周知である標準的な方法にしたがって、化学的に合成され得る又はPCR増幅及び/若しくは組換え発現によって入手され得る。

【0105】

一旦、抗体をコードしている核酸が入手されたら、これらの核酸フラグメントが標準的な組換えDNA技術によってさらに操作されて、例えば可変領域遺伝子を抗体(それだけには限らないが、全長抗体鎖遺伝子、Fabフラグメント遺伝子又はscFv遺伝子など)に転換することができる。これらの操作において、VL又はVHをコードしている核酸フラグメントは、抗体定常領域又は可撓性リンカーなど別のタンパク質をコードしている別の核酸フラグメントに作動的に連結される。用語「作動的に連結される」は、この文脈で使用される場合、2つの核酸フラグメントによってコードされるアミノ酸配列が同じフレームを維持するように、これらの2つの核酸フラグメントが接合されることを意味するものとする。

【0106】

別法において、scFv遺伝子は、野生型CDR領域(モノクローナル抗体115B-151-423のその領域など)を用いて構築され、次いで当技術分野において公知の技術を使用して変異させられてもよい。

【0107】

VH領域をコードしている単離された核酸分子は、VHをコードしている核酸分子を重鎖定常領域(CH1、CH2及びCH3)をコードしている別の核酸分子に作動的に連結することによって全長重鎖遺伝子に転換され得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において公知である(例えばKabataら、(1991)、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米保健社会福祉省、NIH公開番号91-3242を参照のこと)。別の態様において、本明細書に記載の抗体は、それだけには限らないが、ヒト重鎖定常領域の全ての公知のアロタイプを含む全ての公知のヒト重鎖定常領域を含む。これらの領域を包含する核酸フラグメントは、標準的なPCR増幅によって入手され得る。重鎖定常領域は、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM又はIgD定常領域

10

【0108】

VL領域をコードしている単離された核酸分子は、VLをコードしている核酸分子を軽鎖定常領域CLをコードしている別の核酸分子に作動的に連結することによって、全長軽鎖遺伝子(及びFab軽鎖遺伝子)に転換され得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において公知である(例えば上記Kabataらを参照のこと)。様々な実施形態において、本明細書に記載の抗体は、それだけには限らないが、ヒト軽鎖定常領域の全ての公知のアロタイプを含む全ての公知のヒト軽鎖定常領域を含む。これらの領域を包含する核酸フラグメントは、標準的なPCR増幅によって入手され得る。軽鎖定常領域は、又は定常領域であり得るが、最も好ましくは定常領域である。

20

【0109】

特定の重鎖領域又は軽鎖領域内の骨格(FR)及びCDR領域に特有の呼称は、慣例又はそのような領域を同定するために使用された付番方式に応じて変化する可能性があることは理解されよう(例えばChothia、Kabata、Oxford Molecular's AbM modeling softwareなど、これらの全ては当業者に公知である)。本説明の目的には、Kabata付番方式が使用される。

【0110】

scFv遺伝子を作製するために、VH及びVLをコードしている核酸フラグメントが、互いに直接作動的に連結される又は可撓性リンカーをコードしている核酸を介して互いに作動的に連結される。例示的なリンカーは、上の表3に示されており、例えば(Gly4Ser)(配列番号24)リンカー、GPAKELTPLKEAKVS(配列番号26)リンカー(米国特許出願公開2004-0175379A1を参照のこと)などを含むが、これに限定されるものではない。使用され得る他のリンカー配列の例は、当業者に周知である(例えばBirdら、(1988)、Science、242:423-426頁;Hustonら、(1988)、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A、85:5879-5883頁;McCaffertyら、(1990)、Nature、348:552-554頁;Hustonら、(1991)、Meth.Enzymol.、203:46-88頁;Johnson及びBird、(1991)、Meth.Enzymol.、(203):88-89頁;などを参照のこと)。

30

【0111】

抗体又は抗体部分を発現させるために、遺伝子が転写及び翻訳制御配列に作動的に連結されるように、上述の通り入手した部分又は全長抗体領域をコードしている核酸分子が発現ベクターに挿入される。この文脈において、用語「作動的に連結される」は、ベクター内の転写及び翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写及び翻訳を調節するという目的の機能を果たすように、抗体遺伝子がベクターにライゲーションされることを意味するものとする。発現ベクター及び発現制御配列は、使用される発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子は別々のベクターに挿入され得、又はより一般的には、両方の遺伝子が同じ発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法(例えば抗体遺伝子フラグメント及びベクター上の相補的な制限部位のライゲーション又は制限部位が存在しない場合には、平滑末端ライゲーション)で発現ベクターに挿入される。軽

40

50

鎖配列又は重鎖配列を挿入する前に、発現ベクターはすでに抗体定常領域配列を保有している。例えば、VH及びVL配列を全長抗体遺伝子に転換するための1つの方法は、VH断片がベクター内のCH「断片」に作動的に連結されVL断片がベクター内のCL断片に作動的に連結されるように、すでに重鎖定常領域及び軽鎖定常領域をコードしている発現ベクターにVH及びVL配列をそれぞれ挿入することである。加えて又は別法として、組換え発現ベクターは宿主細胞からの抗体鎖の分泌を助けるシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端に同じフレームで連結されるように、抗体鎖遺伝子はベクターにクローニングされ得る。特定の実施形態において、単一のペプチドは、イムノグロビンシグナルペプチド又は異種シグナルペプチド（例えば、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であり得る。

10

【0112】

抗体鎖遺伝子に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞中で抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を保有することができる。用語「調節配列」は、抗体鎖遺伝子の転写又は翻訳を制御するプロモータ、エンハンサ及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリ阿德ニル化シグナル）を含むものとする。そのような調節配列は、例えばGoeddel、(1990)、Gene Expression Technology. Methods in Enzymology, 185, Academic Press, San Diego, Califに記載されている。調節配列の選択を含めた発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子によって決めてよいことは当業者に理解されよう。哺乳動物宿主細胞での発現用として特定の好ましい調節配列には、サイトメガロウイルス（「CMV」）から得られるプロモータ及び/又はエンハンサ（CMVプロモータ/エンハンサなど）、シミアンウイルス40（「SV40」）（SV40プロモータ/エンハンサなど）、アデノウイルス（アデノウイルス主要後期プロモータ（「AdMLP」）など）及びポリオーマなど、哺乳動物細胞において高レベルのタンパク質発現を指令するウイルスエレメントが含まれ得る。ウイルス調節エレメント及びその配列の更なる説明については、例えば米国特許第5,168,062号、第4,510,245号及び第4,968,615号を参照のこと。

20

【0113】

抗体鎖遺伝子及び調節配列に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞中でのベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）及び選択可能なマーカー遺伝子など追加的な配列を保有してもよい。選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を助ける（例えば、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号及び第5,179,017号を参照のこと）。例えば通常は、選択可能なマーカー遺伝子はベクターが導入された宿主細胞に、G418、ハイグロマイシン又はメトトレキセートなどの薬物抵抗性を付与する。例示的な選択可能なマーカー遺伝子には、dhfr-宿主細胞において、メトトレキセート選択/増幅と一緒に使用するジヒドロ葉酸還元酵素（「DHFR」）遺伝子、及びG418選択用としてネオマイシン（「neo」）遺伝子が含まれるが、これに限定されるものではない。

30

【0114】

軽鎖及び重鎖の発現用として、重鎖及び軽鎖をコードしている発現ベクターが、標準的な技術によって宿主細胞にトランスフェクトされる。用語「トランスフェクション」の様々な形状とは、原核生物又は真核生物の宿主細胞に外来性DNAを導入するために一般に使用される様々な技術、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含するものとする。理論的には原核生物又は真核生物宿主細胞のいずれにおいても本発明の抗体を発現させることが可能だが、真核生物細胞、特に哺乳動物細胞は原核生物細胞よりも、適切に折りたたまれて免疫学的に活性がある完全な抗体を組み立てて分泌する可能性が高いので、真核生物細胞、最も好ましくは哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が最も好ましい。抗体遺伝子の原核生物発現は、活性がある抗体を高収量で産生させるには効果がないと報告されている（Boss, M. A. 及びWood, C. R., Immunology Today, 6:12-13

40

50

頁(1985)を参照のこと)。

【0115】

本発明の組換え抗体を発現させるのに適切な哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(「CHO」)細胞(例えば、Kaufman及びSharp、(1982)、Mol. Biol.、159:601-621頁に記載されているDHFR選択可能なマーカーと一緒に使用される、Urlaub及びChasin、(1980)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、(77):4216-4220頁に記載されているdhfr-CHO細胞を含める)、NSO骨髓腫細胞、COS細胞、及びSP2/0骨髓腫細胞が含まれるが、これに限定されるものではない。抗体遺伝子をコードしている組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入される場合、この抗体は、宿主細胞中で抗体を発現させる又はより好ましくは宿主細胞が培養されている培地中に抗体を分泌させるのに十分な時間、宿主細胞を培養することによって産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を使用して培地から回収され得る。

10

【0116】

宿主細胞を使用して、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント又はscFv分子などの完全な抗体の部分を生産することもできる。上記手順の変形が本発明の範囲内であることは理解されよう。例えば、本発明の抗体の軽鎖又は重鎖(しかし両方ではない)をコードしている核酸分子で宿主細胞をトランスフェクトすることが望ましい場合がある。組換えDNA技術を使用して、HIVタンパク質(例えば、p24及び/又はp26)に結合するのに必要ではない軽鎖及び重鎖のいずれか又は両方をコードしている核酸分子の一部又は全部を取り除ける場合もある。そのような短縮した核酸分子から発現される分子も、本発明の抗体に包含される。

20

【0117】

抗体又はその抗原結合部分を組換え発現させるための1つの例示的な系において、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードしている組換え発現ベクターが、dhfr-CHO細胞に(例えば、リン酸カルシウム介在トランスフェクションによって)導入される。組換え発現ベクター内において、抗体重鎖及び抗体軽鎖の遺伝子は各々、CMVエンハンサ/AdMLPプロモータ調節エレメントに作動的に連結され、高レベルの遺伝子の転写が駆動される。組換え発現ベクターは、DHFR遺伝子を保有することもでき、DHFR遺伝子はベクターでトランスフェクトされたCHO細胞の選択を可能にする。細胞がヒポキサンチン及びチミジン無しの培地で培養されて、トランスフェクト用ベクターからDHFR遺伝子を獲得したCHO細胞を得ることができる。

30

【0118】

抗原特異的スクリーニング法を使用して、最高量の抗体を発現するクローンを同定することができる。これらの個々のクローンは展開され、再スクリーニングされて好ましい細胞系が選択され得る。選択された形質転換体宿主細胞が培養されて抗体重鎖及び軽鎖を発現させ、完全な抗体が培地から回収される。標準的な分子生物学技術を使用して、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培地から抗体を回収する。

【0119】

特定の実施形態において、ファージ及び酵母発現系を使用して抗体、特に一本鎖抗体を発現させ、回収することも認識されよう。

40

【0120】

上述の方法は、例示的なものであり限定されることを意図するものではない。本明細書に提供された教示を使用して、本明細書に記載の抗体又は抗体フラグメントを発現させる他の方法が、当業者に利用可能になる。

【0121】

IV. イムノアッセイ

様々な実施形態において、本明細書に記載の抗体又はその抗体フラグメントは、サンプル中のHIV-1コアタンパク質若しくはタンパク質フラグメント(グループM及びO)

50

、H I V - 2、又は同時にH I V - 1及びH I V - 2を検出するイムノアッセイに使用されてよい。抗体「フラグメント」は、結合特性に関して完全抗体と機能的に同じ方式（例えば実質的に同じ特異性及び/又は親和性を有する）で反応する抗体のサブユニットである。イムノアッセイは、それだけには限らないが、サンドイッチ形式、競合阻害形式（順向き又は逆向きの両方の競合阻害アッセイを含める）、蛍光偏光形式など当技術分野において公知の任意の形式を使用して実行され得る。

【 0 1 2 2 】

イムノアッセイにおいて、本明細書に記載の抗体が組み合わせて使用される、例えばサンドイッチアッセイの場合、患者サンプル中のH I V - 1グループM及びOのサブタイプA、B、C、D、E、F、G及びO由来のコア抗原（p 2 4）並びにH I V - 2コア抗原（p 2 6）を最小限検出できると考えられる。25ピコグラム（すなわち、ピコグラムコア抗原/血清又は血漿1ml）未満の量のH I V - 1 p 2 4抗原及びH I V - 2 p 2 6抗原が、上に記載の抗体の組合せを使用して検出され得るとも考えられる。

10

【 0 1 2 3 】

試験サンプル中のH I V - 1コアタンパク質（p 2 4）及び/又はH I V - 2コアタンパク質（p 2 6）又はそのフラグメントを質的に検出するための特定のイムノアッセイにおいて、本明細書に記載の少なくとも1つの抗H I V抗体が、H I Vコアタンパク質若しくはタンパク質フラグメントを含有している疑いがある又は含有していることが分かっている少なくとも1つの試験サンプルと接触して、抗体-H I Vコアタンパク質免疫複合体が形成される。本明細書の第I節に記載の抗体をそのようなイムノアッセイに使用して、少なくとも1つの試験サンプル中にそのような抗体-H I Vコアタンパク質免疫複合体を形成することができる。次いでこれらの免疫複合体は、当業者に公知の日常の技術を使用して検出され得る。例えば抗H I V抗体が検出可能な標識で標識されて、抗体-H I Vコアタンパク質複合体の存在を検出することができる。別法として、試験サンプル中のH I V - 1及び/又はH I V - 2コアタンパク質又はそのフラグメントが、検出可能な標識を用いて標識され、得られた抗体-H I Vタンパク質免疫複合体が当業者に公知の日常の技術を使用して検出され得る。検出可能な標識及び抗体へのそれらの付着は、以下に詳細に述べる。

20

【 0 1 2 4 】

別法として、p 2 4及び/又はp 2 6及び/又はそのフラグメントに結合し検出可能な標識を含有している二次抗体が試験サンプルに添加され、この二次抗体を使用して抗体-H I Vタンパク質複合体の存在を検出できる。当技術分野において公知のどんな検出可能な標識も使用され得る。検出可能な標識及び抗体へのそれらの付着は、以下に詳細に述べる。

30

【 0 1 2 5 】

一般に、H I V - 1及び/又はH I V - 2コアタンパク質（p 2 4及び/又はp 2 6）又はそのフラグメントの質的又は量的検出用としてのサンドイッチアッセイは、一次抗体を利用してH I V - 1及び/又はH I V - 2タンパク質又はタンパク質フラグメントを捕捉して抗体/H I Vタンパク質免疫複合体を形成し、次いでこの複合体は検出可能な標識（例えば、検出可能なシグナルを発生できるシグナル発生化合物）又は検出可能な標識を捕捉するタグを含む二次抗体によって結合される。一次（捕捉）抗体又は二次抗体は、1つ又は複数の本明細書に記載の抗H I V抗体を含むことができる。したがって、シグナルの検出は複合体の存在を示し、すなわちサンプル中に抗原が存在することを示している。発生したシグナルがサンプル中の抗原の量に比例するとき、試験サンプル中の抗原の量が算出され得る（例えば、米国特許第6,015,662号を参照のこと）。様々な実施形態において、一次（捕捉）抗体は、固相又は半固相（例えばゲル）（例えば、微粒子、マイクロタイターウェル、ビーズなど）の上に吸着される、又は例えば分配分取を介して分離され得る液体と混合される。イムノアッセイに使用される固相の例には、多孔質物質及び無孔質物質、ラテックス粒子、磁性粒子、微粒子、ビーズ、膜、マイクロタイターウェル、試験片及びプラスチック製チューブが含まれるが、これに限定されるものではない

40

50

【 0 1 2 6 】

1つの例示的实施形態において、115B-151-423AM1及び115B-151-423AM2又はそのフラグメントは、固相又はゲル相に吸着されて提供される。次いで、p24抗原及び/又はp26抗原が患者サンプル中に存在する場合に、抗体/抗原複合体が第1混合物として形成されるように、試験サンプルは抗体又はそのフラグメントと接触させられる。例えば、対象/サンプルがHIV-1及びHIV-2の両方を有する場合、抗体/p24抗原複合体と抗体/p26抗原複合体の両方が形成される可能性がある。次いでプローブ抗体を含むコンジュゲートを添加し、このコンジュゲートは115B-151-423AM1又は115B-151-423AM2に結合されたエピトープとは異なるが適合性があるエピトープ及びシグナル発生化合物に結合する。次いで抗体/抗原/抗体プローブ複合体が第2混合物として形成される。次いでHIV-1及び/又はHIV-2抗原が発生したシグナルの存在、すなわち抗体/抗原/抗体プローブ複合体を検出することによってサンプル中に検出される。

10

【 0 1 2 7 】

形成された複合体を検出する別の方式は、シグナル発生化合物に付着した三次抗体を含むコンジュゲートを利用することになる。具体的には、上に記載した抗体/抗原/抗体複合体を一旦形成したら(すなわち、後者の抗体は未標識の二次抗体である。)、次いで未標識の二次抗体に結合するコンジュゲートを溶液に添加してもよい。コンジュゲートは、例えば抗原、又は結合された二次抗体に結合できる抗抗体を含むことができ、コンジュゲートは検出可能なシグナルを発生できるシグナル発生化合物に付着している。したがってシグナルの検出は、複合体の存在すなわちサンプル中の抗原の存在を示している。

20

【 0 1 2 8 】

アッセイの設計は、使用する抗体の親和性及び特異性、得られる結果の精度、簡便性、固相の性質などによって決まる。(異なる抗原アッセイ形式の考察に関しては米国特許第5,104,790号を参照のこと。)加えて、免疫アッセイに使用される最初の捕捉抗体は、共有結合的に又は非共有結合的に(例えばイオン性で、疎水性でなど)固相若しくはゲル相に付着されてもよいことにも留意されたい。抗体(単数)(又は抗体(複数))は、吸着によって、化学カップリング剤を使用する共有結合によって又は当技術分野において公知の他の手段によって固体支持体又はゲル支持体に結合され得る、ただしそのような結合は抗体が標的分析物(例えば、HIVコアタンパク質)に結合する能力を妨害しない。さらに必要に応じて、固体支持体は誘導体化されて、抗体上の様々な官能基との反応を可能にすることができる。そのような誘導体化は、それだけには限らないが、無水マレイン酸、N-ヒドロキシスクシンイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなど特定のカップリング剤の使用を含み得る。

30

【 0 1 2 9 】

上記のように、特定の実施形態において、コンジュゲート(又は指示薬)は、シグナル発生化合物又は標識に付着した抗体(又はおそらくアッセイによって決まる抗抗体)を含む。このシグナル発生化合物又は「標識」は、それ自体が検出可能である又は1つ又は複数の追加的な化合物と反応させられて検出可能な産物を生成することができる。シグナル発生化合物の例には、色素体、放射性同位元素(例えば ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 及び ^{14}C)、化学発光化合物(例えばアクリジニウム)、粒子(可視又は蛍光性)、量子ドット、ナノ粒子、核酸、錯化剤又は酵素(例えばアルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ及びリボヌクレアーゼ)などの触媒が含まれる。酵素(例えば、アルカリホスファターゼ又はホースラディッシュペルオキシダーゼ)を使用する場合、色素-、フルロ-又はルモ-生成基質の付加により、検出可能なシグナルの発生が得られる。時間分解蛍光、内部反射蛍光、増幅(例えばポリメラーゼ連鎖反応)及びラマン分光など他の検出系も有用である。

40

【 0 1 3 0 】

50

本明細書に記載の抗体が利用され得る別の例示的なアッセイは、1) 1つの抗体(固体支持体に結合されている)、2) 試験サンプル及び3) シグナル発生化合物が付着している抗体又はそのフラグメント(例えば、115B-151-423AM1又は115B-151-423AM2)を含む指示薬を同時に接触させて混合物を形成することを含む。次いでこの混合物は、抗体/抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間及び条件下でインキュベートされる。シグナル発生化合物によって生成される測定可能なシグナルを検出することによって、もし存在すれば、試験サンプル中に存在しており固相上に捕捉されたHIV-1及び/又はHIV-2抗原の存在が決定される。試験サンプル中に存在する抗原の量は発生したシグナルに比例する。このアッセイ又は上に記載したアッセイにおいて、本明細書に記載の抗体は、溶液(すなわち、抗体及びシグナル発生化合物を含む試薬)中で、捕捉相として又は指示薬の一部として使用され得る。

10

【0131】

順向きの競合形式において、既知の濃度の標識されたHIV-1及び/若しくはHIV-2コアタンパク質又はそのフラグメントの一定分量を使用して、HIV-1抗体(本発明の抗体など)に対する結合を試験サンプル中のp24及び/若しくはp26又はそのフラグメントと競合させる。HIV-1及び/若しくはHIV-2コアタンパク質又はそのフラグメントのペプチド及びそのようなペプチドを作る方法は、当技術分野において公知である。

【0132】

順向きの競合アッセイにおいて、固定化された抗体(本発明の抗HIV抗体など)は、試験サンプル並びに標識されたHIV-1及び/若しくはHIV-2コアタンパク質又はそのフラグメントと順次に又は同時に接触させてよい。HIV-1及び/若しくはHIV-2コアタンパク質又はそのフラグメントは、サンドイッチアッセイ形式に関連して上述されている検出可能な標識を含む当業者に公知の任意の検出可能な標識を用いて標識され得る。このアッセイにおいて、本発明の抗体は、本明細書において以前に記載した技術を使用して固体支持体の上に固定化され得る。別法として、本発明の抗体は、微粒子などの固体支持体に固定化された異種抗体などの抗体とカップリングされ得る。

20

【0133】

標識されたHIV-1及び/若しくはHIV-2コアタンパク質又はそのフラグメント、試験サンプル並びに抗体は、サンドイッチアッセイ形式に関連して上に記載の条件と類似の条件下でインキュベートされる。次いで、異なる2つの種の抗体-HIVタンパク質複合体が生成される。具体的には、生成した抗体-HIVタンパク質複合体の一方は検出可能な標識を含有するが、他方の抗体-HIVタンパク質複合体は検出可能な標識を含有しない。抗体-HIVタンパク質複合体は、検出可能な標識を定量する前に、試験サンプルの残りから分離され得るが、必ずしも分離する必要はない。次いで、抗体-HIVタンパク質複合体が試験サンプルの残りから分離されるかどうかにかかわらず、抗体-HIVタンパク質複合体の検出可能な標識の量が定量化される。次いで、試験サンプル中のHIV-1及び/若しくはHIV-2コアタンパク質又はそのフラグメントの濃度が、抗体-HIVタンパク質複合体中の検出可能な標識の量を標準曲線と比較することによって決定され得る。標準曲線は、質量分析によって重量測定的に及び当技術分野において公知の他の技術によって、HIV-1及び/若しくはHIV-2コアタンパク質又はそのフラグメントの連続希釈物を使用して生成され得る。

30

40

【0134】

抗体-HIVタンパク質複合体は、サンドイッチアッセイ形式に関連して上述の固体支持体などの固体支持体に抗体を結合させ、次いで試験サンプルの残りを固体支持体との接触から取り除くことによって試験サンプルから分離され得る。

【0135】

特定の実施形態において、本明細書に記載の抗HIV抗体を使用して、逆向きの競合アッセイも利用され得る。

【0136】

50

特定の実施形態において、蛍光偏光アッセイが提供される。一実施形態において、抗HIV抗体（例えば本明細書に記載されるものなど）又は機能的に活性があるそのフラグメントは、HIV-1及び/若しくはHIV-2タンパク質又はそのフラグメントを含有している疑いがある未標識の試験サンプルと最初に接触して、未標識のHIVタンパク質-抗体複合体が形成される。未標識のHIVタンパク質-抗体複合体は、次いで蛍光標識されたHIVタンパク質、HIVタンパク質フラグメント又はそのHIVタンパク質の類似体と接触させられる。標識されたHIVタンパク質、HIVタンパク質フラグメント又はHIVタンパク質の類似体は、抗体又は機能的に活性があるそのフラグメントに対する結合を、試験サンプル中のいずれかの未標識のHIVタンパク質又はHIVタンパク質フラグメントと競合する。形成された標識されたHIVタンパク質-抗体複合体の量が決定され、試験サンプル中のHIV-1及び/又はHIV-2タンパク質の量が、例えば標準曲線を使用して決定される。

10

【0137】

本明細書に記載の様々なアッセイにおいて、検出可能な標識の検出は当業者に周知である手段による。例えば酵素標識が使用される場合、標識された複合体は、発色など定量化可能な反応を起こす標識用基質と反応させられる。標識が放射性標識である場合、標識はシンチレーションカウンタを使用して定量化される。標識が蛍光標識である場合、標識は、1色の光（「励起波長」として公知である）で標識を刺激し、刺激に応じて標識によって放射される別の色（「発光波長」として公知である）を検出することによって定量化される。標識が化学発光標識である場合、標識は、放射された光を視覚的に又は照度計、X線フィルム、高速度写真フィルム、CCDカメラなどを使用することによって検出し、定量化される。複合体中の標識の量が定量化されたら、試験サンプル中の標的分析物の濃度は、例えば既知の濃度のHIV-1及び/若しくはHIV-2コアタンパク質又はそのフラグメントの連続希釈物を使用して生成された標準曲線を使用することによって決定され得る。標的分析物の連続希釈物を使用する以外に、標準曲線は、質量分析によって及び当技術分野において公知の他の技術によって重量測定的に生成され得る。

20

【0138】

本明細書に記載のイムノアッセイは、例示的なものであり限定されることを意図するものではない。本明細書に提供されている教示を使用して、他の数多くのイムノアッセイが当業者に利用可能になる。そのようなアッセイ手順は、上述及び後述の手順を含めて、当技術分野において周知である（*Immunological Methods*、第I巻及び第II巻、1979年及び1981年、Lefkovits及びPernis編、Academic Press、New York；*Antibodies*、1982年、Kennettら編、Plenum Press、New York；及び*Handbook of Experimental Immunology*、1978年、Weir編、Blackwell Scientific Publications、St. Louis、Moを参照のこと）。

30

【0139】

本発明の抗体は、好ましくは単一の捕捉抗体として単独で、又は単一のプローブ及び/若しくは結合抗体として単独で使用されてよいことに留意されたい。しかしそれらの抗体が、本明細書に記載のアッセイにおいて二つ一組で又は三つ一組で使用されてもよい。さらに、本発明の抗体（及びそのフラグメント）の組合せは、本発明の抗体のエピトープ特異性とは違うHIV-1及び/又はHIV-2のエピトープに対して特異性を有する他の抗体と共に使用されてよい。したがって、本発明の抗体は、混合物の成分として又はHIV-1及び/又はHIV-2抗体の「カクテル」として作用する場合がある。したがって例えば、このカクテルは、HIV-1のp24及びHIV-2のp26を検出する本発明の抗体並びに膜貫通タンパク質又は細胞外糖タンパク質中のHIVエンベロープ抗原決定基を検出する抗体を含むことができる。この方式において、1つ又は複数のウイルス（例えばHIV-1及びHIV-2）の異なるタンパク質からいくつかの抗原決定基を同時に検出できる可能性がある。

40

50

【0140】

本発明の抗体は、1) 上述した抗原など(例えばp24及びp26)及び2) HIVに対する抗体(例えばエンベロープ抗原(例えばHIV-1グループM gp41、HIV-1グループO gp41及びHIV-2 gp36)を使用して)を検出する組合せアッセイに利用されてもよいことに留意されたい。本発明の抗体を利用するそのようなどんな組合せアッセイも、本発明の範囲内にあると見なす。

【0141】

上記のイムノアッセイによって試験され得る体液の例には、血漿、血清、脳脊髄液、唾液、涙、経鼻洗浄液又は組織及び細胞の水性抽出物が含まれるが、これに限定されるものではない。試験サンプルは、不活性化全ウイルス又は部分的に精製された若しくは組換えp24若しくはp26抗原を含んでもよい。

10

【0142】

特定の実施形態において、上述した抗体は、適切に標識された場合、組換えで得られたHIV-1 p24及びHIV-2 p26への結合に対して、血清サンプル中のHIV-1及びHIV-2コア抗体と競合するプローブとして使用され得ることに留意されたい。

【0143】

加えて、本発明の抗体又はそのフラグメントは、適切に標識されている各抗体を用いて、固定細胞又は固定組織を使用する検出系に使用され得る。具体的には、組織サンプルは、混合物を形成するために本発明の抗体の1つに付着したシグナル発生化合物を含むコンジュゲートと接触する。この混合物は次いで、抗原/抗体複合体を形成するのに十分な時間及び条件下でインキュベートされる。サンプル中に存在する抗原の存在が、発生したシグナルを検出することによって決定される。抗体は例えば親和性クロマトグラフィーによるHIV-1 p24抗原及びHIV-2 p26抗原の精製にも利用され得る。

20

【0144】

さらにまた、特定の実施形態において、本発明の抗体はマトリックスに結合され、例えば細胞培養物又は血液及び肝臓などの生物組織から特異的HIV-1及び/又はHIV-2抗原を親和性精製するのに使用され得る。抗体は例えば基材若しくは支持体上に付着又は固定され得る。次いで、HIV抗原決定基を含有している溶液は、抗体とp24及びp26決定基を含有しているポリペプチドとの免疫複合体を形成するのに適切な時間及び条件下で、固定化された抗体と接触させられる。結合していない物質は、結合した免疫複合体から分離される。次いで、複合体又は抗原性フラグメントが支持体から分離される。

30

【0145】

本明細書に記載の抗HIV抗体は、HIVタンパク質p24及びp26のエピトープマッピング用の研究ツールとして役立つ可能性もある。さらに、本明細書に記載の抗HIV抗体は、標的とされた領域又は抗原決定基の領域を含有する臨床分離されたHIVタンパク質及びHIVタンパク質前駆体に結合するだけでなく、加えてこの抗体は抗原決定基を含有する組換えタンパク質及びこのタンパク質の合成類似体に結合することに留意されたい。したがって例えば、本明細書に記載の抗体は、HIV-1のp24及びHIV-2のp26の組換えタンパク質並びに合成類似体を含む結合実験に使用され得る。

40

【0146】

加えて、未標識の本明細書に記載の抗体は、凝集アッセイに使用されてよく、又は免疫グロブリン特異的抗体などの抗体と反応性がある標識された抗体と組み合わせて使用されることもできる。

【0147】

V. 医薬組成物及び医薬投与

本明細書に記載の抗体は、対象に投与するのに適切な医薬組成物に組み込まれ得る。医薬組成物は通常、医薬として許容できる担体又は賦形剤と一緒に、治療的に有効な量又は医薬として有効な量の本明細書に記載の抗HIV抗体を含む。

【0148】

50

抗体は「天然」形又は必要に応じて塩、エステル、アミド、プロドラッグ、誘導体などの形で投与され得る、ただし塩、エステル、アミド、プロドラッグ又は誘導体が薬理的に適切である、すなわち本発明の方法に有効である。活性薬剤の塩、エステル、アミド、プロドラッグ及び他の誘導体は、有機合成化学の当業者に公知の標準的な手順及び例えば *March, (1992), Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure, (第4版, N.Y. Wiley-Interscience)* に記載される標準的な手順を使用して調製され得る。

【0149】

そのような誘導体を処方する方法は当業者に公知である。例えば、いくつかの送達薬剤のジスルフィド塩が、PCT公開WO 2000/059863に記載されている。同様に、治療的なペプチド、ペプチド又は他の模倣体の酸性塩は、通常は適切な酸との反応を含む従来の方法論を使用して遊離塩基から調製され得る。通常、薬物の基本形はメタノール又はエタノールなど極性有機溶媒に溶解され、そこへ酸が添加される。得られた塩は、沈殿させる又は極性の少ない溶媒を添加することによって溶液から取り出すことができる。酸付加塩を調製する場合に適切な酸には、有機酸（例えば酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸、サリチル酸など）並びに無機酸（例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸など）の両方が含まれるが、これに限定されるものではない。酸付加塩は、適切な塩基を用いる処理によって遊離塩基に再変換され得る。本明細書における活性薬剤の特定の特に好ましい酸付加塩には、塩酸又は臭化水素酸を使用して調製され得るハロゲン化物塩が含まれる。反対に、本発明の活性薬剤の塩基性塩の調製は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、トリメチルアミンなど医薬として許容できる塩基を使用する類似の方式で調製される。特定の実施形態において、塩基性塩はアルカリ金属塩、例えばナトリウム塩及び銅塩を含む。

【0150】

塩基性薬物の塩形態を調製する場合、対イオンの pK_a が、好ましくは薬物の pK_a より少なくとも約2 pH低い。同様に、酸性薬物の塩形態を調製する場合、対イオンの pK_a は、好ましくは薬物の pK_a より少なくとも約2 pH高い。これにより、対イオンが溶液の pH を pH_{max} より低いレベルにして、塩プラトー (*salt plateau*) に達することができる。塩プラトーにおいて塩の可溶性は遊離酸又は遊離塩基の可溶性に勝る。医薬品有効成分 (API) のイオン性基と酸又は塩基のイオン性基の間の pK_a ユニットの差の一般法則は、エネルギー的に好ましいプロトン移動を起こすことを意味している。API と対イオンの pK_a にあまり差がない場合、水性環境において固体複合体が生じる場合があるが、その固体は急速に不均化を起こす（すなわち薬物及び対イオンの個々の要素に分解する）可能性がある。

【0151】

典型的な実施形態において、対イオンは医薬として許容できる対イオンである。適切な陰イオン塩形態には、酢酸塩、安息香酸塩、ベンジレート、酒石酸水素塩、臭化物、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、フマル酸エステル、グルセプテート、グルコン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化塩、乳酸塩、ラクチオネート、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシレート、臭化メチル、硫酸メチル、ムケート、ナプシレート、硝酸塩、パモエート (エンボネート)、リン酸塩及び二リン酸塩、サリチル酸塩及びジサリチレート、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、トシレート、トリエチオグaid、吉草酸塩などが含まれるが、これに限定されるものではない、一方、適切な陽イオン塩形態には、アルミニウム、ベンザチン、カルシウム、エチレンジアミン、リシン、マグネシウム、メグルミン、カリウム、プロカイン、ナトリウム、トロメタミン、亜鉛などが含まれるが、これに限定されるものではない。

【0152】

様々な実施形態において、エステルの調製は通常、活性薬剤の分子構造中に存在するヒドロキシ基及び/又はカルボキシ基の官能化を含む。特定の実施形態において、エステルは通常、遊離アルコール基、すなわち式 $R\text{COOH}$ のカルボン酸 (R はアルキ、好ましくは低級アルキルである。) から得られる部分のアシル置換誘導体である。エステルは必要に応じて、従来の水素化分解又は加水分解手順を使用して遊離酸に再変換され得る。

【0153】

アミドも、当業者に公知である技術又は適切な文献に記載されている技術を使用して調製され得る。例えばアミドは好適なアミン反応物を使用してエステルから調製され得る。又はアミドはアンモニア又は低級アルキルアミンとの反応によって無水物又は酸塩化物から調製され得る。

10

【0154】

前述の通り、特定の実施形態において、医薬組成物は通常、医薬として許容できる担体又は賦形剤と一緒に治療的に有効な量又は医薬として有効な量の本明細書に記載の抗 HIV 抗体を含む。本明細書において、「医薬として許容できる担体」又は「医薬として許容できる賦形剤」には、生理的に適合性があるあらゆる溶剤、分散剤、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが含まれる。

【0155】

医薬として許容できる担体は、例えば組成物を安定化させる又は活性薬剤の吸収を増減させるように作用する1つ又は複数の生理的に許容できる化合物を含有することができる。生理的に許容できる化合物には、例えば炭水化物 (例えばグルコース、スクロース又はデキストランなど)、酸化防止剤 (アスコルビン酸又はグルタチオンなど)、キレート剤、低分子量タンパク質、脂質など保護及び取り込み促進剤、活性薬剤の隙間若しくは加水分解を減らす組成物若しくは賦形剤又は他の安定化剤及び/又は緩衝剤が含まれ得る。

20

【0156】

他の生理的に許容できる化合物、特に錠剤、カプセル剤、ゲルキャップなどの調製に利用される化合物には、結合剤、希釈剤/充填剤、ディスエンテグラント、潤滑剤、懸濁化剤などが含まれるが、これに限定されるものではない。

【0157】

特定の実施形態において、経口剤形 (例えば錠剤) を製造するためには、賦形剤 (例えばラクトース、スクロース、デンプン、マンニトールなど)、場合による崩壊剤 (例えば炭酸カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、グリコール酸デンプンナトリウム、クロスポビドンなど)、結合剤 (例えばデンプン、アラビアゴム、微結晶性セルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、シクロデキストリンなど) 及び場合による潤滑剤 (例えばタルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール 6000 など) が、例えば活性成分 (単数) 又は活性成分 (複数) (例えば活性ペプチド) に添加され、得られた組成物が圧縮される。必要な場合には、圧縮された産物は、例えば味覚を覆い隠すため又は腸溶性のため又は持続的放出のために公知の方法でコーティングされる。適切なコーティング材料には、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、酢酸フタル酸セルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート及びユドラジットが含まれるが、これに限定されるものではない (Rohm & Haas, Germany; メタクリル酸アクリルコポリマー)。

30

40

【0158】

他の生理的に許容できる化合物には、湿潤剤、乳化剤、分散剤又は微生物の増殖又は作用の防止に特に有用である防腐剤を含む。様々な防腐剤が周知であり、例えばフェノール及びアスコルビン酸を含む。当業者は、生理的に許容できる化合物を含む医薬として許容できる担体の選択が、例えば活性薬剤の投与経路及び活性薬剤の特定の生理化学的な特性によって決まることを、認識するはずである。

【0159】

特定の実施形態において、賦形剤は無菌であり一般に望ましくない物質を含まない。こ

50

これらの組成物は、従前通りの周知の殺菌技術によって殺菌され得る。錠剤及びカプセル剤など様々な経口剤形賦形剤の場合、無菌性は必要ない。USP/NF規格で通常十分である。

【0160】

医薬組成物は、様々な形態であってよい。それらの形態には、例えば液剤（例えば注射可能な及び点滴可能な溶液）、分散剤又は懸濁剤、錠剤、丸剤、散剤、リポソーム及び坐剤などの液体、半固体及び固体剤形が含まれる。好ましい形態は、意図される投与様式及び治療適用によって決まる。典型的な好ましい組成物は、他の抗体を用いるヒトの受動免疫に使用されるものと類似の組成物など、注射可能な又は点滴可能な溶液の形態である。典型的な投与様式は、非経口である（例えば静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）。特定の実施形態において、抗体は静脈内点滴又は注射によって投与される。別の実施形態において、抗体又は抗体フラグメントは筋肉注射若しくは皮下注射によって投与される。

10

【0161】

多くの治療的な用途では、好ましい投与経路/投与様式は静脈内注射又は点滴であるが、本発明の抗体は当技術分野において公知の各種方法によって投与され得る。当業者が認識しているように、投与経路及び/又は投与様式は、所望の結果によって変化する。特定の実施形態において、活性化合物は、植込錠、経皮パッチ及びマイクロカプセル化送達システムを含めた放出制御製剤など化合物の急速な放出を防ぐ担体と一緒に調製されてよい。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性のポリマーを使用することができる。そのような製剤の調製法の多くは、特許を受けている又は当業者に一般に公知である（例えば、Robinson編、(1978)、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、Marcel Dekker, Inc.、New Yorkを参照のこと）。

20

【0162】

特定の実施形態において、抗体は、例えば不活性希釈剤又は吸収可能な食用担体と一緒に経口投与されてよい。化合物（及び必要に応じて他の成分）は、硬質又は軟質ゼラチンカプセルに封入される、錠剤、口腔内剤、トローチ剤に圧縮される、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、カシエ剤などであってよい。本発明の抗体又は抗体フラグメントを非経口投与以外で投与するには、不活性化を防止する物質で化合物をコーティングする、又はその物質と化合物を同時投与する必要がある可能性がある。

30

【0163】

補助活性化合物も組成物に組み込まれ得る。特定の実施形態において、抗体又は抗体部分は、1つ又は複数の追加的な治療剤と同時処方及び/又は同時投与される。そのような組合せ療法は、投与される治療剤を低用量で都合よく利用し、したがって単独療法に伴って起こり得る毒性又は合併症を回避できる可能性があり、あるいは相乗的又は加算的に作用して治療効果を増強する可能性がある。

【0164】

用量計画は、最適な期待応答（例えば治療的又は予防的な応答）が得られるように調整される場合がある。例えば、ポールスが単回投与されてよく、いくつかの分割投薬量が徐々に投与されてよく又は投薬量が治療状況の緊急性に比例して増減されてよい。投与の簡便性及び用量の均一性のためには、非経口組成物を単位投与量形で処方することが特に有用である。本明細書では単位投与量形とは、試験される哺乳動物対象に対する単一用量として適当な物理的に別個の単位を意味する；各単位は、必要な医薬用担体と関連して所望の治療効果を得るために算出されたあらかじめ決められた量の活性化合物を含有している。本発明の単位投与量形に関する仕様は、(a) 活性化合物の固有の特性及び達成されるべき特定の治療効果又は予防効果及び(b) 個々の治療感受性のためにそのような活性化合物を調合する固有の技術的制限による影響を受け、これらによって直接決定される。

40

【0165】

本発明の抗体又は抗体部分の治療的又は予防的有効量の例示的で非限定的な範囲は、0

50

、1 - 20 mg / kg、より好ましくは、0.5 - 10 mg / kgである。用量値は、緩和される症状の型及び重症度と共に変化し得る点に留意する必要がある。どんな特定の対象の場合でも、具体的な用量計画が、個々の必要量及び組成物を投与する又は投与を監督する人の専門家としての判断にしたがって徐々に調整されるべきであること、及び本明細書に記載の用量範囲は単なる例示であり請求された組成物の範囲又は実施を制限するものではないことはさらに理解されよう。

VI. キット

別の実施形態において、このキットは、本明細書に記載のいずれかの方法を実施するために提供される。通常、キットは1つ又は複数の本明細書に記載の抗体を含有している容器を含む。特定の実施形態において、抗体は、検出可能な標識で標識される。特定の実施形態において、抗体は、医薬処方（例えば坐剤、錠剤、カプレット、パッチなど単位用量処方）で提供され及び/又は場合によって1つ又は複数の医薬として許容できる賦形剤と組み合わせられてよい。

10

【0166】

特定の実施形態において、キットはさらに、本明細書に記載の方法を実施するために1つ又は複数の追加的な試薬を含む。そのような試薬には、検出可能な標識に結合している抗体、シグナル発生化合物用の基質、緩衝液、抗体が付着している基材、HIV-1及び/又はHIV-2タンパク質の連続希釈物などが含まれるが、これに限定されるものではない。

【0167】

加えて、キットは場合によって、標識及び/又はこの方法の実施若しくは「治療薬」若しくは「予防薬」の使用に関する説明（すなわち手順）を提供する指示書、又は本発明の検出試薬を含む。特定の指示書は、治療的又は予防的に感染を抑制する又は防止するための1つ又は複数の本発明の活性薬剤の使用について記載している。指示書は場合によって、好ましい用量/治療的レジメン、副作用（counter indications）などを教示してもよい。特定の指示書は、本明細書に記載の1つ又は複数のアッセイを実行する手順を提供している。

20

【0168】

通常、指示書は筆記物又は印刷物を含むが、そのようなものに限定されない。そのような説明を格納し、最終使用者に伝達できるどんな媒体も、本発明で意図されている。そのような媒体には、電子的記憶媒体（例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学的媒体（例えばCD-ROM）などが含まれるが、これに限定されるものではない。そのような媒体は、そのような指示書を提供しているインターネットサイトのアドレスを含んでよい。

30

【実施例】

【0169】

以下の例は、実例を提示するが、請求の発明を制限するものではない。

[実施例1]

抗原に対する抗体結合親和性の決定

アズラクトンビーズ（Pierce、Rockford、ILから入手した）を、ビーズ50 mg、HIV抗原（HIV-1グループM、HIV-1グループO又はHIV-2 rp26）80 µg、0.5 M炭酸緩衝液pH 10 100 µL及び蒸留水900 µLを混合し、室温で1時間を回転させることによりHIV抗原でコーティングした。次いで14,000 x gで30秒間遠心してビーズを沈殿させ、上清を吸引除去した。ビーズを1 M Trizma HCl緩衝液900 µL及び10% BSA 100 µLに再懸濁し、室温で2時間回転させて抗原が結合していない場所をブロッキングした。ビーズをPBS pH 7.4で2回洗浄し、最終的にPBS pH 7.4 30 mLに再懸濁した。

40

【0170】

抗HIV mAb（固定濃度）及び様々な濃度の1組のHIV抗原を含有するサンプル溶液を以下の通り調製した。抗HIV mAbを、1 pMとなるように1% BSAを含む

50

PBS pH 7.4で希釈した。HIV抗原を、1 pM抗HIV mAb 20 mLに希釈して、最終濃度100 pMにした。1 pM抗HIV mAb溶液中の抗原と1 pM抗HIV mAb溶液とを等容量混合することによって、抗HIV抗原を2倍希釈した1組を調製した。得られた1組の抗HIV mAbとHIV抗原との混合物は、抗原濃度100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.79、0.39、0.20、0.10及び0.05 pMを含んだ。抗原-mAbサンプル溶液を室温で8時間インキュベートして結合を平衡に至らせ、その後溶液相の遊離mAbの相対量をKinExA (Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID)と呼ばれる機器で試験した。

【0171】

HIV抗原でコーティングしたアズラクトンビーズを、KinExAのビーズ容器に入れた。機器はビーズ容器から自動的に467 µLのビーズスラリーを吸い込み、フローセルにビーズを詰めた。機器のサンプルラインを、抗原-mAbサンプル溶液に置いた。次いで機器は詰められたビーズ全体に4 mLのサンプル溶液を流した。HIV抗原でコーティングしたビーズは、結合平衡を妨げることに無しにサンプル溶液中のごく一部の遊離mAbを捕捉した。PBS pH 7.4でビーズを洗浄した後、機器は1 µg/mLヤギ-抗マウスCy5コンジュゲート又はヤギ-抗ヒトCy5コンジュゲート1.5 mLをビーズ全体に流して、ビーズ上に捕捉されたmAbに結合させた。mAb捕捉前及びコンジュゲート結合後の蛍光の差をシグナルとして記録した。

【0172】

機器に備わっているソフトウェアで最小二乗法を使用してシグナル対抗原濃度のデータを数学的にフィットさせた。解離定数(K_D)を算出し、記録した(表4を参照のこと)。

【0173】

【表4】

表4 HIV抗体について算出した K_D 、 k_{on} 及び k_{off}

	抗原						
	HIV-1グループM			HIV-1グループO			HIV2 rp26
Ab	K_D (pM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (pM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (pM)
WT	8.8	0.81×10^7	7.1×10^{-5}	10.0	1.4×10^7	1.4×10^{-4}	10.8
AM1	0.96	1.1×10^7	1.1×10^{-5}	0.27	1.7×10^7	4.6×10^{-6}	0.84
AM2	0.62	1.1×10^7	6.8×10^{-6}	0.58	1.7×10^7	9.9×10^{-6}	0.79

解離速度(k_{off})は、 K_D 及び k_{on} から算出した。 ND:未決定 N/A:該当なし

【0174】

本明細書に記載の実施例及び実施形態は単なる例示目的であり、その観点から様々な修正又は変更が当業者に示唆され、それらが本出願の精神と範囲並びに添付の特許請求の範囲に含まれることを理解されたい。本明細書において引用されている全ての刊行物、特許及び特許出願は、あらゆる目的のためにそれらの全体を参照により本明細書に組み込む。

【 図 1 】

抗体: 115B-151-423 AM1 mG1k

重鎖のアミノ酸配列

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILPGAGSLNNN
Fr1 CDR1 Fr2 CDR2

EKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYRYDGIMFYWGQGLTVTVAASKT
Fr3 CDR3 Fr4

TPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL
 SSSVTVPSSTWPFSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPK
 DVLITLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIM
 HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIFFPKQMAKDKVSLTCLMIT
 DFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSIYFYVSKLVQKSNWEAGNFTTCSVLHEG
 LHNHHTKSLSHSPGK

軽鎖のアミノ酸配列

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKSPHLLVNTKTLAEGVPSR
Fr1 CDR1 Fr2 CDR2

FSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRADAAPTIVSIFPPSS
Fr3 CDR3 Fr4

EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTK
 DEYERHNSYTCEATHKTTSTPIVKSFNREK

Fig. 1

【 図 2 】

115B-151-423 AM2 mG1k

重鎖のアミノ酸配列:

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILPGTGSLNNN
Fr1 CDR1 Fr2 CDR2

EKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYRYDGIMFYWGQGLTVTVAASKT
Fr3 CDR3 Fr4

TPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL
 SSSVTVPSSTWPFSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPK
 DVLITLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIM
 HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIFFPKQMAKDKVSLTCLMIT
 DFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSIYFYVSKLVQKSNWEAGNFTTCSVLHEG
 LHNHHTKSLSHSPGK

軽鎖のアミノ酸配列:

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKSPHLLVNTKTLAEGVPSR
Fr1 CDR1 Fr2 CDR2

FSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRADAAPTIVSIFPPSS
Fr3 CDR3 Fr4

EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTK
 DEYERHNSYTCEATHKTTSTPIVKSFNREK

Fig. 2

【 図 3 】

115B-151-423 AM1 hG1k

重鎖のアミノ酸配列:

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILPGAGSLNNN
Fr1 CDR1 Fr2 CDR2

EKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYRYDGIMFYWGQGLTVTVAASKT
Fr3 CDR3 Fr4

KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFL
 FPPKPKDTLMSISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSK
 SVMHEALHNYTQKSLSLSPGK

軽鎖のアミノ酸配列:

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKSPHLLVNTKTLAEGVPSR
Fr1 CDR1 Fr2 CDR2

FSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRRTVAAPSVFIFFPS
Fr3 CDR3 Fr4

DEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLTLK
 KADYKHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 3

【 図 4 】

115B-151-423 AM2 hG1k

重鎖のアミノ酸配列:

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILPGTGSLNNN
Fr1 CDR1 Fr2 CDR2

EKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYRYDGIMFYWGQGLTVTVAASKT
Fr3 CDR3 Fr4

KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFL
 FPPKPKDTLMSISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSK
 SVMHEALHNYTQKSLSLSPGK

軽鎖のアミノ酸配列:

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKSPHLLVNTKTLAEGVPSR
Fr1 CDR1 Fr2 CDR2

FSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRRTVAAPSVFIFFPS
Fr3 CDR3 Fr4

DEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLTLK
 KADYKHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 4

【配列表】

0005978212000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 16/08	(2006.01)	C 0 7 K 16/08	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543	(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 0 1 A
G 0 1 N 33/569	(2006.01)	G 0 1 N 33/569	H
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 プロフイー，スーザン
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 4 6、リンデンハースト、マラード・ドライブ・2 4 7 7
- (72)発明者 ホワン，ダーガン
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 6 0、マンデレイン、オーリンズ・ドライブ・1 3 7 5
- (72)発明者 テイーマン，ブライアン
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 1 2 6、エルムハースト、サウス・レックス・ブルバード・1 4 0
- (72)発明者 シエツフエル，ジエイムズ
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・2 8 1 5 0、シエルビー、グリツグ・ロード・3 6 5 5
- (72)発明者 タイナー，ジヨン
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 8 7、ビーチ・パーク、ノース・オーチャード・ロード・3 7 8 3 5
- (72)発明者 ツイーマン，ロバート
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 6 7、パラタイン、ウエスト・ドルセット・アベニュー・5 2 5

審査官 大久保 智之

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 9 / 0 4 1 6 4 3 (W O , A 1)
特表2 0 0 4 - 5 3 6 5 6 8 (J P , A)
Molecular Immunology , 2 0 0 8 年 , 46 , 135-144
Research in Immunology , 1 9 9 4 年 , 145 , 33-36
BioTechniques , 2 0 0 4 年 , 36 , 5 , 864-870
Journal of Immunological Methods , 2 0 0 2 年 , 267 , 37-51

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 0 7 K 1 6 / 0 0
C 1 2 N 1 / 0 0
C 1 2 N 5 / 0 0
G 0 1 N 3 3 / 0 0
C 1 2 P 2 1 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

专利名称(译)	对HIV核心蛋白特异的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP5978212B2	公开(公告)日	2016-08-24
申请号	JP2013526120	申请日	2011-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	ベルクジヨナサン プロフィースーザン ホワンダーガン テーマンブライアン シエツフエルジエイムズ タイナージヨーン ツイーマンロバート		
发明人	ベルク,ジヨナサン プロフィー,スーザン ホワン,ダーガン テーマン,ブライアン シエツフエル,ジエイムズ タイナー,ジヨーン ツイーマン,ロバート		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C07K16/46 C07K16/08 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/1054 C07K2317/92 G01N33/56988		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C07K16/46 C07K16/08 G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/569.H C12P21/08		
审查员(译)	智之大久保		
优先权	61/376590 2010-08-24 US		
其他公开文献	JP2013538059A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及可用于检测人免疫缺陷病毒 (HIV) 的新型抗体。这些抗体显示出高灵敏度，并且被认为提供了广泛的特异性。本抗体可用于检测样品中的HIV-1和HIV-2核心抗原。

115B-151-423 AM1 CDRs		序列 番号
CDR H1: Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Ser-Tyr-Trp-Ile-Glu (GYTFFSYWIE)		5
CDR H2: Glu-Ile-Leu-Pro-Gly- <u>Ala</u> -Gly-Ser-Leu-Asn-Asn-Asn-Glu-Lys -Phe-Arg-Asp (EILPG <u>A</u> GSLNNNEKFRD)		6
野生型 CDR H2: Glu-Ile-Leu-Pro-Gly- <u>Thr</u> -Gly-Ser-Leu-Asn-Asn-Asn-Glu-Lys -Phe-Arg-Asp (EILPG <u>T</u> GSLNNNEKFRD)		7
CDR H3: Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Ile-Met-Phe</u> -Tyr (GYRYDGIMFY)		8
野生型 CDR H3: Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Trp-Phe-Ala</u> -Tyr (GYRYDG <u>WEA</u> Y)		9
CDR L1: Arg-Thr-Ser-Glu-Asn-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Leu-Ala (RTSENIYSYLA)		10
CDR L2: Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu (NTKTLAE)		11
CDR L3: Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Glu-Val</u> -Leu-Thr (CHHYDE <u>V</u> LT)		12
野生型 CDR L3: Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Ser-Pro</u> -Leu-Thr (CHHYDE <u>S</u> PLT)		13