

(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2015-532591

(P2015-532591A)

(43) 公表日 平成27年11月12日 (2015. 11. 12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z	4 B O 2 4
C O 7 K 16/10 (2006.01)	C O 7 K 16/10	4 B O 6 3
C O 7 K 14/16 (2006.01)	C O 7 K 14/16	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-526998 (P2015-526998)
 (86) (22) 出願日 平成25年8月16日 (2013. 8. 16)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年4月6日 (2015. 4. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/067131
 (87) 国際公開番号 W02014/027082
 (87) 国際公開日 平成26年2月20日 (2014. 2. 20)
 (31) 優先権主張番号 12382328.8
 (32) 優先日 平成24年8月17日 (2012. 8. 17)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(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
 ペニーダ・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】 H I V G P 1 2 O変異体のための迅速な免疫原選択改良法

(57) 【要約】

本発明は、中和抗体に対して提示される表面ポリペプチドの無作為な変異体を含む組換えウイルスライブラリーへの結合に基づいた、迅速な免疫原選択のための改良法 (R I S) に関する。本発明はまた、本発明の R I S 法に従って分離された免疫原の、ウイルスにより引き起こされる疾病を治療するための医薬における使用、および患者の中和抗体を同定するための診断における使用にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

あるポリペプチドに対する中和抗体を誘発可能な免疫原を同定するための方法であって、

(i) 前記ポリペプチドに特異的な中和抗体と、組換えウイルスのライブラリーとを接触させる工程であって、当該組換えウイルスは、それぞれ前記ポリペプチドの変異体をコードする無作為の遺伝子を含んでなり、かつ前記ポリペプチドを発現するものである工程と、

(i i) 前記中和抗体への結合能に基づいて、前記中和抗体に結合する組換えウイルスライブラリーメンバーを、結合しないメンバーから分離する工程と、そして

(i i i) 工程 (i i) において選択された組換えウイルスライブラリーメンバーに見出される変異ポリペプチドの配列をディープシーケンシングによって決定する工程とを少なくとも含んでなる、方法。

【請求項 2】

工程 (i i i) が、変異ポリペプチドをコードする遺伝子の選択された領域の増幅によって得られたアンプリコンにおいて行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記中和抗体が固定化されたものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記中和抗体が支持体の表面に直接付着されてなるものである、請求項 3 に記載の方法

【請求項 5】

前記ライブラリーメンバーの分離が、前記結合したメンバー集団に由来するウイルスの少なくとも一つのポリペプチドを定量することによって判定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

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 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ウイルスがレトロウイルスである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記レトロウイルスが HIV である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記無作為の遺伝子が、env 遺伝子である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ポリペプチドの変異体をコードする遺伝子の選択された領域が、配列番号 2 によってコードされたポリペプチドの、アミノ酸 86 ~ 220 の配列、アミノ酸 426 ~ 530 の配列、またはアミノ酸 529 ~ 643 の配列を含むものである、請求項 9 に記載の方法

【請求項 11】

工程 (i i) 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 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記中和抗体が、4E10 mAb、2F5 mAb、b12 mAb、2G12 mAb、および PG16 mAb からなる群より選択される、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

ウイルスに対する中和抗体を誘発可能なポリペプチドであって、当該ポリペプチドが変異体 HIV-1 gp120 またはその免疫原性断片を含むものであり、ここで前記変異体 gp120 またはその免疫原性断片が、配列番号 2 における位置番号 87、88、89

10

20

30

40

50

、 1 3 1、 1 3 2、 1 3 7、 1 3 8、 1 6 0、 1 6 5、 1 9 1、 2 2 5、 4 7 0、 5 3 8、 5 7 8、 および 6 4 7 からなる群より選択される位置において少なくとも変異を含むポリペプチドからなる群より選択されるものである、ポリペプチド。

【請求項 1 4】

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

【請求項 1 5】

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、 および A 2 2 5 V 変異、 E 8 7 G および V 8 9 L 変異、または M 1 6 5 L、 S 5 3 8 T、 および K 5 7 8 M 変異を含む、請求項 1 4 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 1 6】

前記ポリペプチドまたはその免疫原性断片が、配列番号 2 0 ~ 2 8 からなる群より選択される配列を含むものである、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたはその免疫原性断片。

【請求項 1 7】

請求項 1 3 ~ 1 6 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 1 8】

請求項 1 3 ~ 1 6 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。

20

【請求項 1 9】

請求項 1 8 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 2 0】

請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 1 8 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 1 9 に記載の発現ベクターを含んでなる、宿主細胞。

【請求項 2 1】

請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 1 8 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 1 9 に記載の発現ベクターを含んでなる、免疫原組成物またはワクチン。

30

【請求項 2 2】

医薬において使用するための、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 1 8 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 1 9 に記載の発現ベクター、または請求項 2 1 に記載の免疫原組成物またはワクチン。

【請求項 2 3】

H I V 感染によって引き起こされる疾病の治療または予防において使用するための、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 1 8 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 1 9 に記載の発現ベクター、または請求項 2 1 に記載の免疫原組成物またはワクチン。

【請求項 2 4】

特定の病原体に対して特異的な中和抗体を試料中に検出するための方法であって、
 (i) 前記試料と、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチドとを接触させる工程と、そして
 (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少なくとも含んでなる、方法。

40

【請求項 2 5】

被験体のウイルス感染に対する中和抗体の応答を検出するための方法であって、請求項 2 4 に記載の方法を用いて、前記被験体における中和抗体の存在を検出する工程を含んでなり、ここで対照被験体に対する前記被験体における中和抗体の存在が、前記被験体におけるウイルス感染に対する中和抗体の応答を示しているとする、方法。

50

【請求項 26】

前記ウイルスが HIV であり、前記ポリペプチドが請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載の gp120 変異ポリペプチドまたはその断片である、請求項 24 または 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記試料が HIV-1 に感染した患者に由来するか、または前記試料が AIDS ワクチンレシピエントに由来するものである、請求項 26 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、高い中和抗体 (nAb) 活性を誘発する、迅速な免疫原選択のための改良法に関する。nAb 活性が増大したこれらの免疫原については、幾つかの例が開示され、例示されている。特に、HIV-1 Env エピトープに対する抗体への親和性が増大した免疫原について開示されている。

【背景技術】

【0002】

1982 年以来、全世界で 6000 万人を超える人々がヒト免疫不全ウイルスに感染したと推定される。同期間に、これら感染者のうちの半数近くは、結果として後天性免疫不全症候群 (AIDS) により死亡した。ウイルスの蔓延は最近になって停滞しているようではあるが、2009 年には 250 万人の新たな HIV 感染者が報告された。HIV はなお、公衆衛生上の主要な問題である。UNAIDS, 2010 Report on the global AIDS epidemic を参照されたい。

20

【0003】

HIV-1 は、これまでに報告された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 系統樹には、M (main: 主要)、N (new: 新規)、および O (outlier: 外れ値) の、三つの主要な群がある。最も広範に及ぶのは M 群ウイルスであり、感染全体の 99% を超える。現在この群は、主に短い env (エンベロープ) 遺伝子配列に基づき、9 の異なった遺伝的亜型または分枝群 (A から K) に分類される。McCutchan F, AIDS 2000; 14 (S3): S31 - S44 および Robertson D, et al., Science 2000; 288: 55 - 56 を参照されたい。

30

【0004】

Env は最も変化しやすい HIV-1 遺伝子であり、分枝群間で 35% までの配列多様性、分枝群間で 20% までの配列多様性、かつ一人の感染者において 10% までの配列多様性がある。Kuiken C, et al., AIDS 1996; 10: 31 - 37 および Shankarappa R, et al., J. Virol. 1999; 73: 10489 - 10502 を参照されたい。分枝群 B は、ヨーロッパ、アメリカ、およびオーストラリアで優勢である。Kuiken C, et al., AIDS 1996; Am. J. Epidemiol. 2000; 152: 814 - 822 を参照されたい。分枝群 C は南アフリカ、中国、およびインドにおいて一般的であり、現在、世界中でその他のどの分枝群よりも多くの感染者がみられる。上記の McCutchan, 2000 を参照されたい。中央および東アフリカでは分枝群 A および D が顕著である。

40

【0005】

しかしながら、共に流行するウイルスとの混合によってしばしば分枝群間での組換えが起こるため、多くのウイルスは分枝群に分類することが困難である。Heyndrickx L, et al., J. Virol. 2000; 74: 363 - 370 および McCutchan F, et al., Virology 1999; 254: 226 - 234 を参照されたい。実際に幾つかの組換え型は、組換え型流行株 (circulating

50

recombinant form: CRF) と呼ばれる重要な流行系列を生じた。最も一般的な CRF は、タイで発見され、最初は分枝群 E として分類されたが、後にゲノム内の env のみが分枝群 E であり、その他の部分は分枝群 A であることが見出された CRF01 (AE)、および西アフリカにおける一般的な AG 組換え型である CRF02 の二つである。上記の Robertson, 2000 を参照されたい。全体的には、分枝群 A から D、ならびに CRF01 AE および CRF02 AG 組換え型が、全世界での感染の 90% を超える。

【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、感受性細胞への感染を遮断することにより、HIV-1 への曝露に対する最初の適応免疫防御となる。Kwong P, et al., Nature 1998; 393: 648 - 659, Moore J, et al., J. Virol. 1994; 68: 469 - 484, Moore P, et al., J. Virol. 1996; 70: 1863 - 1872、および Parren P, et al., AIDS 1999; 13: S137 - S162 を参照されたい。幾つかのウイルスに対するワクチンの有効性は、nAb の誘発能によるものである。Burton D, Nat. Rev. Immunol. 2002; 2: 706 - 713 および Zinkernagel R, et al., Adv. Immunol. 2001; 79: 1 - 53 を参照されたい。しかしながら、多くの努力にもかかわらず、有効な HIV-1 免疫原の開発にはあまり進展がみられない。McMichael A, et al., Nat. Med. 2003; 9: 874 - 880, Burton, 2002、および上記の Moore, 1996 を参照されたい。これらの免疫原の設計には、より良い nAb 応答を誘導可能なエピトープの同定が必要となる。残念ながら現在のところ、広域 nAb 応答を誘発する免疫原を開発しようとする試みの全ては失敗に終わっている。

【0007】

次世代の配列決定技術においては、進歩したマイクロフルイディクス、ナノテクノロジー、および画像処理による改良を用いることで、単一の試料から多数の DNA 配列を読み取ることが可能となった。特に 454 社のプラットフォームでは、ヌクレオチドの取り込みと発光二次反応との共役によって、450 塩基対の長さの DNA 配列が供給可能である。Margulies M, et al., Nature 2005; 437: 376 - 380 を参照されたい。光シグナルは後に処理され、配列試料の DNA 配列に相補的なヌクレオチドへと解析される (配列の読み取り)。このように該技術は、DNA ライブラリー、例えば HIV 試料から得られた DNA ライブラリーを高解像度で詳細に特徴付けるために用いることができる。標準的なサンガーの配列決定とは対照的に、ディープシーケンシングによって、単一の HIV クローンを個別に特徴付けること、および試料中の HIV 集団の詳細を完全に説明することが可能となる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

このように、当該技術分野では、より良い nAb 応答を誘導可能である新規な HIV-1 免疫原が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、B 細胞免疫原として用いた際に高い nAb 活性を誘発可能な免疫原を迅速に選択するための改良法 (RIS) を指す。本方法は、i) 関心のある野生型エピトープの配列をコードするヌクレオチドを無作為に変異させて、前記エピトープの変異体のライブラリーを作製する工程、ii) 野生型エピトープへの親和性をもつことが知られる抗体、またはその一部を用いて、該ライブラリーを試験する工程、iii) 抗体の親和性を増大させるエピトープ変異体を選択する工程、および iv) エピトープ変異体をディープシーケンシング解析へ供する工程を含む。好ましくは、エピトープは HIV エピトープである

。さらに好ましくは、エピトープはE n vエピトープである。本発明は、2012年2月24日に提出したPCT/欧州特許出願第2012/053185号に開示した方法を改良したものである。本発明は、より単純、迅速で、かつさらに効率的なRIS法を提供する。加えて、ウイルス粒子を捕捉するための抗FCアッセイは必要とされず、変異が高率で同定される。

【0010】

第2の実施形態によれば、本発明は、改良RIS法によって得たヌクレオチド配列およびペプチド、例えば配列番号20～28のヌクレオチド配列に関する。

【0011】

第3の実施形態によれば、本発明は、関心のある野生型エピトープの作用によって全体的または部分的に誘導される疾病の予防および治療のための、改良RIS法によって得た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、該疾病はAIDS、またはHIV感染により引き起こされる疾病である。

【0012】

第4の実施形態によれば、本発明は、改良RIS法の診断上の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明の改良RIS法を用いて同定した変異体の配列を示した図である。最上部の配列は、AC10 gp160ポリペプチドのアミノ酸121ないし160に対応する。単離したクローン内の対応領域の配列については、ドットで示した部分のアミノ酸はAC10 gp160のアミノ酸と同じであることを示し、また、対応するアミノ酸で示した位置は、変異体の配列が野生型の配列と異なることを示す。

【図2】4E10抗体とLR1-C1特異的変異体との間の提案される相互作用を示した図である。三つの潜在的なN-結合型グリコシル化部位の欠損を含む11アミノ酸の置換を、env遺伝子全体にわたって示す。C131Y変異は、この置換がV1/V2ループ構造を破壊するC131とC157の間の未変性ジスルフィド結合を排除することから、特に関連性がある(B)。

【図3】本発明の改良RIS法を用いて同定したLR1-C1ウイルス粒子が、広域中和抗体4E10に対して親和性を増大させることを示した図である。グラフは、4E10抗体によりコートされたか、または未処理のプレートのいずれかに、量を次第に増加させたAC10野生型分離株およびLR1-C1分離株を加えることにより判定した、4E10抗体をコートしたプレートへのウイルス粒子結合のタイトレーションを示す。ダイアグラムは4E10抗体のLR1-C1への親和性が、野生型変異体と比較して4倍増加したことを示す。

【図4A】4E10抗体による本発明の改良RIS法を用いて同定したLR1-C1ウイルス粒子は、その他の広域中和抗体に対して親和性を増大させないことを示した図である。グラフは、抗体によりコートされたか、または未処理のプレートのいずれかに、量を次第に増加させたAC10野生型分離株、LR1-C1分離株、またenv遺伝子に欠失をもつウイルス粒子を加えることにより判定した、2F5(パネルA)、2G12(パネルB)、またはb12(パネルC)抗体をコートしたプレートへのウイルス粒子結合のタイトレーションを示す。

【図4B】図4AパネルB参照。

【図4C】図4AパネルC参照。

【図5A】配列番号44のAC10野生型配列に対するアラインメントを示した図である。配列番号44はPG16抗体に対する親和性を有する。改変配列は、潜在的なグリコシル化部位内のi)N203S、およびgp41免疫優性領域内のii)G604Eの二つの変異を示す。

【図5B】図5A参照。

【図6A】Env遺伝子を配列決定するための増幅の設計を示した図である。三つのアンプリコンを設計したが、そのうちの二つは、関心のあるEnv遺伝子領域を試験するため

10

20

30

40

50

に重複している。

【図 6 B】図 6 A 参照。

【図 7 A】各アンプリコンおよび試料について得られた配列の品質管理を示した図である。各アンプリコンおよび試料における読み取り数を最初の表に示す。「長さ制御」のグラフは、対応するアンプリコンの長さの分布を、一つの試料に対する 3 回の増幅によって示す。「混入制御」のグラフは、三つのアンプリコンについて、真の試料ではなく混入物に由来した解析配列を除外するために、潜在的な混入源に対する類似性指数を示す。

【図 7 B】図 7 A 参照。

【図 7 C】図 7 A 参照。

【図 8】配列決定した領域内の各ヌクレオチド位置の多様度を示した図である。横軸に、参照とは異なる各ヌクレオチド位置に対する読み取りのパーセンテージ (%) を示す。

10

【図 9】組換えウイルスライブラリー L 1 L 2 L 3 および野生型 A C 1 0 ライブラリーの多様度を示した図である。横軸に、参照とは異なる各ヌクレオチド位置に対する読み取りのパーセンテージ (%) を示す。

【図 10】組換えウイルスライブラリー L 1 L 2 L 3、および抗体 R 1 を用いた最初の精製後の組換えウイルスライブラリーである L 1 L 2 L 3 R 1 に、野生型 A C 1 0 からの多様度の増加が観察されることを示した図である。横軸に、参照とは異なる各ヌクレオチド位置に対する読み取りのパーセンテージ (%) を示す。

【図 11】L 1 L 2 L 3 R 1 ライブラリーにおけるアミノ酸変異を示した図である。各変異の位置 (位置)、読み取り数 (深度)、変異命名法をカラム内に示す。各変異の位置 (位置)、前記位置の読み取り数 (深度)、参照の A C 1 0 を用いた変異の命名法 (変異)、変異を決定するための読み取り数 (読み取り)、ライブラリー中の変異の頻度 (読み取り * 1 0 0 / 深度)、この位置に構造的な事象がある場合にはその事象 (事象、G = グリコシル化、C - C、ジスルフィド橋)、および変異が既に古典的 R I S 法により見出されたか否かによる状態「予測済」を示す。また、変異が観察されたエンベロープ遺伝子の二次構造も示す。

20

【図 12 A - 1】得られた各アンプリコンの全配列を示した図である (A : A m p __ 1、B : A m p __ 3、C : A m p __ 4)。各配列において、前のスライドにて観察された変異を対照として A C 1 0 を用いて示す。

【図 12 A - 2】図 12 - A 1 参照。

30

【図 12 B - 1】図 12 - A 1 参照。

【図 12 B - 2】図 12 - A 1 参照。

【図 12 C - 1】図 12 - A 1 参照。

【図 12 C - 2】図 12 - A 1 参照。

【0 0 1 4】

発明の詳細な説明

本発明は、H I V - 1 エンベロープタンパク質 (E n v) を免疫原として最適化するための新規なアプローチを指す。このアプローチは、エピトープがウイルス粒子上へ露出されるに従って抗体を誘発する能力を考慮するものである。該方法は、無作為に変異させたエンベロープタンパク質をもつウイルス粒子のライブラリーに由来する、広域 n A b に対する親和性が増大した変異体の選択に基づく。

40

【0 0 1 5】

本発明によれば、P C R に基づいた方法によって無作為に変異させたエンベロープのライブラリーを作製するため、H I V 株 A C 1 0 由来の完全長 e n v 遺伝子を用いた。p N L 4 - 3 内に構築することによってクローニングを行い、2 9 3 T 細胞内への一過性のトランスフェクションによってウイルス粒子を得た。改良された溶液中ウイルス粒子捕捉アッセイ (a n i m p r o v e d i n - s o l u t i o n v i r i o n c a p t u r e a s s a y) により、広域 n A b である 4 E 1 0 に対する親和性が増大したウイルスを選択した。捕捉したウイルス集団から R N A を抽出した後、さらなる配列決定を行い、かつ p N L 4 - 3 内へ構築して再クローニングするために、逆転写 P C R を行って対応

50

するウイルスからenv遺伝子を得た。一回目の選択後、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。

【0016】

1. 一般的な用語および表現に対する定義

本明細書で用いられる用語「AIDS」は、HIV感染の症候性の段階を指し、これには後天性免疫不全症候群（一般にAIDSとして知られる）および「ARC」、すなわちAIDS関連症候群の両方が含まれる。Adler M, et al., Brit. Med. J. 1987; 294: 1145-1147を参照されたい。AIDSの免疫学的および臨床的症状は当該技術分野において公知であり、これには例えば、免疫不全に起因する日和見感染および癌が含まれる。

10

【0017】

本明細書で用いられる用語「アンプリコン」は、PCR反応もしくはその他の増幅反応または方法によって増幅された、核酸のような増幅産物を指す。該アンプリコンはいずれのサイズであってもよく、例えば約50ないし約100bp、約100bpないし約200bp、または約200bpないし約1kb、または約500bpないし約5,000bp、または約2,000ないし約20,000bpである。

【0018】

本明細書で用いられる用語「抗体」は、決められた抗原への結合能を有する少なくとも一つのポリペプチドを含み、か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もしくは一部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、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')断片、F(ab')₂断片、Fv断片（すなわち抗体の最小機能モジュール）、単鎖Fvs(scFv)、ジスルフィド安定化Fvs(dsFv)、Fd、VH、VL、Vα、Vβ、およ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）、細胞内抗体、ならびに上記のいずれかのエピトープ結合性断片が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0019】

本明細書で用いられる用語「含んでなる」、または「含む」は、一般的に許容される特許実務に従い、「からなる」も開示する。

30

【0020】

本明細書で用いられる用語「ディープシーケンシング」は、典型的には関心のある領域の複数個のコピーによって関心のある領域を複数回読み取る、配列決定の方法を指す。関心のある領域にわたる個別の配列の読み取り数は「深度」として知られる。例えば1,000分子を別々に配列決定した場合の深度は1,000であり、「1,000倍」または「1,000×」とも表現され得る。本発明によれば、深度は約2ないし約数10億の範囲、例えば約10ないし約100万、約10ないし約1,000万、約100ないし約10万、または約1,000ないし約100万であってよい。深度は約2よりも大きく、約10よりも大きく、約100よりも大きく、約1,000よりも大きく、約1万よりも大きく、約10万よりも大きく、約100万よりも大きく、約1,000万よりも大きく、約1億よりも大きく、約10億よりも大きくてよい。典型的なディープシーケンシングプロトコルによれば、核酸（例えばDNA断片）を反応プラットフォーム（例えばフローセル、マイクロアレイ）の表面に付着させる。付着したDNA分子はin situで増幅され、検出可能な標識（例えば蛍光可逆化ターミネーターデオキシリボヌクレオチド）を用いた合成シーケンシング（すなわち合成による配列決定）のための鋳型として用いられる。代表的な可逆化ターミネーターデオキシリボヌクレオチドとしては、それぞれが別々に認識可能かつ除去可能なフルオロフォアで標識され、リンカーを通して任意に付着させた、アデニン、シトシン、グアニン、およびチミンの3'-O-アジドメチル-2'-デオキシヌクレオシド三リン酸を挙げることができる。蛍光タグを用いる際には、取り込みの各サイクルの後に、取り込まれた塩基の同一性が、フルオロフォアの励起（例えばレー

40

50

ザーにより誘導される励起)および増幅により得られた固定化された二重鎖核酸の画像処理によって決定され得る。フルオロフォア、および任意にリンカーは、当該技術分野において公知の方法によって除去されてよく、これによって3'水酸基は、次のヌクレオチド付加サイクルへと利用可能になる。用語「ディープシーケンシング」に含まれる代表的な技術としては、大量平行シグネチャーシーケンシング(MPSS)、合成によるシーケンシング(SBS)、454 Life Sciences社のSBSピロシーケンス法、ライゲーション系によるApplied Biosystems社のSOLIDシーケンシング、およびHelicos Biosciences社の1分子合成プラットフォームが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態によれば、ディープシーケンシングは基本的に欧州特許第2341151号に規定される方法によって行われ、該方法はピロリン酸配列決定技術と組み合わせた2段階のPCR技術を含む。

10

【0021】

本明細書で用いられる用語「誘発する」は、免疫応答活性に対する特異的な制御または影響を指し、これには免疫応答を活性化すること、免疫応答を増大させること、免疫応答を増強すること、または免疫応答を変化させること(すなわちある型の免疫応答を誘発することで、被験者において優勢な免疫応答の型が有害または無効な型から有益または保護的な型へと変化すること)が挙げられる。

【0022】

本明細書で用いられる用語「env遺伝子」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指す。関連する用語「Envポリペプチド」または「エンベロープポリペプチド」はHIVエンベロープタンパク質に由来する分子を指す。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。宿主細胞にウイルスが感染している間、gp160は宿主細胞プロテアーゼによってgp120と内在性膜タンパク質であるgp41とに切断される。

20

【0023】

本明細書で用いられる用語「断片」は、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に特有の部分であって、その長さが親配列よりも短い部分を指す。同様に、用語「断片」は、最長が規定のペプチド配列の全長から1アミノ酸残基を差し引いた長さである、本発明のHIV-1エンベロープポリペプチド、およびそれをコードするヌクレオチド配列を指す。例えば断片は、5ないし2500の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸残基を含んでよい。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子、またはその他の目的のために用いられる断片は、長さが少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250、500、もしくは少なくとも700の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸残基であってよい。断片は、分子の特定の領域から優先的に選択されてよい。例えばポリペプチド断片は、特定の規定配列に示されたポリペプチドの最初の250もしくは500アミノ酸(または最初の25パーセントもしくは50パーセント)から選択された、特定の長さの連続するアミノ酸を含んでよい。このような長さは明らかに代表的なものであり、配列リスト、表、および図面を含む明細書によって支持されているどのような長さも、本実施形態に包含され得る。

30

【0024】

本明細書で用いられる用語「gp120ポリペプチド」は、Envポリペプチドのgp120領域に由来する分子である。成熟gp120野生型ポリペプチドは、その一次配列に約500アミノ酸を有する。Gp120は重度にN-グリコシル化されているため、見かけ上の分子量は120kDとなる。gp120のアミノ酸配列はおおよそ511アミノ酸である。Gp120は、5個の変域ドメイン(V1-V5)が挿入された、5個の比較的保存されたドメイン(C1-C5)を含む。変域ドメインは、アミノ酸の置換、挿入、および欠失を多数含む。「gp120ポリペプチド」には単一サブユニットおよび多量体の両方が含まれる。gp41部分はウイルス粒子の二重膜に固定されて(かつ二重膜に広がって)いるが、gp120部分は周囲の環境内へ突出している。gp120の受容体結合ドメインは、タンパク質のN-末端側に局在する。この後には、受容体を融合機構へ結

40

50

合させるヒンジまたはきっかけとして作用することが提唱されているプロリンリッチ領域（P R R）が続く。g p 1 2 0のC - 末端は高度に保存され、g p 4 1と相互作用している。野生型g p 1 6 0ポリペプチドの代表的な配列が入手可能である。G e n B a n k 受託番号A A W 6 4 2 6 1（配列番号1に示すポリヌクレオチドによりコードされたもの）、A A B 0 5 6 0 4、およびA A D 1 2 1 4 2を参照されたい。

【0025】

本明細書で用いられる用語「H I V」には、H I V - 1およびH I V - 2ならびにS I Vが含まれる。「H I V - 1」は、1型ヒト免疫不全ウイルスを意味する。H I V - 1には、細胞外ウイルス粒子およびH I V - 1感染細胞に関連するH I V - 1の形態が含まれるが、これらに限定されない。H I V - 1ウイルスは、既知の主要な亜型（クラスA、B、C、D、E、F、G、およびH）のいずれか、または実験室内の系統や初代分離株が含まれる分類外の亜型（O群）を意味してよい。「H I V - 2」は、2型ヒト免疫不全ウイルスを意味する。H I V - 2には、細胞外ウイルス粒子およびH I V - 2感染細胞に関連するH I V - 2の形態が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で用いられる用語「S I V」は、サル、チンパンジー、およびその他の非ヒト霊長類に感染するH I V様ウイルスである、サル免疫不全ウイルスを指す。S I Vには、細胞外ウイルス粒子およびS I V感染細胞に関連するS I Vの形態が含まれるが、これらに限定されない。

【0026】

本明細書で用いられる用語「免疫原」は、個体に適応免疫応答を誘導可能な要素の物質を意味することが意図され、ここで前記適応免疫応答は、該免疫原と免疫学的特色を共有する病原性物質に有意に関連した免疫応答を誘導可能である。

【0027】

本明細書で用いられる用語「免疫原性組成物」は、特定の免疫原に対する抗体または細胞を介した免疫応答を発生させる免疫応答を誘発する組成物を指す。注射用組成物は、例えば溶液、懸濁液、およびエマルションとして調製されてよい。用語「抗原性組成物」は、ホストの免疫系によって認識され得る組成物を指す。例えば抗原性の組成物は、ホストの免疫系の液性（例えば抗体）および/または細胞性（例えばTリンパ球）成分によって認識可能なエピトープを含む。

【0028】

本明細書で用いられる用語「ライブラリー」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、ポリヌクレオチドの混合物の多様なコレクションを指す。本発明の方法において使用するライブラリーの大きさおよび複雑さは様々であり得る。例えば本発明の方法は、500,000までの異なるメンバーを含むライブラリー、または 1×10^6 、 1×10^8 、もしくはそれ以上のメンバーを含むライブラリーをスクリーニングするために用いることができる。典型的なウイルスライブラリーは、 1×10^8 ないし 1×10^{13} のメンバーを含み、このようなライブラリーは本発明の方法を用いたスクリーニングが可能である。実際にこのようなライブラリーは好ましいが、該方法は、さらに小さなライブラリー（例えば1,000ないし50,000、50ないし1,000、または100ないし500、または10ないし100、または5ないし100のメンバーを含むライブラリー）をスクリーニングするためにも使用可能なことが明らかである。変異体ライブラリーには、変異体をコードする遺伝子に、DNAトリプレットのレベルで変異を誘発すること、例えば個々のコドンが多様化させること（例えばPCR反応において部分的な無作為化配列のプライマーを用いることにより）によって多様性をもたせることができる。

【0029】

本明細書で用いられる用語「中和抗体」は、病原体に結合し、病原体の細胞への感染もしくは被験体に疾病を引き起こす能力を妨げるいずれかの抗体またはその抗原結合性断片である。典型的に、本発明の方法で用いられる中和抗体は病原体の表面に結合して、病原体の感染を、一つまたは複数の前記抗体の不在または陰性コントロールの存在下における病原体の感染に比較して、少なくとも99%、95%、90%、85%、80%、75%

10

20

30

40

50

、70%、60%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、または10%阻害するかもしれない。次に、nAbが中和活性またはBNAb活性を有するか否かについて、本明細書に記載するいずれかの方法を用いて試験することができる。中和抗体またはBNAbがヒト以外の動物から産生された場合には、CDRを非ヒトフレーム構造からヒトフレーム構造へ移行させて、ヒトへの投与に適した抗体を産生可能である。抗体がnAbであるか否かを決定するための方法は、当該技術分野において記述されている。Li M, et al., J. Virol. 2005; 79: 10108 - 10125、Wei X, et al., Nature 2003; 422: 307 - 312、およびMontefiori D, Curr. Protoc. Immunol. 2005; Jan, Chapter 12: Unit 12.11を参照されたい。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性の細胞株を用いてウイルスを1回感染させた後に、レポーター遺伝子の発現の減少を判定することに基づく。

10

【0030】

用語「中和抗体」には、BNAbのサブクラスが含まれる。本明細書で用いられる「広域中和抗体」または「BNAb」は、いずれかの方法で得た抗体であって、有効量を送達した際、7株を超えるHIV、好ましくは8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれを超える株のHIVに対して、HIV感染またはAIDSの予防もしくは治療のための薬として使用可能な抗体であることが理解される。

【0031】

20

本明細書で用いられる用語（中和抗体またはその誘導体へ）「特異的に結合する」は、結合ペア（例えば2種のタンパク質または化合物）の間の相互作用を指す。幾つかの実施形態によれば、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」との表現は、一つの化合物の他への特異的な結合を指し、ここでいずれかの標準的なアッセイ（例えば免疫アッセイ）によって測定された結合のレベルは、アッセイのためのバックグラウンドコントロールよりも統計的に有意に大きい。

【0032】

本明細書で用いられる用語「HIV p24」は、約24,000ダルトンの、見かけ上の相対的分子量を有することで特徴付けられる、HIVのgag領域の遺伝子産物を指す。用語「HIV p24」はまた、p24の免疫活性を有する、p24の改変物および断片も指す。

30

【0033】

本明細書で用いられる用語「機能的に連結する」は、関心のあるポリヌクレオチドに対する、プロモーター配列の機能的関係および配置を指す（例えばプロモーターまたはエンハンサーは、これがコード配列の転写に影響する場合、該配列へ機能的に連結する）。一般に、機能的に連結したプロモーターは関心のある配列に隣接する。しかしながらエンハンサーは、関心のある配列の発現を制御するためには、それに隣接している必要はない。

【0034】

本明細書で互換的に用いられる用語「薬剂的に許容される担体」、「薬剂的に許容される希釈剤」、「薬剂的に許容される賦形剤」、および「薬剂的に許容されるビヒクル」は、無毒の固体、半固体、または液体の注入剤、希釈剤、カプセル用材料、もしくは従来のいずれかの製剤補助剤を指す。薬剂的に許容される担体は、レシipientに対して用いられる投与量および濃度においては本質的に無毒であり、製剤のその他の成分に適合性である。例えば、酸化剤およびポリペプチドに対して有害であることが知られるその他の化合物は、通常ポリペプチドを含む製剤のための担体には含まれない。適切な担体としては、水、デキストロース、グリセロール、生理食塩水、エタノール、およびそ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。担体には、製剤の有効性を増強する、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、または補助剤のような追加の薬剤を含有させることができる。補助剤は例えば、 $AlK(SO_4)_2$ 、 $AlNa(SO_4)_2$ 、 $AlNH_4(SO_4)$

40

50

)、シリカ、ミョウバン、 $Al(OH)_3$ 、 $Ca_3(PO_4)_2$ 、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-nor-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(CGP 11687、nor-MDPとも称される)、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とも称される)、2%スクアレン/Tween-80(登録商標)エマルジョン中のRIBI(MPL+TDM+CWS)、リピドAを含む、リポ多糖およびその様々な誘導体、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント、メルクアジュバント65、ポリヌクレオチド(例えばポリICおよびポリAU酸)、マイコバクテリウム属、結核菌由来のワックスD、コリネバクテリウム・パルバム、百日咳菌、およびブルセラ属のファミリーに見出される物質、Titerna、ISCOMS、Quil A、ALUN、リピドA誘導体、コレラ毒素誘導体、HSP誘導体、LPS誘導体、合成ペプチド基質すなわち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、ならびにGM-CSFからなる群より選択される。Hunter R, 米国特許第5,554,372号、およびJager Eら、国際公開第1997028816号を参照されたい。

10

【0035】

本明細書で用いられる用語「ポリヌクレオチド」は、単量体の変数によって形成されるポリマーを指し、ここで該単量体は、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの両方を包含するヌクレオチドである。ポリヌクレオチドとしては、メチル化によって修飾された単量体および修飾されていない単量体が挙げられる。本発明において、用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」は互換的に用いられ、この用語にはmRNA、cDNA、および組換えポリヌクレオチドが包含される。本発明で用いられるポリヌクレオチドは天然のポリヌクレオチドに限定されず、非天然のヌクレオチド類似体を含むポリヌクレオチドおよびヌクレオチド間結合も包含される。

20

【0036】

本明細書で用いられる用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、いずれかの長さのアミノ酸の鎖を指し、ここでは異なるアミノ酸が互いにペプチド結合またはジスルフィド橋によって結合している。

30

【0037】

本明細書で用いられる用語「予防する」、「予防している」、および「予防」は、被験体における疾病の、開始の阻害または出現の減少を指す。予防は完全なものであるか(例えば被験体内における病的細胞の完全な不在)、または部分的であってもよい。予防はまた、病態への感受性の低下も指す。

【0038】

本明細書で用いられる用語「レトロウイルス」は、遺伝物質が一本鎖RNAであり、ホスト内でウイルス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分類を指す。本明細書で意図されるレトロウイルスは、詳細にはレトロウイルス科のファミリーに属し、さらに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する。本明細書で意図されるレトロウイルスは、病原性のものであってよい。Env配列は、限定はされないが、HIV、MuLV、SMRV、SFV、HPV、MMTV、SRV類、HTLV-I、HTLV-II、BLV、BIV、SIV、ビスナウイルス、EIAV、FIV、およびEIAVを含むいずれかの既知のレトロウイルス、ならびにいずれか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)由来であってよい。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られ、利用可能である。

40

【0039】

本明細書で用いられる用語「治療する」または「治療」は、疾病の臨床徴候が現れた後

50

で、該疾病の進行を制御するために、本発明の化合物もしくは組成物、またはそれを含む薬剤を投与することを指す。疾病の進行の制御は、有益な、または望ましい臨床的結果を意味するものとして理解され、限定はされないが、症状の減少、疾病期間の短縮、病的状態の安定化（具体的にはさらなる悪化の回避）、疾病の進行の遅延、病的状態の改善および寛解（部分的または全体的の両方における）が挙げられる。疾病の進行の制御は、治療を適用しなかった場合に予想される生存時間に比較した生存時間の延長にも関与する。

【0040】

本明細書で用いられる用語「ワクチン」は、霊長類、特にヒトであってよい宿主へ *in vivo* 投与して、疾病、特にウイルス性の疾病から保護するための免疫原性組成物を指す。

10

【0041】

本明細書で用いられる用語「ウイルス」は、生物の生細胞の内部でのみ複製できる、小さな感染病原体を指す。本発明の方法で使用され得るウイルスファミリーの例としては、アデノウイルス科、アフリカブタ熱様ウイルス、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、バキュロウイルス科、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、ボックスウイルス科、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が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0042】

2. HIV 中和抗体の同定方法

第1の態様によれば、本発明はあるポリペプチドに対する中和抗体を誘発可能な免疫原を同定するための方法に関し、該方法は、

(i) 前記ポリペプチドに特異的な中和抗体と、組換えウイルスのライブラリーとを接触させる工程であって、当該組換えウイルスは、それぞれ前記ポリペプチドの変異体をコードする無作為の遺伝子を含んでなり、かつ前記ポリペプチドを発現するものである工程と、

(ii) 前記中和抗体への結合能に基づいて、前記中和抗体に結合する組換えウイルスライブラリーメンバーを、結合しないメンバーから分離する工程と、そして

30

(iii) 工程(ii)において選択された組換えウイルスライブラリーメンバーに見出される変異ポリペプチドの配列をディープシーケンシングによって決定する工程とを少なくとも含んでなる。

【0043】

A. 接触工程

第1の工程によれば、本発明の方法は、前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と組換えウイルスのライブラリーとを接触させることに関与し、ここで前記組換えウイルスはそれぞれがウイルスの表面に提示される前記ポリペプチドの変異体をコードする無作為の遺伝子を含む。

【0044】

本明細書で分子のライブラリーが参照される場合、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たタンパク質の発現が起こる前および後）におけるこのようなライブラリーを指すものとして使用できる。しかしながらこのような発現ライブラリーは、結合パートナーとの相互作用の発生を選択するため、明らかにタンパク質レベルでなければならない。このように、接触工程(i)を成功させるためには、ライブラリーはタンパク質レベルで存在する必要がある（しかしながら、ライブラリーは最初に核酸レベルで存在し得る）。

40

【0045】

好ましい実施形態によれば、工程(i)において用いられる中和抗体に対するポリペプチドはウイルスにおいて発現される。好ましい実施形態によれば、ポリペプチドは「ウイ

50

ルスの表面上に」提示される。本明細書で用いられる際、この用語は、ウイルス構造を破壊を必要とせずに抗体のような試薬に接触可能な、いずれかのポリペプチドを指す。表面に提示されるポリペプチドは、非エンベロープウイルスについてはカプシドポリペプチド、またエンベロープウイルスについてはエンベロープポリペプチドであってよいことが理解されるであろう。好ましい実施形態によれば、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プポリペプチドである。

【0046】

いずれのウイルスエンベロープタンパク質も、組換えウイルスライブラリーを得るために改変されていてよく、ここで前記組換えウイルスはそれぞれ前記ポリペプチドの変異体をコードする無作為の遺伝子を含む。抗原の実例としては、以下に挙げるものから選択される：インフルエンザウイルスヘマグルチニンヒト呼吸器合胞体ウイルスG糖タンパク質、デング熱ウイルスのコアタンパク質、基質タンパク質、またはその他のタンパク質、麻疹ウイルスヘマグルチニン、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のエンベロープ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、ストレプトコッカス24Mエピトープ、淋菌ピリン(gonococcal pilin)、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・ヒオディセンテリア保護抗原、ウシウイルス性下痢糖タンパク質55、ニューカッスル病ウイルスヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ、ブタインフルエンザヘマグルチニン、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、アフリカブタ熱ウイルス、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ、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、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、プンタトロウイルス、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れらの断片もしくは誘導体、ウマインフルエンザウイルスA型/アラスカ91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63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81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、ウシ呼吸器合胞体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、ウシ呼吸器合胞体ウイルス付着タンパク質(BRSVG)、ウシ呼吸器合胞体ウイルス融合タンパク質(BRSVF)、ウシ呼吸器合胞体ウイルスヌクレオカプシドタンパク質(BRSVN)、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型ヘマグルチニンノイラミニダーゼ、ならびにウシウイルス性下痢ウイルス糖タンパク質48および糖タンパク質53。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。

【0047】

本明細書で特に意図するものは動物に感染するレトロウイルス、好ましくは温血動物のレトロウイルス、さらに好ましくは脊椎動物のレトロウイルス、なお好ましくは哺乳類のレトロウイルス、さらになお好ましくは霊長類のレトロウイルス、最も好ましくはヒトのレトロウイルスである。本明細書では、限定はされないがHIV-1、HIV-2、HTLV-1、およびHTLV-2を含むヒトレトロウイルスが特に好ましい。HIV(およびその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。十分に特徴付けられたHIV-1クローンとしては、HXC B2、HIV-1-MN、およびHIV-1-MN-ST.1が挙げられる。Hall L, et al., J. Virol. 1992; 6

10

20

30

40

50

6 (9) : 5 5 5 3 - 5 5 6 0 を参照されたい。

【 0 0 4 8 】

好ましい実施形態によれば、組換えウイルスのライブラリーは、少なくとも一つのポリペプチドの無作為化から得られた H I V ウイルスのライブラリーである。さらになお好ましい実施形態によれば、H I V ライブラリーの異なるメンバーは e n v 遺伝子における無作為化である。

【 0 0 4 9 】

e n v 遺伝子の無作為化は、e n v 遺伝子の完全な配列にわたって行われてよいが、または標的細胞上の受容体と相互作用し、かつ中和抗体への結合の最良の候補を構成する分子が g p 1 2 0 であることから、好ましくは g p 1 2 0 のコード領域に対応する e n v 遺伝子の部分にわたって行われてもよい。さらに、g p 1 2 0 をコードする e n v 遺伝子の領域の無作為化は完全な配列にわたって行われてよいが、または g p 1 2 0 ポリペプチドの 1 以上のドメインに向けて行われてもよい。このように、本発明の R I S 法は、g p 1 2 0 の保存されたループ (C 1 ないし C 5) のいずれかにおける、g p 1 2 0 の可変ループ (V 1 - V 5) のいずれかにおける、または保存領域と可変ループとの好ましい組み合わせにおける無作為化によって得られた H I V ライブラリーの使用を企図する。好ましい実施形態によれば、無作為化は e n v 遺伝子全体にわたって行われる。別の実施形態によれば、無作為化は e n v 遺伝子の g p 1 2 0 に相当する領域において行われる。別の実施形態によれば、無作為化は e n v 遺伝子の g p 1 2 0 の V 1 または V 2 領域に相当する領域において行われる。

【 0 0 5 0 】

核酸分子内に変異を導入するためには、どのような変異誘発技術も用いることができる。Sambrook J, et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US, 1989)、Bishop T, et al., "Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach" (IRL Press, Oxford, GB, 1987)、Reznikoff W, Ed., "Maximizing Gene Expression" (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, US, 1987)、Davis L, et al., "Basic Methods in Molecular Biology" (Elsevier Science Publishing Co., New York, NY, US, 1986)、Schleef M, Ed., "Plasmid for Therapy and Vaccination" (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE 2001)、Adereth Y, et al., Biotechniques 2005, 38: 864 - 868、Allan J, et al., Biotechniques 1995; 18: 746 - 750、Bubeck A, et al., J. Virol. 2004, 78: 8026 - 8035、Doran B, 米国特許出願公開第 20070111201 号、Locher C, et al., DNA Cell Biol. 2005; 24: 256 - 263、Vasl J, et al., Biotechniques 2004; 37: 726 - 730、Weiss G, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 8950 - 8954、および Delcourt M, 米国特許第 6,924,112 号を参照されたい。変異誘発の戦略としては、ランダム変異誘発、Ala - スキャニング変異誘発、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、商業的に広く利用可能である。

【 0 0 5 1 】

本発明の R I S 法における使用に適した中和抗体としては、膜近接外部領域 (m e m b r a n e - p r o x i m a l e x t e r n a l r e g i o n : M P E R) に対する抗体、C D 4 結合部位に対する抗体、および高マンノースグリカンに対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よれば、本発明のRIS法における使用のための中和抗体としては、

a) ウイルス膜に隣接するgp41外部ドメインの部分を認識する4E10抗体、Cardoso R, et al., Immunity 2005; 22: 163-173、PHSL受託番号90.091703、NIH ARRRPカタログ番号10091、およびKatinger Hら、米国特許第5,753,503号を参照されたい、

b) ウイルス膜に隣接するgp41外部ドメインの部分を認識する2F5抗体、Ofek G, et al., J. Virol. 2004; 78: 10724-10737、PHSL受託番号90.091704、NIH ARRRPカタログ番号1475、および上記のKatingerを参照されたい、

c) 欧州特許第0822941に記載される、HIV-1の二つの異なる抗原決定基に結合する抗体であって、該抗原決定基がgp160の断片であり、HIV-1分離株BH10の処理されたgp120のアミノ酸配列79ないし184および326ないし400に対応する抗体、PHSL受託番号95032240および95032241を参照されたい、

d) gp120の外表面の炭水化物を認識する2G12 (mAb 2G12)、Trkola A, et al., J. Virol. 1996; 70: 1100-1108、EACC受託番号93091517、およびNIH ARRRPカタログ番号1476を参照されたい、

e) CD4結合部位を認識するb12抗体、Burton D, et al., Science 1994; 266: 1024-1027、NIH ARRRPカタログ番号2640、およびBurton Dら、欧州特許第0675904号を参照されたい、および

f) 中和抗体PG9、PG16、PG20、PGG14、およびPGC14、国際公開第2010107939を参照されたい、
からなる群より選択される1以上の抗体が挙げられる。

【0052】

抗体がnAbであるか否かを判定するための方法は、当該技術分野において記載されている。これらの方法の幾つかでは、受容性の細胞株を用いてレポーター遺伝子をコードするウイルスを1回感染させた後に、レポーター遺伝子の発現の減少によって、抗体の効果を判定することに基づく。Li, 2005, Wei, 2003, 上記のMontefiori, 2005、およびAlvin C、国際公開第2009117661号を参照されたい。

【0053】

本発明による使用のための抗体の中和能は、IC50（すなわち、標的細胞の感染を50%減少させる抗体の濃度）によって特徴付けられてよい。好ましくは、本発明による使用のための中和抗体のIC50は2μg/mL以下（0.15μg/mL未満、0.125μg/mL未満、0.10μg/mL未満、0.075μg/mL未満、0.05μg/mL未満、0.025μg/mL未満、0.02μg/mL未満、0.015μg/mL未満、0.0125μg/mL未満、0.01μg/mL未満、0.0075μg/mL未満、0.005μg/mL未満、または0.004μg/mL未満であってよい（抗体濃度は10⁻⁸以下、好ましくは10⁻⁹M以下、好ましくは10⁻¹⁰M以下、すなわち10⁻¹¹M、10⁻¹²M、10⁻¹³M以下）。このことは、in vitroでHIVの臨床分離株を50パーセント中和するために必要とされる抗体の濃度は非常に低いことを意味している。効力は、当該技術分野における標準的な中和アッセイを用いて測定できる。

【0054】

接触工程は、中和抗体へ特異的に結合できる組換えウイルスのライブラリーメンバーが、実際に前記抗体へ結合するために十分な条件下で行われる。

【0055】

10

20

30

40

50

接触工程の間の条件は、当業者により日常の方法を用いて決定可能である。代表的な「接触」条件は、15分間ないし4時間（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んでよい。しかしながら、これらは例えば相互作用する結合パートナーの性質によって適切に変化し得る。試料は、任意にかつ好ましく、穏やかな振盪、混合、または回転に供されてよい。加えて、例えば非特異的結合を減少させるブロッキング剤のような、その他の適切な試薬が添加されてもよい。例えば1～4パーセントBSAまたはその他の適したブロッキング剤（例えばミルク）が用いられてよい。しかしながら、接触工程は様々であり、スクリーニング法の目的に従って当業者により適合させてよいことが理解されるであろう。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、これは、このような条件下における安定な結合を同定する可能性を高めるであろう（例えば37におけるインキュベーションの場合、結合はヒト体内における条件下で安定なものである）。このような性質は、一つまたは両方の結合パートナーがある種の治療応用（例えば抗体）の候補であった場合、非常に有利であり得る。このような適合は、当業者の範囲内にある。

10

【0056】

好ましい実施形態によれば、接触工程において用いられる中和抗体は、特許および科学文献中に十分に記載されている当業者に公知の様々な技術を用いて、固相支持体上に固定化されてよい。固相支持体は、抗体が付着し得る、当業者に公知のどのような材料であってもよい。例えば固相支持体は、マイクロタイタープレートもしくはニトロセルロースフィルター、またはその他の適切な膜において十分に試験されてよい。あるいは、支持体はビーズまたはディスク、例えばガラス、グラスファイバー、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もよい。支持体は磁性粒子または光ファイバーセンサーであってもよい。Jorgenson Rら、米国特許第5,359,681号を参照されたい。

20

【0057】

抗体は、特許および科学文献中に十分に記載されている当業者に公知の様々な技術を用いて、固相支持体上に固定化されてよい。本発明との関連では、固定化には吸着のような非共有結合性の会合および共有結合（抗原と支持体上の官能基の間の直接の結合であってよいか、または架橋剤による結合であってもよい）の両方が含まれる。吸着による固定化は、マイクロタイタープレート内のウェルに対するか、または膜に対するものであることが好ましい。このような場合に、吸着は、適切な緩衝液中の抗体と固相支持体を適切な時間接触させることによって達成され得る。接触時間は温度に依存して変動し得るが、典型的には約1時間から1日の間である。一実施形態によれば、プラスチックマイクロタイタープレートのウェル（例えばポリスチレンまたはポリ塩化ビニル）と、約10ngないし約1μg、好ましくは約100～200ngの範囲の量の抗体とを接触させることが、適切な量のポリペプチドを固定化するためには十分である。

30

【0058】

抗体の固相支持体への共有結合は、最初に支持体と、支持体と抗体上のヒドロキシルまたはアミノ基のような官能基との両方に反応する二官能性試薬とを反応させることによって達成され得る。例えば抗体は、公知の技術を用いて、ベンゾキノンを用いた適切なポリマー塗膜を有する支持体に対し、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を縮合させることにより、共有結合性に付着し得る。

40

【0059】

抗体が支持体へ非共有結合性に付着する好ましい実施形態によれば、抗体は該抗体のFc領域に特異的な抗体を用いて固定化されるのではない。

【0060】

B. 分離工程

第2の工程によれば、本発明の改良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ライブラリーメンバーを、結合しないメンバーから分離することを含む。

50

【 0 0 6 1 】

前記分離工程は、反応混合物からの固相の物理的な分離（例えばビーズまたは F A C S による）もしくは除去を指してよいが、または反応混合物のその他の成分を除去するために固相が 1 以上の洗浄工程に供される工程を指してもよい。固相の物理的な分離または除去が行われる実施形態によれば、好ましくは該固相は次に 1 以上の洗浄工程にも供される。

【 0 0 6 2 】

洗浄工程は、固相およびそれに付着する相互結合パートナーの性質に応じた、適切ないずれかのやり方によって行われてよい。粒子状固相を洗浄するための適切な方法は当業者に公知である。例えば固相が粒子状である場合、洗浄工程は、粒子がペレットを形成し、上清を除去するような条件下で、粒子を遠心分離することにより行われてよい。次に、粒子は適切な水性培地（例えば接触工程において用いたものと同じ培地）中に再懸濁されてよい。洗浄のストリンジェンシーは（または実際に接触工程は）、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、当業者に公知の適切な試薬（例えば T w e e n ）を加えることによって改変してもよい。このようなペレット化および懸濁の工程は 1 回の洗浄を構成し得る。いずれかの適切な回数の洗浄を行ってよい。しかしながら固相が磁性であった場合には、洗浄工程は、接触工程を行った容器へ磁場を適用し、上清を除去した後、固相を適切な水性培地に再懸濁することによって好都合に行うことができる。このような磁気による分離および再懸濁の工程は 1 回の洗浄工程を構成してよく、いずれかの適切な回数の洗浄を行ってよい。固相支持体が粒子状ではない場合（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の表面である場合）、再び、このような固相を洗浄するための適切な方法は当業者に公知である。

【 0 0 6 3 】

上記の任意の洗浄工程と同様に、1 以上の洗浄工程も、R I S 法におけるいずれかのその他の適切な段階において行われてよいことが理解されなければならない。例えば固相を洗浄するための 1 以上の工程は、例えば固相に結合しない中和抗体を除去するため、いずれかの固定化工程を行った後でも行われ得る。実際に、このような洗浄工程は好ましいものである。また 1 以上の洗浄工程は、例えば結合しなかった物質を除去するため、該方法を行う間のその他の適切な時に、固相に対して行われてもよい。必要な洗浄回数は、当業者によって容易に決定可能である。

【 0 0 6 4 】

中和抗体へ弱く、または非特異的に結合した反応混合物の成分がいったん除去されると、中和抗体へ特異的に結合した組換えウイルスのライブラリーメンバーを溶出することにより、最終的に分離工程が行われる。固定化の種類に応じて、前記溶出工程は、例えば非共有結合を破壊するアルカリ、界面活性剤、または類似の薬剤を用い、その後中和することで相互作用のパートナーをリフォールディングして互いに結合させる方法のような、いずれかの適切な方法によって行われてよい。ピオチンタグの場合、一般的にこのようなタグを含むライブラリーコンストラクトは、切断のためのある種の部位、例えばプロテアーゼ部位、制限酵素部位、またはジチオスレイトール（D T T）によって開裂し得る S - S リンカー成分を含むように改変される。T E A もまた用いられてよい。上記のような切断部位は、溶出を可能にするかまたは促進するため、どのような種類のタグにも用いることができる。

【 0 0 6 5 】

溶出工程の結果としての、中和抗体からのウイルスの放出は、典型的には上清中に存在する 1 以上のウイルスポリペプチドを測定することによって行うことができる。好ましい実施形態によれば、測定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 H I V ライブラリーが用いられる場合、本明細書に示す実施形態での使用に適し得る H I V タンパク質の例としては、H I V g a g タンパク質 p 5 3、p 2 4、p 1 7、p 7、p 6、p 2、および p 1、H I V e n v 糖タンパク質 g p 1 2 0、g p 4 1、および g p 1 6 0、H I V 酵素であるインテグラーゼ（p 3 1）、逆転写酵素（p 5 1 または p

10

20

30

40

50

66)、RNase H (p15)、およびプロテアーゼ (p10)、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)、および HIV tat タンパク質 (p16 / p14) 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よれば、選択されたウイルスが中和抗体から有効に溶出されたか否かを決定するために測定される HIV ポリペプチドは p24 である。

【0066】

P24 は酵素免疫測定法により測定可能であるが、結合した p24 の検出には、複合体を分離させるための酸による前処置が必要である。製造者によって手順は様々であるが、HIV p24 抗原の試験は、抗体ではなく抗原を検出するために改変された ELISA 技術を用いる。「抗体サンドイッチ」型のような代表的なアッセイでは、固相 (マイクロタイタープレートのウェルまたはポリスチレンビーズ) に付着させた HIV p24 に対する特異的なモノクローナル抗体が、添加した試料中のウイルス抗原を「捕捉」するために作用する。ウイルス粒子を破壊するために界面活性剤 (例えば Triton X100) が添加され、培地中に抗原が存在する場合には、該抗原は固相上のモノクローナル抗体に付着し得る。

C. 検出工程

第3の工程によれば、本発明の改良 RIS 法は、工程 (ii) において選択されたライブラリーメンバーにおけるウイルスの表面上に示された変異ペプチドまたはペプチドの配列を、ディープシーケンシングによって決定することを含む。

【0067】

本発明の方法によって、相互作用するウイルスライブラリーメンバーの1以上のセットがいったん選択または分離されると、これらはさらなる分析に供される。前記のさらなる分析または使用は、一般に、結合パートナーの候補を中和抗体から脱離、除去、分離、または溶出した後、さらに発現または産生することを必要とする。このように本発明の方法は、中和抗体と特異的に相互作用可能なウイルスライブラリーの前記メンバーを脱離、除去、溶出、もしくは好ましく分離するか、または前記メンバーを互いに分離して発現もしくは産生する工程をさらに含む。前記のさらなる分析は、一般に、結合したウイルスから RNA を分離し、ウイルス RNA を cDNA に逆転写し、前記 cDNA を適切な発現ベクター内へクローニングすることによって、相互作用するライブラリーメンバーを個別に分離することに関与する。

【0068】

結合パートナーをコードする DNA をいったん適切な発現ベクター内にクローン化した後、結合パートナーをコードする DNA の配列を決定してよいが、または可溶型のタンパク質を発現させて適切な結合試験に供し、候補をタンパク質レベルでさらに特徴付けてもよい。適切な結合試験は結合パートナーの性質に依存してよく、該結合試験としては 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 親和性測定法または結合定数を測定するためのその他の方法、組織スライドまたは細胞の染色、およびその他の免疫組織化学法が挙げられるが、これらに限定されない。このような方法は文献中で十分に確立されており、これらのうちの一つ以上が、選択されたエンベロープタンパク質変異体の分析に用いられてよい。

【0069】

上述のように、相互作用する結合パートナーを個別に分析するために適した方法は、当該技術分野において公知である。好ましい一方法は、中和抗体に特異的に結合するライブラリーのウイルスに由来する遺伝物質の配列を決定することであろう。

【0070】

典型的には、遺伝物質として RNA を有するレトロウイルスの場合、検出工程は、RNA を分離すること、RNA を逆転写して一本鎖 cDNA を得ること、一本鎖 DNA を処理して二重鎖 DNA を得ること、および二重鎖 cDNA を選択したベクター内にクローン化して、該 cDNA の配列を決定することを含む。

10

20

30

40

50

【0071】

逆転写は、当業者に公知の方法を用い、等温にて、かつRNA依存性のDNAポリメラーゼ、例えば限定はされないがAMV、クローン化AMV、MMLV、Superscript II、ReverTraAce、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、細菌の逆転写酵素、またはThermoscript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る。本発明で利用される酵素には、RNase H活性が減少したか、実質的に減少したか、または完全に除去された酵素が包含される。「RNase H活性が実質的に減少した」酵素とは、RNase H活性が、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白血球ウイルス(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RNase H活性の、約20%未満、好ましくは約15%、10%、または5%未満、最も好ましくは約2%未満の酵素を意味する。どのような酵素のRNase H活性も、様々な公知のアッセイによって決定されてよい。Kotewicz M, et al., Nuc l. Acids Res. 1988; 16: 265-277, Gerard G, et al., Focus 1992; 14(5): 91-93、およびKotewicz Mら、米国特許第5,244,797号を参照されたい。本発明での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(ラウス随伴ウイルス)逆転写酵素、MAV(骨髄芽球症随伴ウイルス)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、米国特許第5,244,797号、およびGerard Gら、国際公開第1998047912号を参照されたい。しかしながら当業者は、リボ核酸分子からDNA分子を産生できる(すなわち逆転写酵素活性を有する)どのような酵素も、本発明の組成物、方法、およびキットにおいて同じように用いられてよいことを理解するであろう。

10

20

30

40

50

【0072】

当該技術分野において公知のいずれかの方法を用いて一本鎖cDNAを処理し、二重鎖DNAを得ることができる。好ましくは、一本鎖cDNAから二重鎖DNAへの変換は、in vitroでの増幅技術、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)、転写媒介性増幅(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)、ループ媒介性等温増幅(LAMP)、およびローリングサークル増幅技術(RCAT)、またはその他の酵素によるin vitroでの増幅技術を用いて行うことができる。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うことができる。得られた二重鎖DNAは、精製カラム、プライマーが付着する電磁気ビーズ、またはアガロースゲルを通す電気泳動を用いて精製可能である。

【0073】

得られた二重鎖DNAは次に、選択したベクター内に当該技術分野において公知の方法を用いて挿入されてよい。好ましい実施形態によれば、PCR増幅工程の間に用いるプライマーは、その5'領域に、選択したベクター内に存在する制限エンドヌクレアーゼ標的的部位に適合する末端を作り出す制限エンドヌクレアーゼ標的的部位を含む。エンドヌクレアーゼ標的的部位は、適切なベクター内へのポリヌクレオチドのクローニングのために使用できる粘着末端を生成させる。

【0074】

好ましい実施形態によれば、配列決定は、工程(ii)において選択されたウイルスライブラリーメンバーから得られたcDNAの、選択された領域において行われる。このことは、さらにディープシーケンシングに供されるアンプリコンを得るため、これら選択された領域のさらなる増幅を必要とする。そのため、増幅プライマーはアダプター領域の配列に対応して設計される。増幅プライマーにはさらに、454社のプラットフォームの手順に記載される標準ライブラリー調製手順に従って、アダプター配列が補充される。最終

的なライブラリーの増幅、ライゲーション、および配列決定は、標準的な手順に従って行われる。

【0075】

さらに好ましい実施形態によれば、ポリペプチドの変異体をコードする遺伝子の選択された領域は、配列番号2のポリペプチドの、アミノ酸86～220の配列、アミノ酸426～530の配列、またはアミノ酸529～643の配列を含む。

【0076】

配列決定工程は、化学的配列決定法（マクサム・ギルバート）、サンガージデオキシ配列決定法、ピロシーケンス、蛍光検出配列決定法、およびマスマススペクトロメトリードNA配列決定法のような公知のいずれかの配列決定法を用いて行うことができる。

10

【0077】

工程(i i)にまたは該方法において選択されたウイルス由来のcDNAのディープシーケンシングまたは選択された領域由来のアンプリコンのディープシーケンシングにより、配列決定したDNAのそれぞれのヌクレオチド位置における変異率の同定が可能となる。

【0078】

得られた配列決定データは、配列決定した試料それぞれについて多数の配列を読み取った。データを454/AVAソフトウェアによってさらに処理し、各アンプリコン/試料の組み合わせについて配列データセットを得た。各試料について、これらの配列を、MosaiKハイスループットアライナソフトウェアを用いて参照配列に対してバイオインフォマティクスの整列させ、タンパク質配列に翻訳して、各試料についてアンプリコンサイズのハプロタイプを得、かつウイルス集団内に存在する各ハプロタイプを定量化した。タンパク質ハプロタイプは、Muscleマルチプルアライナソフトウェアを用いて参照のAC10タンパク質配列と共にさらに整列させた。このように、ウイルスライブラリー内の各変異率および各ハプロタイプの存在度を特徴付けた。

20

【0079】

好ましい実施形態によれば、ディープシーケンシング法は、約50%、20%、10%、5%、または2%未満の頻度で出現するハプロタイプを検出し得る。さらに好ましい実施形態によれば、該方法は、約1%、0.5%、0.2%、または0.02%の頻度で出現するハプロタイプを検出し得る。検出感度の典型的な範囲は、約0.01%ないし約100%、約0.01%ないし約50%、約0.01%ないし約10%、例えば約0.1%ないし約5%であってよい。

30

【0080】

3. 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、改良された迅速な免疫原選択(RIS)法は、ウイルス表面に提示されるポリペプチドの変異体であって、中和抗体を産生するための候補であり、かつそれ故に免疫原性組成物またはワクチンとして使用されるポリペプチドの同定を可能にする。このように、別の態様によれば、本発明は本発明の方法によって同定されたポリペプチドに関する。

【0081】

本発明の方法によって選択されたウイルスがレトロウイルスである特定の場合には、該ポリペプチドはエンベロプタンパク質の変異体である。好ましい実施形態によればレトロウイルスはHIVであり、本発明のポリペプチドはgp120変異体である。

40

【0082】

本発明の改良RIS法によって同定されたポリペプチドは、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より選択される領域に少なくとも一つの変異を含む。

【0083】

さらに好ましい実施形態によれば、C1定常領域の変異は、位置87における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、位置87における変異した残基はGluである。

50

さらになお好ましい実施形態によれば、C 1 定常領域の変異は、E 8 7 G 変異である。

【0084】

さらに好ましい実施形態によれば、C 1 定常領域の変異は、位置 8 8 における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、位置 8 8 における変異した残基は A s n である。さらになお好ましい実施形態によれば、C 1 定常領域の変異は、N 8 8 D 変異である。

【0085】

さらに好ましい実施形態によれば、C 1 定常領域の変異は、位置 8 9 における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、位置 8 9 における変異した残基は V a l である。さらになお好ましい実施形態によれば、C 1 定常領域の変異は、V 8 9 L 変異である。

【0086】

10

さらに好ましい実施形態によれば、V 1 可変領域の変異は、位置 1 3 1、1 3 2、1 3 7、および 1 3 8 からなる群より選択される 1 以上の位置における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、V 1 領域の位置 1 3 1、1 3 2、1 3 7、および 1 3 8 における変異した残基はそれぞれ C、T、N、または D である。さらになお好ましい実施形態によれば、V 1 可変領域の変異は、C 1 3 1 Y、T 1 3 2 N、N 1 3 7 D、および / またはまたは D 1 3 8 G である。

【0087】

さらに好ましい実施形態によれば、V 2 可変領域の変異は、位置 1 6 0、1 6 5、および 1 9 1 からなる群より選択される 1 以上の位置における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、V 2 領域の変異した残基は位置 1 6 0 の N、位置 1 6 5 の M、または位置 1 9 1 の N である。さらになお好ましい実施形態によれば、V 2 可変領域の変異は、N 1 6 0 Y、M 1 6 5 Y、および / または N 1 9 1 D である。

20

【0088】

さらに好ましい実施形態によれば、C 2 定常領域の変異は、位置 2 2 5 における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、C 2 領域の位置 2 2 5 における変異した残基は A l a である。さらになお好ましい実施形態によれば、C 2 領域の変異は、A 2 2 5 V である。

【0089】

さらに好ましい実施形態によれば、該変異は、位置 4 7 0 における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、位置 4 7 0 における変異した残基は G l u である。さらになお好ましい実施形態によれば、該変異は E 4 7 0 V である。

30

【0090】

さらに好ましい実施形態によれば、該変異は、位置 5 3 8 における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、位置 5 3 8 における変異した残基は S e r である。さらになお好ましい実施形態によれば、該変異は S 5 3 8 T である。

【0091】

さらに好ましい実施形態によれば、該変異は、位置 5 7 8 における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、位置 5 7 8 における変異した残基は L y s である。さらになお好ましい実施形態によれば、該変異は K 5 7 8 M である。

【0092】

40

さらに好ましい実施形態によれば、該変異は、位置 6 4 7 における変異である。さらに好ましい実施形態によれば、位置 6 4 7 における変異した残基は T y r である。さらになお好ましい実施形態によれば、該変異は Y 6 4 7 N である。

【0093】

さらに好ましい実施形態によれば、本発明の変異体に従った g p 1 2 0 変異体またはその断片は、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、および A 2 2 5 V 変異を有する。

【0094】

さらに好ましい実施形態によれば、本発明の変異体に従った g p 1 2 0 変異体またはその断片は、E 8 7 G および V 8 9 L 変異を有する。

50

【0095】

さらに好ましい実施形態によれば、本発明の変異体に従った g p 1 2 0 変異体またはその断片は、M 1 6 5 L、S 5 3 8 T、および K 5 7 8 M 変異を有する。

【0096】

好ましい実施形態によれば、本発明の免疫原性 g p 1 2 0 変異体またはその断片は、配列番号 2 0 ~ 2 8 からなる群より選択される配列を含む。

【0097】

本明細書で決定した、中和抗体に対する親和性の増大した g p 1 2 0 変異体は、A C 1 0 H I V 分離株 (N C B I 受託番号 A Y 8 3 5 4 4 6 および配列番号 1 に示す e n v 遺伝子) 由来であるが、本発明の免疫原性ポリペプチドは、その他の H I V 分離株の e n v 遺伝子内の対応する位置の置換により、前記のその他の H I V 分離株に由来し得ることが理解されるであろう。その他の H I V 分離株内の対応する位置は、いずれかの適した配列アラインメントアルゴリズムを用いることによって容易に決定できる。

10

【0098】

配列を比較するためのアラインメント法は、当該技術分野において公知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、S m i t h - W a t e r m a n ローカル相同性アルゴリズム、N e e d l e m a n - W u n s c h 相同性アラインメントアルゴリズム、P e a r s o n - L i p m a n 類似性探索法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行、または用手でのアラインメントおよび目視での検査によって実行できる。S m i t h T , W a t e r m a n M , A d v . A p p l . M a t h . 1 9 8 1 ; 2 : 4 8 2 - 4 8 9 ; N e e d l e m a n S , W u n s c h C , J . M o l . B i o l . 1 9 7 0 ; 4 8 : 4 4 3 - 4 5 3 ; P e a r s o n W , L i p m a n D , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1 9 8 8 ; 8 5 : 2 4 4 4 - 2 4 4 8 ; t h e G A P , B E S T F I T , F A S T A a n d T F A S T A p r o g r a m s , W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , M a d i s o n , W I , U S ; A u s u b e l F , e t a l . , E d s . , " S h o r t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y " , 4 t h E d . (J o h n W i l e y a n d S o n s , I n c . , N e w Y o r k , N Y , U S , 2 0 0 2) を参照されたい。

20

【0099】

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コンストラクトに関する。これらのポリヌクレオチドとしては、関心のあ

30

【0100】

る。上記の S a m b r o o k , 1 9 8 9 および A u s u b e l , 2 0 0 2 を参照されたい。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コンストラクトはプラスミドである。しかしながら、その他のベクター (例えばウイルスベクター、ファージ、コスミド) もまた、核酸を複製するために用いてよい。本発明との関連では、典型的な核酸コンストラクトは、挿入した遺伝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、典型的には複製開始点、プロモーター、および形質転換した細胞の表現型の選択を可能にする特定の核酸配列を含む。

40

【0101】

さらに一般的には、本発明の g p 1 2 0 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、宿主細胞へ導入した後の核酸を発現することが可能な、いずれかのプロモーターまたはエンハンサーへ機能的に連結されてよい。プロモーターは、核酸の転写を導く核酸制御配列が並んだものである。プロモーターには、例えばポリメラーゼ I I 型のプロモーターの場合のように、転写開始部位の近傍の (近傍にあってよい) 必要な核酸配列が含まれる (T A T A エlement)。プロモーターには、転写開始部位から数千塩基対離れて位置し得る遠位エンハンサーまたは抑制Elementも含まれ得る。恒常性および誘導性プロモ

50

ーターが含まれる。Bitter G, et al., Meth. Enzymol. 1987; 153: 516-544を参照されたい。

【0102】

このような核酸コンストラクトを産生するために、gp120ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、プラスミド発現ベクターのような適切な発現ベクター内へ挿入される。gp120ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を産生するための手順およびそれらを*in vitro*で操作するための手順は当業者に公知である。上記のSambrook, 1989およびAusubel, 2002を参照されたい。

【0103】

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を挿入可能な発現ベクターとしては、配列の挿入または取り込みが可能となるように操作でき、かつ原核生物または真核生物内に発現できるプラスミド、ウイルス、またはその他の媒体が挙げられるが、これらに限定されない。ホストとしては、微生物、酵母、昆虫、および哺乳類の生物が挙げられる。真核生物またはウイルスの配列を有するDNA配列を原核生物内に発現するための方法は、当該技術分野において公知である。ホストにおける発現および複製が可能な、生物学的に機能性のウイルスおよびプラスミドDNAベクターは、当該技術分野において公知である。

【0104】

組換えDNAによる宿主細胞の形質転換は、当業者に公知の従来技術によって行うことができる。ホストが原核生物、例えば*E. coli*である場合、DNAの取り込みが可能なコンピテント細胞は、指数関数的増殖期後に収集した後にCaCl₂法によって処理した細胞から、当該技術分野において公知の手順を用いて調製できる。あるいは、MgCl₂またはRbClを使用してもよい。所望により、形質転換は宿主細胞のプロトプラスト形成後に行ってもよい、またはエレクトロポレーションによって行ってもよい。

【0105】

ホストが真核生物の場合、このようなDNAのトランスフェクション法としては、リン酸カルシウム共沈殿法、従来の機械的手順、例えば微量注入法、エレクトロポレーション法、リポソームに包まれたプラスミド、またはウイルスベクターの挿入法を用いることができる。真核細胞はまた、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、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子のような選択的表現型をコードする第2の外來性DNA分子とを共形質転換することもできる。別の方法では、サルウイルス40(SV40)またはウシパピローマウイルスのような真核生物に対するウイルスベクターを用いて、真核細胞を一過性に感染させるかまたは形質転換させた後、タンパク質を発現させる。Gluzman Y, Ed., "Eukaryotic Viral Vectors" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US, 1982)を参照されたい。

【0106】

4. 抗体

本発明のgp120変異体およびその断片は、HIVウイルスまたはその粒子が被験体の体液中に存在する場合、これを認識し、かつ中和可能な抗体を産生するために用いることもできる。このように別の態様によれば、本発明は、本発明の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。幾つかの実施形態によれば、抗体はモノクローナル抗体である。その他の実施形態によれば、抗体はV_HおよびV_L領域を含むFv断片である。

【0107】

これらの抗体は、本発明のペプチドを用いる従来法によって産生され得る。Kiebert-Emmons Tら、国際公開第1991004273号を参照されたい。例えばポリクローナル抗体は、上で同定したペプチドの一つかもしくは両方によって、またはそれに対する自然抗体を免疫系に産生させることが可能な多価コンストラクトによって選択した動物の免疫系を従来法で刺激した後、これらの抗体を動物の血液またはその他の体液から回収することによって産生され得る。高力価のポリクローナル抗体は、上記の多価コン

10

20

30

40

50

ストラクトを抗原として用いることによって取得され得る。得られた抗体は、それらが感染被験体の体液中に出現することから、選択されたHIV抗原に結合することが可能である。

【0108】

加えて、本発明のペプチドは、ペプチド配列内に含まれる中和エピトープ構造の内部イメージを有する抗イディオタイプ抗体を産生するための鑄型として用いることのできる抗体の産生にも用いられ得る。ポリクローナルまたはモノクローナルであるこれらの抗体は、次にワクチン製剤または能動免疫療法に用いることができる。従って本発明には、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産生するための方法も含まれる。上記のKiebert-Emmonsを参照されたい。

10

【0109】

モノクローナル抗体(MAb)を取得して、本発明の組成物および方法に使用することが望ましい場合には、入手可能な腫瘍細胞株を用い、公知の従来技術によって望ましいMAbを発現するハイブリドーマ細胞株を産生してもよい。Kohler G, et al., Nature 1975; 256(5517): 495-497を参照されたい。

【0110】

組換え抗体は、それらの産生のための公知の技術を用いて産生され得る。Huse W, et al., Science 1989; 246: 1275-1281を参照されたい。望ましい高力価抗体は、これらの抗原に対して発生させたモノクローナルまたはポリクローナル抗体に対し、公知の組換え技術を応用することによっても産生され得る。Amit R, et al., Science 1986; 233: 747-753, Queen C, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 86: 10029-10033; Riechmann L, et al., Nature 1988; 332: 323-327、およびBarbas C, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89: 4457-4461、ならびにWinter P、英国特許第2188638号を参照されたい。

20

【0111】

5. 中和抗体を産生可能な免疫原性組成物

本明細書に開示されるgp120変異ポリペプチドおよびgp120変異ポリペプチドをコードする核酸分子は、gp120またはgp120を発現するウイルスに対する免疫原として、または免疫応答を誘発する免疫原(免疫原性組成物)を産生するために用いられ、例えばHIV-1感染またはそれに関連する症状を阻止、減少、または制御する。治療上有効な量の開示する治療用組成物を投与した後、被験体はHIV-1感染、HIV-1感染に付随する症状、またはその両方についてモニターされる。このように別の態様によれば、本発明は、本発明のHIV-1 gp120変異ポリペプチドもしくはその免疫原性断片、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、を含む免疫原性組成物に関する。

30

【0112】

免疫原性組成物における使用に適したgp120の適切な免疫原性断片としては、比較的短いペプチド、例えば長さが約5ないし100アミノ酸、例えば約5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、または100アミノ酸であるペプチドが挙げられる。このように、gp120ポリペプチドの断片(例えばエピトープまたはその他の抗原性断片)、例えば本明細書に記載されるいずれかのgp120ポリペプチドまたはその断片が免疫原として用いられてよい。

40

【0113】

本発明の免疫原性組成物は、HIV感染により引き起こされる疾病の治療または予防に有用である。さらなる態様によれば、本発明は、HIV-1の感染によってもたらされる疾病の治療または予防における使用のための本発明のペプチド、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の感染によってもた

50

らされる疾病を治療または予防する薬剤を製造するための、本発明のペプチド、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、H I V - 1 の感染によってもたらされる疾病の被験体を治療または予防するための方法に関し、該方法は、前記被験体へ、本発明のペプチド、核酸、ベクター、または免疫原性組成物もしくはワクチンを投与することを含む。好ましい実施形態によれば、治療との用語は予防的治療（すなわち、本明細書で定義される病態、疾患、または状態への感受性を低下させるための治療法）に関する。

【0114】

本発明の免疫原性組成物は、薬剤的に許容される担体をさらに含んでもよい。

【0115】

本発明の変異 g p 1 2 0 ポリペプチドは、抗原分子が結合できる免疫原性高分子である担体へ共有結合できる。担体へ結合した際、結合したポリペプチドはさらに免疫原性となる。担体は、結合した分子の免疫原性を増大させるか、または診断上、分析上、または治療上有益な、担体に対する抗体に高い力価を誘発するように選択される。分子が担体へ共有結合すると、免疫原性は増大し、かつ T 細胞依存性となり得る。P o z s g a y V , e t a l . , P N A S 1 9 9 9 ; 9 6 : 5 1 9 4 - 5 1 9 7 , L e e S , e t a l . , J . I m m u n o l . 1 9 7 6 ; 1 1 6 : 1 7 1 1 - 1 7 1 8 、および D i n t z i s R , e t a l . , P N A S 1 9 7 6 ; 7 3 : 3 6 7 1 - 3 6 7 5 を参照されたい。有益な担体としては、天然物質（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）、および反応成分が結合できる1以上の官能基を有する半合成または合成物質であってよい、重合体担体が挙げられる。細菌性産物およびウイルスタンパク質（例えば B 型肝炎表面抗原およびコア抗原）、ならびに高等生物由来のタンパク質、例えば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、哺乳類の血清アルブミン、および哺乳類の免疫グロブリンもまた担体として使用できる。担体として使用するためのさらなる細菌性産物としては、細胞壁タンパク質およびその他の産物（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（L P S ））が挙げられる。

【0116】

本発明はさらに、H I V 感染に関連する症状を予防するか、または減少させることに関する。これらの症状としては、H I V 感染の軽度の症候性段階に関連する症状、例えば、帯状疱疹、皮膚発疹および爪感染、口内炎、鼻および喉の反復性の感染、ならびに体重減少が挙げられる。加えて、H I V 感染の主要な症候性段階に関連するさらなる症状として、例えば、口腔および膺驚口瘡（カンジダ）、持続性の下痢、体重減少、持続性の咳、結核の再活動化、および口唇ヘルペス（単純ヘルペス）のような反復性のヘルペス感染も挙げられる。本発明に従って治療可能な末期 A I D S の症状としては、例えば、下痢、悪心および嘔吐、膺驚口瘡および口唇ヘルペス、持続性かつ反復性の膺感染症および子宮頸癌、持続性全身性リンパ節腫脹（P G L ）、重度の皮膚感染症、いばおよび白癬、呼吸器感染症、肺炎、特にニューモシスチス・カリニ肺炎（P C P ）、帯状疱疹（h e r p e s z o s t e r ）（すなわち帯状疱疹（s h i n g l e s ））、疼痛、しびれ、または手足の「ピリピリ感」のような神経系の問題、神経性の異常、カポジ肉腫、リンパ腫、結核、およびその他の日和見感染症が挙げられる。

【0117】

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、H I V に曝露された個体の初感染を予防または遅延させること、H I V に感染した個体のウイルス負荷を減少させること、H I V 感染の無症状期を持続させること、抗レトロウイルス療法（A R T ）によって減少した H I V 感染患者のウイルス量を低く維持すること、薬物を投与していない患者および A R T により治療した患者において、H I V - 1 特異的および非特異的な両方の C D 4 T 細胞数を増加させること、または C D 4 T 細胞数の減少を小さくすること、A I D S を患う個体の全体的な健康状態または生活の質を上げること、および A I D S を患う個体の平均余命を伸ばすことが挙げられる。治療が A I D S の抑制に有

10

20

30

40

50

効か否かを決定するため、医師は、免疫付与の効果と、治療前の患者の状態もしくは治療を受けていない患者に予想される状態と比較することができる。

【0118】

免疫原性組成物は筋肉内、皮下、または静脈内注射、および経口、経鼻、または肛門内投与のような、当業者に公知のいずれかの方法によって投与できる。Banga A, "Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins (Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, US, 1995)を参照されたい。ペプチドまたはタンパク質が応答を刺激する時間を延長させるため、ペプチドまたはタンパク質は、植込錠、油性注射、または粒子状の系として提供できる。粒子状の系は、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ってよい。上記のBanga, 1995を参照されたい。合成ポリマーを基にした粒子状の担体は、制御された放出に加えて、免疫応答を増強するアジュバントとしても作用することが知られている。アルミニウム塩もまた、免疫応答を引き起こすアジュバントとして使用できる。

10

【0119】

免疫原性組成物は、正確な投与量を個別に投与するために適した単位剤形として処方することができる。パルス投与については、開示する免疫原を含む免疫原性組成物をボーラス投与した後、開示する免疫原を被験体に投与しない期間を経て、2回目のボーラス投与を行う。免疫原性組成物の治療上有効な量は、単一用量として投与できるか、または複数回用量として、例えば治療期間内に毎日投与できる。特定の、限定されない例によれば、開示する免疫原を含む免疫原性組成物のパルス投与は、一日の間、一週間の間、または一か月の間実施される。

20

【0120】

免疫原性組成物は、効果（例えばHIV-1感染の徴候、症状、または臨床検査結果の改善）が望まれるときにはいつでも投与できる。一般に用量は、疾病の症状または徴候を、被験体に許容されない毒性をもたらすことなく治療または寛解させるために十分なものである。全身性投与または局所投与を用いることができる。

【0121】

治療用に有効な量は、疾病の重症度、および年齢、体重、患者の一般的状態、ならびにその他の臨床的因子に依存し得る。したがって、適切な治療用投与計画の最終決定は、担当医師によって為されるであろう。典型的には、医薬組成物のin situ投与に有用な量についての有用な指針は、in vitroで用いられる投与量によって提供され、特定の疾患を治療するために有効な投与量の決定には動物モデルが用いられてよい。Gilman R, et al., Eds., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed. (Pergamon Press, New York, NY, US, 1990), and Gennaro A, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA, US, 1990)を参照されたい。典型的には、gp120ポリペプチドの用量範囲は約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重ないし約100 mg/kg 体重である。その他の適切な範囲には、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ないし10 mg/kg 体重の用量が含まれる。一例として、用量は約1.0 μg ないし約50 mg 、例えば一被験体あたり1 mg のペプチドのような、1 μg ないし1 mg である。投薬スケジュールは、ペプチドに対する被験体の感受性および疾病の進行速度のような臨床的因子に依存して、毎日から一年に一回のようにほとんど投与しない場合まで変動し得る。したがって、被験体は開示する治療用分子の初回用量を投与された後、2回目の用量を（またはさらに複数回の用量を）ある時点で、例えば少なくとも一日後、少なくとも一週間後に投与されてよい。

30

40

50

【0122】

本明細書に開示する医薬組成物は、用量単位として調製し、投与できる。固体の用量単位としては、錠剤、カプセル、経皮送達系、および坐薬が挙げられる。治療に必要な量の投与は、個別の用量単位または幾つかのそれよりも小さな用量単位の単回投与、およびさらに分割した用量の、特定の間隔での複数回投与の両方により行うことができる。適切な単回の、または分割された用量としては、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。

【0123】

本明細書に記載される抗原性のgp120ポリペプチドをコードする核酸コンストラクトは、例えば治療に用いる医薬組成物（薬剤）、例えば予防的措置（例えばワクチン）として組み合わせて用いられ、被験体（例えばヒト被験体のような霊長類被験体）に投与して、HIVの1以上の分枝群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の感染に先立ち、ウイルスの複製による感染を阻害するために、ヒト（または非ヒト）被験体に投与されてよい。このように上記の医薬組成物は、HIVに対する防御免疫反応を誘発するために被験体へ投与されてよい。免疫応答を誘発するためには、治療上有効な（例えば免疫学的に有効な）量の核酸コンストラクトが、ヒト（または非ヒト）被験体のような被験体に投与される。

10

【0124】

例えば核酸コンストラクトによる免疫付与は当該技術分野において公知であり、教示されている。Robinson Hら、米国特許第5,643,578号（細胞媒介性または液性応答を誘発する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するための方法が記載される）；Weiner Dら、米国特許第5,593,972号およびWeiner Dら、米国特許第5,817,637号（抗原をコードする核酸配列の、発現を可能にする調節性配列への機能的連結について記載される）、およびUrban Rら、米国特許第5,880,103号（免疫原性ペプチドまたはその他の抗原をコードする核酸を生物へ送達する幾つかの方法について記載される）を参照されたい。このような方法として、核酸（または合成ペプチド自体）および免疫刺激性コンストラクトのリポソームによる送達、またはコレステロールおよびQUILA（登録商標）（サポニン）と混合することによって自発的に形成される、陰性に荷電した大きさ30~40 nmの籠状構造であるISCOMS（登録商標）が挙げられる。

20

30

【0125】

gp120核酸分子を投与するために、核酸は細胞内へ、例えば適切な核酸発現ベクターからの発現によって送達可能であり、該核酸発現ベクターは、それが細胞内に存在するように、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、微粒子銃（例えば遺伝子銃；Biolistic（登録商標）Dupont Corp、デラウェア州、米国）の使用によって、脂質コーティングによって、細胞表面受容体もしくはトランスフェクション用薬剤によって投与されるか、または核に進入す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して投与される。Morgan Jら、米国特許第4,980,286号、およびJoliot A, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 1864-1868を参照されたい。本発明には、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むあらゆる型の核酸の、ゲノム内に組み込まれるかまたは組み込まれない送達が包含される。

40

【0126】

免疫付与のための核酸を用いようとする別のアプローチによれば、免疫原性gp120ポリペプチドは、弱毒化されたウイルスホスト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）、疱疹ウイルス、レトロウイルス、またはその他のウイルスベクターが、ペプチドまたはタンパク質を発現させるために用いられてよく、これによってCTL応答が誘発される。例えばTB免疫付与のプロトコルにおいて有用なワクシニアベクターおよび方法が、本発明のペプチドに

50

対して使用可能なその他の媒体を示している。Paolletti Eら、米国特許第4,722,848号、およびStover C, et al., Nature 1991; 351: 456-460を参照されたい。

【0127】

一例では、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、限定はされないが、アデノウイルス、疱疹ウイルス、ワクシニア、およびRNAウイルス、例えばレトロウイルスが挙げられる。一例では、レトロウイルスベクターはマウスまたはトリレトロウイルスの誘導体である。単一の外来性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 Maus 白血病ウイルス (MoMuLV)、ハーベイ Maus 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。被験体がヒトである場合、テナガザル白血病ウイルス (GaLV) のようなベクターが用いられる。さらなるレトロウイルスベクターの幾つかは、複数の遺伝子を組み入れることができる。これらのベクターは全て、選択性マーカーの遺伝子を移入するかまたは組み入れることで、形質導入された細胞を同定し、かつ産生することができる。gp120 ポリペプチドをコードする核酸配列を、特定の標的細胞上の受容体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内へ挿入することにより、例えば、該ベクターは標的特異的となる。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特異的とすることができる。好ましい標的指向化は、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達成される。当業者は過度の実験を行うことなく、レトロウイルスのゲノム内に挿入するか、またはウイルスエンベロープに付着させて、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の標的特異的な送達を可能にする特異的なポリヌクレオチド配列について理解するか、または容易に確認するであろう。

【0128】

核酸コンストラクトのための適切な製剤としては、抗酸化剤、緩衝液、および静菌薬を含んでよい、水性および非水性溶液、等張無菌溶液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存料を含んでよい水性および非水性無菌懸濁液が挙げられる。製剤は、単位用量または複数回用量の、アンプルおよびバイアルのような密閉したコンテナ内に入れられてよく、かつ使用直前に無菌の液体担体、例えば水を加えるだけでよい、フリーズドライ（凍結乾燥）された状態で保管することができる。無菌の粉末、顆粒、および錠剤から、即時溶液 (extemporaneous solution) および懸濁液が調製されてよい。好ましくは、担体は緩衝食塩水溶液である。さらに好ましくは、本発明の方法で使用するための組成物は、投与前の核酸コンストラクトを損傷から保護するために処方される。例えば組成物は、発現ベクターを調製し、保管し、または投与するために用いられる装置、例えばガラス製品、シリンジ、または針におけるアデノウイルスベクターの損失を減少させるように処方されてよい。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てよい。そのために組成物は、好ましくは、例えば上記のような薬剤的に許容される液体担体、およびポリソルベート80、L-アルギニン、ポリビニルピロリドン、トレハロース、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される安定剤を含む。

【0129】

治療への応用では、治療上有効な量の組成物が、HIVへの曝露もしくは感染の前または後に、被験体へ投与される。曝露前に投与する場合、治療への応用は予防的投与（例えばワクチンの形として）と称することができる。組成物の単回または複数回の投与は、被験体に必要とされ、かつ許容される投与量および頻度に応じて行われる。一実施形態によれば、投与はボーラスによる単回投与であるが、別の実施形態によれば、防御免疫反応のような治療上の結果が達成されるまで定期的に投与され得る。一般に用量は、疾病の症状または徴候を、被験体に許容されない毒性をもたらすことなく治療または寛解させるために十分なものである。全身性投与または局所投与を用いることができる。

【0130】

核酸ワクチンとの関連では、自然免疫に関わる受容体に結合して刺激する天然または合成の免疫刺激性組成物が、gp120ポリペプチドをコードする核酸コンストラクトと共に投与されてよい。例えば特定のToll様受容体（例えばTLR7、TLR8、およびTLR9）を刺激する薬剤が、gp120ポリペプチドをコードする核酸コンストラクトと組み合わせて投与されてよい。幾つかの実施形態によれば、核酸コンストラクトは、免疫刺激性のCpGオリゴヌクレオチドと組み合わせて投与されてよい。

【0131】

gp120ポリペプチドをコードする核酸コンストラクトは、ネイキッドDNAプラスミドとしてin vivo導入できる。DNAベクターは、当該技術分野において公知の方法によって所望の宿主細胞内へ導入され、該方法としてはトランスフェクション、エレクトロポレーション法（例えば経皮エレクトロポレーション法）、微量注入法、形質導入法、細胞融合法、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム沈殿法、遺伝子銃の使用、およびDNAベクター輸送体の使用が挙げられるが、これらに限定はされない。Wu C, et al., J. Biol. Chem. 1992; 267: 963-967, Wu C and Wu G, Biol. Chem. 1988; 263: 14621-14624、およびWilliams R, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 2726-2730を参照されたい。ネイキッドDNAを処方し、哺乳類の筋肉組織へ投与するための方法もまた公知である。Felgner Pら、米国特許第5,580,859号および米国特許第5,589,466号を参照されたい。その他の分子、例えば陽イオン性オリゴペプチド、DNA結合タンパク質由来のペプチド、または陽イオン性ポリマーもまた、in vivoにおける核酸のトランスフェクションを促進するために有用である。Bazile Dら、国際公開第1995021931号、およびByk Gら、国際公開第1996025508号を参照されたい。

10

20

【0132】

gp120免疫原をコードする核酸コンストラクトを宿主細胞内に導入するために用いることのできる別の公知の方法は、微粒子銃（すなわちbiolistic形質転換）である。Biolistic形質転換は、一般に幾つかのやり方のうちの一つによって達成される。一般的な方法の一つは、細胞において不活性の、または生物学的活性のある粒子を推進することに関わる。Sanford Jら、米国特許第4,945,050号、米国特許第5,036,006号、および米国特許第5,100,792号を参照されたい。

30

【0133】

あるいは、ベクターはリポフェクションによってin vivo導入できる。陽イオン性の脂質を用いることで陰性に荷電した核酸の被包が促進され、陰性に荷電した細胞膜との融合もまた促進される。Felgner P, Ringold G, Science 1989; 337: 387-388を参照されたい。核酸の移入に特に有用な脂質化合物および組成物について記載されている。Felgner Pら、米国特許第5,459,127号、Behr Jら、国際公開第1995018863号、およびByk G、国際公開第1996017823号を参照されたい。

40

【0134】

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、単一用量により投与されてよいが、または時間間隔で区切られた複数回用量によっても投与することができる。免疫応答を最適化するため、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、またはその回数を超えて、数週間、数か月間、または数年間の期間にわたり、被験体へ投与されてよい。

【0135】

本発明に開示する免疫原性組成物を、その他の薬剤、例えばタンパク質、ペプチド、抗体、およびその他の抗HIV剤と共に投与することは有利な可能性がある。このような抗HIV治療薬の例としては、アバカビル、AZT、ジダノシン、エムトリシタビン、ラミ

50

ブジン、スタブジン、テノホビル、ザルシタビン、およびジドブジンなどのようなヌクレオシド逆転写酵素阻害物質；デラビルジン、エファビレンツ、およびネビラピンのような非ヌクレオシド逆転写酵素阻害物質；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、リトナビル、サキナビル、およびチプラナビルなどのようなプロテアーゼ阻害物質；ならびにエンフビルチドなどのような融合タンパク質阻害物質が挙げられる。特定の実施形態によれば、免疫原性組成物はその他の抗HIV治療薬と同時に投与される。特定の実施形態によれば、免疫原性組成物はその他の抗HIV治療薬と連続的に、例えばその他の薬剤よりも前または後に投与される。当業者は、連続的投与が、直後、または適切な期間の後、例えば数時間、数日、数週間、数か月、または数年後をも意味し得ることを承知するであろう。

10

【0136】

6．生体試料中の抗HIV抗体の検出方法および中和抗体反応の検出方法

本発明に記載される免疫原は、患者の試料中に、前記免疫原に対して特異的な抗体を同定することに適する。本発明の免疫原は中和抗体へ特異的に結合することから、該免疫原は、開発した中和抗体を有する患者を同定するために用いることができる。したがって該抗体は、患者が中和抗体を有するか否かに基づいて、個別的な治療法を特定するための助けとなり得る。このように、別の態様によれば、本発明はウイルスに対して特異的な中和抗体を試料中に検出するための方法に関し、該方法は、

(i) 前記試料と本発明のポリペプチドとを接触させる工程と、そして

(ii) 前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少なくとも含んでなる。

20

【0137】

好ましい実施形態によれば、ウイルスはHIVであり、ポリペプチドは、上で定義したgp120変異ポリペプチドまたはその免疫原性断片である。さらに好ましい実施形態によれば、試料はHIV-1に感染した患者またはAIDSワクチンレシピエントに由来する。

【0138】

様々なアッセイフォーマットのいずれでも、本発明の方法に従って用いられてよい。このようなフォーマットは不均一または均一、連続的または同時的、競合的または非競合的である。Peterson Mら、米国特許第5,563,036号、Cheng Aら、米国特許第5,627,080号、Lee Jら、米国特許第5,633,141号、Peterson Mら、米国特許第5,679,525号、Draetta Gら、米国特許第5,691,147号、Lucas Fら、米国特許第5,698,411号、Yan Cら、米国特許第5,747,352号、Davidson R、米国特許第5,811,526号、Oh Cら、米国特許第5,851,778号、およびLandrum Eら、米国特許第5,976,822号を参照されたい。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、定量的に設定されてよいが、または抗HIV抗体の存在または不在を測定するため、定性的に設定されてもよい。

30

本発明の原理に従った使用のために適合されてもよいさらなる免疫アッセイについては、科学文献中に記載されている。Gnann J, et al., Methods Enzymol. 1989; 178: 693-714, Dopel S, et al., Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1991; 29: 331-337, Manocha M, et al., Immunol. Lett. 2003; 85(3): 275-278), Brattegaard K, et al., AIDS 1995; 9(6): 656-657, Beristain C, et al., J. Clin. Lab. Anal. 1995; 9: 347-350, Modrow S, et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1989; 2: 141-148, Gueye-Ndiaye A, et al., AIDS 1993; 7: 475-481, Sabatier J, et al., AIDS 1989; 3: 215-220, Sommerfelt M, et al., Expert Opin. Bi

40

50

ol. Ther. 2004; 4: 349 - 361, Alcaro M, et al., Curr. Protein Pept. Sci. 2003; 4: 285 - 290, Smith R, et al., Arch. Pathol. Lab. Med. 1990; 114: 254 - 258, Petrov R, et al., Biomed. Sci. 1990; 1: 239 - 244, Zolla-Pazner S, Nat. Rev. Immunol. 2004; 4: 199 - 210, Baillou A, et al., J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 1387 - 1391、および McGaughey G, et al., Curr. HIV Res. 2004; 2: 193 - 204 を参照されたい。

【0139】

10

不均一な免疫アッセイ技術には、典型的には反応産物が結合する固相材料の使用が含まれるが、該アッセイは固定化されていない抗原および抗体の結合（すなわち液相免疫アッセイ）を含むように適応されてもよい。固相を反応混合物から取り除くことにより（例えば洗浄によって）、過剰の試料、アッセイ用試薬、およびその他の物質から反応生成物が分離される。本発明に従って用いてもよい固相免疫アッセイの一つの型は、サンドイッチ免疫アッセイである。サンドイッチアッセイでは、試料中に存在する分析物多いほど、多量の標識が固相に存在する。このような型のアッセイフォーマットでは、固相上の標識の様子がさらに容易に検出されるため、一般には特に低濃度の分析物を可視化するために好ましい。

【0140】

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相支持体に結合され（すなわち固定化され）、抗HIV抗体の有無を調べる生体試料と接触した状態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、ブロッキング剤が添加されてよい。

【0141】

ペプチドは、生体試料と共に未結合の状態でインキュベートされ、次に固相支持体に結合（すなわち固定化）されてもよいことが理解されるであろう。続いて支持体はさらに好ましく処理され（例えば洗浄により）、存在し得るが、結合したペプチドに結合できなかった非HIV抗体が実質的に除去される。このような処理に続いて、ペプチドと抗HIV抗体との間に免疫複合体が形成される。

30

【0142】

次に、検出可能なように標識された二次抗体（一次抗体に結合可能である（例えば抗ヒトIgG抗体））を好ましく添加し、存在する可能性のあるいずれかの抗HIV抗体に二次抗体が結合するために十分な条件下で支持体をインキュベートする。続いて支持体をさらに好ましく処理し（例えば洗浄により）、結合していないいずれの二次抗体も実質的に除去する。試験試料中に抗HIV抗体が存在する場合には、二つの抗体と固定化されたペプチドとが免疫複合体（すなわち二次抗体/抗HIV抗体/固定化されたペプチドのサンドイッチ）を形成し得る。このようなアッセイにおける、支持体に結合した二次抗体の検出は、試験される試料中に抗HIV抗体が存在することを示している。Schuurs Aら、米国特許第3,791,932号および米国特許第4,016,043号、ならびにPankratz Tら、米国特許第5,876,935号を参照されたい。二次抗体は、非ヒト種から分離した天然の免疫グロブリン（例えばマウス抗ヒトIgG抗体、ヤギ抗ヒトIgG抗体、ヤギ抗ヒトIgM抗体）であってよいが、または組換えもしくは合成によって産生できる。抗体は未変化の免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片（例えばFab、F[A₂b]₂）であってよい。所望により、そのような二次抗体と共に、またはその代わりに、その他の結合分子（抗HIV抗体に結合可能である）が用いられてよい。例えば抗HIV抗体をビオチン化して、標識したアビジンまたはストレプトアビジンを二次抗体の代わりに用いてもよい。

40

【0143】

未結合のものを分離する工程を除き、化学的結合アッセイに必要な時間と機器を減らす

50

ため、均一なアッセイフォーマットが代わりに用いられてよい。このようなアッセイでは、結合ペアのうちの1成分がなお固定化されるが、結合ペアの第2成分の存在が、未結合のものを分離することなく検出される。均一な光学的方法の例としては、蛍光クエンチングの検出を通して操作するE M I T法（S y v a , I n c . , サニーベール、カリフォルニア州、米国）；光散乱の変化を検出することにより操作するレーザーネフェロメトリーラテックス粒子凝集法（B e h r i n g w e r k e A G、マールブルグ、独国）；L P I Aラテックス粒子凝集法（三菱化学株式会社、東京、日本）；T D X 蛍光脱分極法（A b b o t t L a b o r a t o r i e s , アボット・パーク、イリノイ州、米国）；および蛍光エネルギー転移法（C i s B i o I n t e r n a t i o n a l , パリ、フランス）が挙げられる。このようなアッセイのいずれも、本発明の目的に沿うように適応されてよい。

10

【0144】

本発明の結合アッセイは、競合アッセイとして設定されてよい。競合アッセイでは、試験サンプル中により多くの抗H I V抗体が存在するほど、固相に存在する標識の量は少なくなる。

【0145】

サンドイッチアッセイと同様の様式で、競合アッセイは、標識された抗H I V抗体を規定量提供すること、および支持体への結合に対して標識抗体と競合し得る抗H I V抗体が含まれるか否かについて決定することによって実施できる。このような競合アッセイでは、捕捉された標識抗体の量は、試験サンプル中に存在する検体の量とは反比例する。この種のアッセイの幾つかは、当該技術分野において記載されている。S m i t h Dら、米国特許第4,401,764号、C l a g e t t Jら、米国特許第4,746,631号、L i Cら、米国特許第4,661,444号、C h i e r e g a t t Eら、英国特許第2084317号、M o c h i d a Eら、米国特許第4,185,084号、S a d e h Dら、米国特許第4,243,749号、L u c a s Fら、米国特許第5,698,411号、L a n d r u m、上記、L e u v e r i n g J、米国特許第4,313,734号、G r i b n a u Tら、米国特許第4,373,932号、およびB a u g h e r Bら、米国特許第5,501,985号を参照されたい。検出可能な標識（すなわち酵素免疫アッセイまたはE I A）としては、酵素（特にアルカリホスファターゼ、 β -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）の使用が好ましい。

20

30

【0146】

酵素標識の存在は、発色性基質（蛍光、UV、可視光線を発生または吸収するものを含む）の使用を通し、酵素標識の触媒作用に反応して検出され得る。さらに好ましくは、化学標識が用いられてよい（例えばコロイド金、ラテックスビーズ標識）。

【0147】

標識は、多重検出器、多重パスフィルター、格子、または異なるスペクトルの蛍光を用いて検出できる。W a r d D , e t a l . , 米国特許第5,759,781号を参照されたい。酵素標識としては、ペルオキシダーゼを、特に発色性基質である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（T M B）、O P D、またはA B T Sとあわせて用いることが特に好ましい。抗体を標識する酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、過ヨウ素酸塩による技術、またはパートナーにヘテロ二官能性の試薬を連結したことが報告された方法を用いることが可能である。N a k a n e P , e t a l . , J . H i s t o c h e m . C y t o c h e m . 1974; 22:1084-1090を参照されたい。本発明の免疫アッセイには、様々な固相支持体のいずれかが用いられてよい。固相支持体に適した材料は、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、またはその他の合成ポリマーのような合成物、セルロースのような天然ポリマー、およびセルロースアセテートまたはニトロセルロースのような誘導体化された天然ポリマー、ならびにガラス、特にガラス繊維である。支持体は、球形、棒状、管、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を取ることができる。ペーパーストリップのようなシート様構造、小ブ

40

50

レート、および膜が適すると思われる。担体の表面は、水溶液に対して透過性または不透過性であってよい。

【0148】

上の記載は体液（例えば血清、血液、尿、唾液、涙液、脳脊髄液、精液）である生体試料中に抗HIV抗体が存在するか否かのアッセイに関するものであるが、どのような流動性の生体試料（例えば組織または生検抽出物、糞便抽出物、痰）も同様に、本発明のアッセイに用いられてもよいことが理解されるであろう。最も好ましくは、アッセイされる生体試料は血清または血漿である。

【0149】

本発明の免疫原は広域中和抗体の産生を誘導可能であることから、これらの免疫原は、患者が有する病原体に対する中和抗体の応答を検出するためにも用いることができる。このように別の態様によれば、本発明は、被験体のウイルス感染に対する中和抗体の応答を検出するための方法に関し、該方法は、本発明による中和抗体の検出法を用いて、前記被験体における中和抗体の存在を検出する工程を含んでなり、ここで対照被験体に対する前記被験体における中和抗体の存在は、前記被験体における前記ウイルス感染に対する中和抗体の応答を示している。

10

【0150】

好ましい実施形態によれば、ウイルスはHIVであり、ここでポリペプチドは本発明のgp120変異ポリペプチドまたはその免疫原性断片である。さらに好ましい実施形態によれば、試料はHIV-1に感染した患者またはAIDSワクチンレシピエントに由来する。

20

【0151】

7. HIVの予防および治療法

本発明に記載される免疫原は、HIV感染に付随する疾病の予防および治療に適する。

【0152】

全般的手順

1. 試薬

以下の試薬を用いた。

a. プラスミド。pNL4.3 (NIH ARRRP, 米国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド州、米国) およびpcDNA 3.1 (Invitrogen Corp., カールスバッド、カリフォルニア州、米国) プラスミドを用いた。

30

b. HIV-1分離株。分枝群B HIV-1初代分離株であるAC-10を用いた (NeutNet consortium, ミラノ、イタリア)。

c. 細胞株。TZM-bl細胞 (CD4⁺CXCR4⁺CCR5⁺) はNIHリポジトリ (米国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド州、米国) から得た。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を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で維持した。

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) (エピトープ特異性は括弧内に示す) を用いた (米国立衛生研究所、ARRRP, ベセスダ、メリーランド州、米国; Polymun AG, ウィーン、オーストリア)。以下の抗体を用いた: 4E10 (膜近接外部領域 (membrane-proximal external region); 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)。

40

【0153】

2. In vitroランダム変異誘発

HIV-1 AC-10 envへの変異は、Genemorph II Random Mutagenesis kit (Stratagene (登録商標)、Agilent Technologies, サンタクララ、カリフォルニア州、米国) を用いて導

50

入した。キメラHIVウイルス粒子のライブラリーは、無作為に変異させたエンベロープをpNL4-3およびpcDNA3.1プラスミドへ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た制限酵素部位の導入、ならびに酵素XbaIおよびNotI (New England Biolabs Inc., イプスウィッチ、マサチューセッツ州、米国)を用いた消化によって行った。

【0154】

3. クローニングおよびライブラリーの作製

PCR産物は、Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, インディアナポリス、インディアナ州)を製造者の仕様書に従って用いることにより、ベクターpNL4.3およびpcDNA3.1内へクローン化した。pNL4.3およびpcDNA3.1の組換えベクターは、それぞれMAX Efficiency (登録商標) Stbl2 (商標) コンピテント細胞およびMAX Efficiency (登録商標) DH5α (商標) コンピテント細胞 (Invitrogen Corp., カールスバッド、カリフォルニア州、米国)へ導入し、3mLの容量で攪拌しながら30℃で一晩(overnight (ON))増殖させた。変異性の喪失を避けるために幾つかの形質転換を同時に行い、これらを混合して大量増幅させた(250mL、30℃、攪拌しながらON)。インキュベーション後に20μLをプレートにまき、Pure Yield (商標) Plasmid Maxiprep System (Promega Corp., マディソン、ウィスコンシン州、米国)を用いてプラスミドDNAを精製した。両産物をXbaIおよびNotIによってさらに消化し、env遺伝子の存在を確認した。陽性の場合、クローンを配列決定するか、またはトランスフェクションに使用した。pNL4.3コンストラクトを用いた293T細胞への一過性のトランスフェクションにより、ウイルスを産生させた。トランスフェクション後2日目にウイルス粒子を含む細胞培養上清を回収し、Amicon (登録商標) Ultra centrifugal filter unitを用いてウイルス粒子を濃縮した。ウイルス粒子をリン酸緩衝食塩水(PBS)中に再懸濁した。

【0155】

4. ウイルス粒子捕捉アッセイ

マイクロタイターウェルを、捕捉MAb (100μLのPBS中、0.05μg/mL)により、4℃にて一晩コートした。ウェルをPBS中の3%ウシ血清アルブミン(BSA)により、37℃にて1時間ブロックした。ライブラリー由来のウイルス100μL (p24の酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)により、1000ng/mLと定量された)を、マイクロタイターウェルへ加えた。2時間のインキュベーション後にウェルをPBSによって6回洗浄し、p24の酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によってウイルス当量を定量するか、またはHigh Pure Viral RNA Kit (Roche Applied Science, インディアナポリス、インディアナ州、米国)を製造者の指示に従って用いることにより、RNAを抽出した。

【0156】

ウイルス粒子捕捉アッセイの別のプロトコルは以下のとおりである。「マイクロタイターウェルを、ポリクロナル抗Fc (100μLのPBS中、5μg/mL)により、4℃にて一晩コートした。ウェルをPBS中の3%ウシ血清アルブミン(BSA)により、37℃にて1時間ブロックした。ライブラリー由来のウイルス100μL (1000ng/mL)を、固定化抗Fcで予めコートされ、ブロックされたマイクロタイターウェルへ加えた。5μLの捕捉MAb (100ng/mL)を対応するウェルに加え、プレートを37℃にて攪拌(450rpm)しながらインキュベートした。2時間のインキュベーション後にウェルをPBSによって6回洗浄し、p24の酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によってウイルス当量を定量するか、またはHigh Pure Viral RNA Kit (Roche Applied Science, インディアナポリス、インディアナ州、米国)を製造者の指示に従って用いることにより、RNAを抽出した。」

10

20

30

40

50

【0157】

5. ネステッドRT-PCRによるHIV-1 env RNAの増幅

分離したHIV-1 env RNAを、RT-PCRキット(GeneAmp(登録商標) Gold RNA PCR Reagent Kit; Applied Biosystems(登録商標) Life Technologies Corp., カールスバッド、カリフォルニア州、米国)、およびExpand High Fidelity PCR System(Roche Applied Science, インディアナポリス、インディアナ州)を用いた逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって増幅した。8 µLの量の鋳型RNAをRT-PCR反応に用い、RNAをプライマー102(逆方向)によって50℃にて20分間逆転写した。5 µLの量のcDNAからプライマー101(順方向)および104(逆方向)を用い、それに続いて2 µLの量の鋳型からプライマー179(順方向)および180(逆方向)を用いたネステッドPCRによってenv領域を増幅した。表1を参照されたい。両方のenv PCR増幅の条件は以下のとおりであった: i) 94℃ 2分を1サイクル、ii) 94℃ 2分、55℃ 1分、および72℃ 3分を35サイクル、iii) 72℃ 7分を1サイクル、および4℃にて停止。得られたアンプリコン(2583 bp)を、1 Kb分子量マーカーと共に、SYBR(登録商標) Safe DNA gel stainによって染色した1.0%アガロースゲル内に電気泳動した。

10

【0158】

6. env遺伝子のクローニングおよび配列決定

前工程でのPCR産物を、上記のようにpNL4.3およびpcDNA3.1ベクター内へクローン化した。上で説明したように、これらのプラスミドによってStb12およびDH5αコンピテント細胞を形質転換させた。QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen Inc., バレンシア、カリフォルニア州、米国)を用いてプラスミドDNAを精製した後、XbaIおよびNotIによりさらに消化して、env遺伝子の存在を確認した。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Env陽性クローンの配列決定を行った。第1表参照。

20

【0159】

7. 配列解析

ヌクレオチド配列のアラインメントは、BioEdit 7.0.9.0バージョンに統合されたCLUSTAL Wプログラム(EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/FTP/>, 2012年8月)およびContig Assembly Program(CAP)アプリケーションを用いて行い、次にこれを手で編集した。Thompson J, et al., Nucl. Acids Res. 1994; 22(22): 673-4680およびHuang X, Genomics 1992; 14(1): 18-25を参照されたい。

30

【0160】

【表 1】

第 1 表
プライマー 配列および遺伝子の位置

プライマー ID	配列	ゲノムの位置	配列番号
101	TAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAG	5853-5877	3
102	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT	8936-8913	4
104	AGCTGGATCCGTCTCGAGATACTGCTCCCAC CC	8916-8882	5
179	GTAGTACATGTAATGCAACC	6050-6069	6
180	AGCTCGTCTCATTCCTTTCCC	8865-8846	7
183	CCAATTCCCATACATTATTGTGC	6858-6880	8
185	GGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC	7794-7817	9
186	GAGTTAGGCAGGGATACTCACC	8344-8365	10
190	GCCAGGACTCTTGCCCTGGAGCTG	7969-7947	11
192	CTTGTATTGTTGTTGGGTC	7135-7117	12
193	CATGGCTTAGGCTTTGATCCC	6580-6559	13

10

20

遺伝子の位置は HIV - 1 HXB2 ゲノム (GenBank 受託番号 K03455) に
基づく。Wei X, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46 (6) : 1896 - 1905

【 0 1 6 1 】

8. 組換えウイルスの産生

関連する変異 (潜在的なグリコシル化部位の欠損および V1 / V2 ループ構造の変化)
に特異的な MA b を捕捉するエンベロープ糖タンパク質を発現するクローンを、250 m
L の容量で攪拌しながら 30 で ON 増殖させた。プラスミド DNA は、Pure Yie
ld (商標) Plasmid Maxiprep System (Promega Co
rp., マディソン、ウィスコンシン州、米国) を用いて精製した後、293T 細胞への
一過性の共トランスフェクションに用いた。トランスフェクション後 2 日目にシュードウ
イルスを含む上清を回収した。p24 の量を ELISA によって定量した。

30

【 0 1 6 2 】

9. 結合アッセイ

未変化のウイルス粒子に対する MA b (4E10、2F5、2G12、b12、および
PG16) の結合を、上に記載した捕捉アッセイによって判定した。最初に、ウイルス -
BMA b の結合を促進するため、ウイルスと BMA b とを溶液中でインキュベートした。
あるいは、ウイルス - BMA b 複合体を予めプレートに固定化した抗 FC 抗体によって捕
捉した。固定化されたウイルス - BMA b を、PBS 中の 1 % Triton - X によって
溶解した。上に記載したように、ウイルスライセート中の p24 を ELISA によって定
量した。陰性コントロールとして ΔEnv pNL4.3 コンストラクトを用いた。結合
親和性の増大を野生型 AC - 10 ウイルスとの比較によって判定した。

40

【 0 1 6 3 】

10. ディープシーケンシング

ウイルスライブラリーを詳細に特徴付けるためには、これを適切に調製および増幅して
ディープシーケンシングに供する必要がある。増幅の出発物質は、予め取得した、pNL
4.3 ベクター内にクローン化されたエンベロープ AC10 cDNA である。しかしな
がらそれ以前の RT - PCR 工程が行われていれば、出発物質は HIV RNA であって

50

もよい。

【0164】

Platinum DNA Taq High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, インディアナポリス、インディアナ州) を用いて DNA を増幅した。プライマー 454_1 (アンプリコン 1 順方向)、454_2 (アンプリコン 1 逆方向)、454_3 (アンプリコン 3 順方向)、454_4 (アンプリコン 3 逆方向)、454_5 (アンプリコン 4 順方向)、および 454_6 (アンプリコン 4 逆方向) を用いた PCR によって増幅を行った。第 2 表参照。プライマーは、対照の AC10 に対し、エンベロープ遺伝子内の関心のある領域、すなわちアンプリコンを増幅するように設計した。アンプリコンは、現在使用される技術の限界に従いながらも、より長い領域にわたるように設計され得る、長さがおおよそ 450 塩基対の DNA 配列である。454/GS/Junior library preparation protocol (454-Life Sciences, Roche Diagnostics, ブランフォード、コネティカット州、米国) に記載されるように、プライマーを、チタニウム配列決定化学に特有の複数識別子 (MID) アダプターに連結させた。PCR の条件は以下のとおりであった: i) 94 2 分を 1 サイクル、ii) 94 30 秒、49 30 秒、および 68 45 秒を 20 サイクル、iii) 68 45 秒、および iv) 4 にて停止。アンプリコンライブラリーを三通りに調製した後プールし、次に三通りの PCR 産物を、マグネチックビーズ (Agencourt AMPure Kit, Beckman Coulter Inc., ベルンリート、独国) を用いてプライマーダイマーを除去して精製した。分子数は、蛍光光度法 (Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit, Invitrogen Corp., カールスバッド、カリフォルニア州、米国) によって定量化した。454 チタニウム emPCR プロトコルに従って、エマルジョン PCR (emPCR) を行った。Roche/454 GS/Junior を製造者の指示に従って用い、ピコタイタープレート上で配列決定を実行した。

10

20

【0165】

【表 2】

第 2 表
プライマー 配列および位置

30

プライマー ID	配列	ゲノムの位置	配列番号
454_1	CCCCAACCCACAAGAAGTAG	476-495	14
454_2	GCTGGTTTTGCGCTTCTAAAATG	921-943	15
454_3	CCCATGCAGAAATAAACAAATTTATAA	1493-1518	16
454_4	CTGACGGTACAGGCCAGA	1863-1880	17
454_5	TCTTGGGAGCAGCAGGAA	1819-1836	18
454_6	TTAATTGAAGAATCGCAGAAT	2187-2207	19

40

組み合わせは HIV-1 AC10 エンベロープ遺伝子配列 (GenBank 受託番号 AY835446) に基づく。Li, M., et al., J. Virol. 2005; 79 (16): 10108-10125 を参照されたい。

【0166】

【表 3】

第3表
最も優勢なアンプリコンサイズの三つのハプロタイプにみられる変異

アンプリコン	ハプロタイプ	変異
1	1	N88D, C131Y, T132N, D138G, N160Y, N191D, A225V
1	2	N137D
1	3	E87G, V89L, M165L
3	1	なし
3	2	E470V
3	3	S538T
4	1	なし
4	2	S538T, K578M
4	3	Y647N

10

アミノ酸の組み合わせはH I V - 1 A C 1 0 エンベロープ遺伝子配列 (G e n B a n k 受託番号 A Y 8 3 5 4 4 6) に基づく。上記の L i , 2 0 0 5 を参照されたい。

【 0 1 6 7 】

得られた配列決定データは、配列決定した試料それぞれについて多数の配列を読み取った。データを 4 5 4 / A V A ソフトウェアによってさらに処理し、各アンプリコン / 試料の組み合わせについて配列データセットを得た。これらの配列を、M o s a i k ハイスルーブットアライナソフトウェアを用いて、A C 1 0 参照配列 (受託番号 A Y 8 3 5 4 4 6) に対してバイオインフォマティクスの的に整列させた。いったん整列させた後、各試料についてアンプリコンサイズのハプロタイプを得るため、アラインメント情報と読み枠の位置を用いて、各配列をタンパク質配列に翻訳した。独特に出現する配列を見出すために、各アンプリコンの配列データセットおよび試料を配列データセット内の各配列の説明情報と共に解析した。これによって、ウイルス集団内に存在する各ハプロタイプについて、アンプリコンサイズの配列の長さが定量化された。このように、ウイルスライブラリー内の各変異率および各ハプロタイプの存在度を特徴付けた。

20

【 0 1 6 8 】

30

【表 4】

第4表

H I V-1 A C 1 0 エンベロープ遺伝子配列を用いてDNA配列のアラインメントおよび翻訳を行った後の、最も優勢なタンパク質レベルのハプロタイプ

アンプリコン	ハプロタイプ	アンプリコンタンパク質配列	配列番号
1	1	LEDVTENFNMWKNMVDQMhGDIISLWDQSLK PCVKLTPLCVTLsyNDNVGNGTSTNNSRWdKM EKGEIKNCSFYITTNMRDKMQKQYALFYKLDV VPIEEGKNNDSSFTDYRLISCNTSVITQACPK VTFEPIPIHYCVP	20
1	2	LENVTENFNMWKNMVDQMhGDIISLWDQSLK PCVKLTPLCVTLsCTDNVGDDTSTNNSRWdKM EKGEIKNCSFNITTNMRDKMQKQYALFYKLDV VPIEEGKNNNSSFTDYRLISCNTSVITQACPK VTFEPIPIHYCAP	21
1	3	LGNLTENFNMWKNMVDQMhGDIISLWDQSLK PCVKLTPLCVTLsCTDNVGNDTSTNNSRWdKM EKGEIKNCSFNITTNLRDKMQKQYALFYKLDV VPIEEGKNNNSSFTDYRLISCNTSVITQACPK VTFEPIPIHYCAP	22
3	1	MWQEVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRD GGRGNQTDNQTETIFRPVGGDMKNNWRSELYKY KVVRIEPLGIAPTRAKRRVVQREKRAVGIGAL FLGFLGAAGSTMGAASMT	23
3	2	MWQEVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRD GGRGNQTDNQTETIFRPVGGDMKNNWRSELYKY KVVRIEPLGIAPTRAKRRVVQREKRAVGIGAL FLGXLGAAGSTMGAASMT	24
3	3	MWQEVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRD GGRGNQTDNQTETIFRPVGGDMKNNWRSELYKY KVVRIEPLGIAPTRAKRRVVQREKRAVGIGAL FLGFLGAAGSTMGAATMT	25
4	1	TMGAASMTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIE AQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLRDQQL LGIWGCSGKLICTTAVPWNVSWNNRSVDDIWE NMTWMQWDREISNYTSLIY	26
4	2	TMGAATMTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIE AQQHLLQLTVWGIMQLQARVLAVERYLRDQQL LGIWGCSGKLICTTAVPWNVSWNNRSVDDIWE NMTWMQWDREISNYTSLIY	27
4	3	TMGAASMTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIE AQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLRDQQL LGIWGCSGKLICTTAVPWNVSWNNRSVDDIWE NMTWMQWDREISNYTSLIN	28

10

20

30

GenBank 受託番号 AY835446。上記の Li, 2005 を参照されたい。

40

【0169】

11. In vivo アッセイ

a. 免疫原の産生 (AT-2 不活化ウイルス粒子)

関連する変異 (潜在的なグリコシル化部位の欠損および V1/V2 ループ構造の変化) に特異的な MA b を捕捉するエンベロープ糖タンパク質を発現するクローンと、ディープシーケンシングによって選択されたクローンとを、293T 細胞への一過性の共トランスフェクションに用いた。トランスフェクション後 2 日目にシュードウイルスを含む上清を回収した。上の項目 8 に記載したように、p24 の量を ELISA によって定量した。

【0170】

前工程で得た上清に含まれる HIV を、当該技術分野において公知のプロトコルに従っ

50

てアルドリチオール - 2 (2 , 2 ' - ジチオジピリジン) (A T - 2 , A d r i t h i o l (登録商標) - 2 、カタログ番号 1 4 3 0 4 9 、 S i g m a - A l d r i c h , セントルイス、ミズーリ州、米国) によって処理して不活化させた。 R o s s i o J , e t a l . , J . V i r o l . 1 9 9 8 ; 7 2 (1 0) : 7 9 9 2 - 8 0 0 1 および A r t h u r L , e t a l . , A I D S R e s . H u m . R e t r o v i r u s e s 1 9 9 8 ; S u p p l 3 : S 3 1 1 - S 3 1 9 を参照されたい。上清を 1 m M の A T - 2 と共に、 3 7 にて 2 時間、連続的に攪拌しながらインキュベートした。 2 0 1 1 年 1 1 月 2 2 日に提出した欧州特許第 1 1 3 8 2 3 5 8 . 7 号を参照されたい。

【 0 1 7 1 】

A T - 2 不活化ウイルス粒子は、 A m i c o n (登録商標) U l t r a c e n t r i f u g a l f i l t e r u n i t を用いて濃縮した。ウイルス粒子をリン酸緩衝食塩水 (P B S) 中に再懸濁した後、 p 2 4 の量を E L I S A によって定量した。

【 0 1 7 2 】

b . 免疫付与アッセイ

6 ないし 8 週齢で、特定病原体が除去された (s p e c i f i c p a t h o g e n f r e e : S P F) 雌 B A L B / c マウスを使用した。マウスは標準的な食餌を自由に摂取し、 1 2 時間の明 - 暗サイクルの下で飼育した。各群は 5 匹の動物から構成された。

【 0 1 7 3 】

アッセイの始めに顔面静脈穿刺 (顎下) によって、 2 0 0 μ L の血液 (抗凝固剤を含まない) を採取した (t = 0) 。次に全ての群に対して、予め選択した、エンベロープを有する A T - 2 不活化ウイルスを 1 0 0 μ L (E L I S A による定量で、 p 2 4 は 2 . 5 μ g / m L) + フロイント完全アジュバント (1 0 0 μ L) を、各肢の皮下に接種した (全量 2 0 0 μ L) 。

【 0 1 7 4 】

2 週間後 (t = 1 4) 、全ての群から顔面静脈穿刺 (顎下) によって、 2 0 0 μ L の血液 (抗凝固剤を含まない) を採取した。予め選択した、エンベロープを有する A T - 2 不活化ウイルスを 1 0 0 μ L (E L I S A による定量で、 p 2 4 は 2 . 5 μ g / m L) + フロイント完全アジュバント (1 0 0 μ L) を、第 2 群の各肢の皮下に接種した (全量 2 0 0 μ L) 。

【 0 1 7 5 】

4 週間後 (t = 1 4) 、全ての群から、 4 0 0 μ L ないし 1 m L の血液を麻酔下の心臓穿刺によって採取した。

【 0 1 7 6 】

免疫付与したマウスから得た血清中の、 5 種の異なる H I V 亜型ウイルスのパネルに対する中和活性を、当該技術分野において公知のプロトコルに従って評価した。 M e d i n a - R a m i r e z M , e t a l . , J . V i r o l . 2 0 1 1 ; 8 5 : 5 8 0 4 - 5 8 1 3 を参照されたい。

【 実施例 】

【 0 1 7 7 】

実施例 1 : L R 1 - C 1 ウイルス粒子の分離および n A b 4 E 1 0 に対する親和性

該方法に記載するように、 H I V - 1 A C - 1 0 e n v へ変異を導入した。無作為に変異させたエンベロープを p N L 4 - 3 プラスミドへ移入することによって、キメラ H I V ウイルス粒子のライブラリーを作製した。 P C R 産物をベクター p N L 4 . 3 内へクローン化し、組換えベクターを S t b l 2 (商標) コンピテント細胞へ導入した。分離した H I V - 1 e n v R N A を逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) によって増幅した。得られたアンプリコン (2 5 8 3 b p) を、 1 K b 分子量マーカーと共に電気泳動した。プライマー 1 8 3 (順方向) 、 1 8 5 (順方向) 、 1 8 6 (順方向) 、 1 9 0 (逆方向) 、 1 9 2 (逆方向) 、および 1 9 3 (逆方向) を用いて E n v 陽性クローンの配列決定を行った。関連する変異 (潜在的なグリコシル化部位の欠損および V 1 / V 2 ループ構造の変化、図 2 を参照されたい) に特異的な M A b を捕捉するエンベロープ糖

10

20

30

40

50

タンパク質を発現するクローンを増殖させ、293T細胞への一過性の共トランスフェクションに用いた。未変化のウイルス粒子に対する4E10 MA bの結合を、上に記載した捕捉アッセイによって判定した。固定化されたウイルス-bMA b複合体を、PBS中の1% Triton-Xによって溶解した。ウイルスライセート中のp24をELISAによって定量した。広域中和抗体4E10に対する親和性の増大したLR1-C1ウイルス粒子を同定した(図3)。

【0178】

実施例2: BALB/cマウスにおいて、LR1-C1によって誘導された中和抗体応答の特徴付け

293T細胞への一過性のトランスフェクションによって、AC10ウイルス粒子およびbNA b 4E10-LR1-C1に対する親和性が増大したEnv変異体を発現するウイルス粒子を産生した後、アルドリチオール-2(AT-2)により、以前に記載されたプロトコル(Rossio, J. L. et al. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. J Virol 72, 7992-8001, 1998)に従って不活化した。AT-2により化学的に不活化したウイルス粒子とフロイントアジュバントとを用いて、異なる2群に免疫付与した。第1群の4匹にはWTウイルス(AC10)、第2群の5匹にはLR1-C1ウイルス粒子を筋肉内に接種した。両群に対し、ゼロ時(免疫付与前)、接種後2週間目、および2週間後の屠殺時に血清学的分析を行った。動物は特定病原体が除去された(specific pathogen free: SPF)状態で、標準的な食餌および水を自由に摂取し、制御された温度および湿度ならびに12時間の光サイクルの下で維持した。この試験に用いた9被験体は、6ないし8週齢の雌であった。

【0179】

最初に、免疫付与したマウス由来の血清に対し、ウイルス産生に用いた293T細胞1×10⁶によって、1時間室温にて回転させながら前吸収を行った。次に細胞をペレット化し、上清からIgGを精製した。このように、免疫付与に用いたウイルスに含まれる細胞性タンパク質に対して産生された可能性のあるNA bは除去され得た。

【0180】

免疫付与したマウスの二つの群から精製したIgGを、0.2mg/mlの濃度にて、二つの異なるHIV-1初代分離株(分枝群B分離株および親ウイルスAC10ならびに分枝群B分離株NL4.3)、およびコントロールとして水疱性口内炎ウイルスに対する特異的な中和について試験した(表1)。中和活性は、免疫したマウス由来の精製IgGがウイルスの50%を中和し得たか否かによって三通りに判定した。

【0181】

免疫付与したマウスの血清から精製したIgGは、予想通りVSVシュードタイプウイルスを中和せず、HIV-1 Env特異的なその他のウイルス分離株に対する中和が確認され、かつ細胞性タンパク質を認識する抗体の影響による感染の障害がないことが確認された。LR1-C1によって免疫付与したマウスから精製したIgGは、0.2mg/mlの濃度にて、AC10と比較して中程度に改善された中和の幅を示した。5種の血清のうち3種はAC10を中和することができ、そのうちの1種はNL4.3を中和することもできたが、AC10により免疫付与したマウスからは1種の血清のみがAC10を中和することができ、NL4.3は中和しなかった。

【0182】

10

20

30

40

【表 5】

第 5 表 免疫付与したマウス由来の I g G による中和										
AC10 免疫マウス					LR1-C1 免疫マウス					
1	2	3	4	1	2	3	4	5		
VSV	91.8±5.6	88.9±11.2	107.7±10.7	85.0±4.2	94.2±16.3	118.2±6.1	96.4±1.5	128.8±11.2	111.1±16.5	
NL4.3	158.2±0.5	97.0±25.8	105.5±18.9	66.7±30.1	41.2±14.6	125.2±11.7	128.0±41.5	176.2±28.3	66.4±17.3	
AC10	86.1±23.7	53.0±3.7	52.7±5.7	40.0±3.8	36.2±1.8	67.1±9.6	35.0±10.9	55.7±5.4	45.3±5.2	

数字はパーセントリソファーマーゼ活性を示す（カウント±SD）。斜体は中和>50%を示す。

10

20

30

40

【0183】

実施例 3：nAb 4E10 による選択後の L1L2L3R1 ライブラリーの調製および
詳細な特徴付け

In-vitro ランダム変異誘発。HIV-1 AC-10 env への変異は、P 50

C Rに基づいた方法 (G e n e m o r p h I I R a n d o m M u t a g e n e s i s k i t ; S t r a t a g e n e 、カリフォルニア州、米国) を用いて導入した。キメラH I Vウイルス粒子のライブラリーL 1 L 2 L 3は、無作為に変異させたエンベロープをp N L 4 - 3プラスミドへ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た制限酵素部位の導入、ならびに酵素X b a I (N e w E n g l a n d b i o l a b s ; N E B , 英国) およびN o t I (N E B , 英国) を用いた消化によって行った。

【 0 1 8 4 】

クローニングおよびライブラリーウイルスの作製。P C R産物は、R a p i d D N A L i g a t i o n K i t (R o c h e) を製造者の仕様書に従って用いることにより、ベクターp N L 4 . 3内へクローン化した。p N L 4 . 3の組換えベクターは、M A X E f f i c i e n c y (登録商標) S t b l 2 (商標) コンピテント細胞 (I n v i t r o g e n) へ導入し、3 m Lの容量で攪拌しながら3 0 で一晩 (o v e r n i g h t (O N)) 増殖させた。変異性の喪失を避けるために幾つかの形質転換を同時に行い、これらを混合して大量増幅させた (2 5 0 m L 、 3 0 、攪拌しながらO N) 。インキュベーション後に2 0 μ Lをプレートにまき、P u r e Y i e l d (商標) P l a s m i d M a x i p r e p S y s t e m (P r o m e g a) を用いてプラスミドDNAを精製した。産物をX b a IおよびN o t Iによってさらに消化し、エンベロープ遺伝子の存在を確認した。陽性の場合、クローンを配列決定するか、かつ/またはトランスフェクションに使用した。p N L 4 . 3コンストラクトを用いた2 9 3 T細胞への一過性の共トランスフェクションにより、ウイルスを産生させた。トランスフェクション後2日目にウイルス粒子を含む細胞培養上清を回収し、A m i c o n (登録商標) U l t r a c e n t r i f u g a l f i l t e r u n i tを用いてウイルス粒子を濃縮した。ウイルス粒子をリン酸緩衝食塩水 (P B S) 中に再懸濁した。

10

20

【 0 1 8 5 】

ウイルス粒子捕捉アッセイ (V C A) 。マイクロタイターウェルを、ポリクロナル抗F c (1 0 0 μ l のP B S中、5 μ g / m L) により、4 にて一晩コートした。ウェルをP B S中の3 %ウシ血清アルブミン (B S A) により、3 7 にて1時間ブロックした。ライブラリー由来のウイルス1 0 0 μ l (1 0 0 0 n g / m L) を、固定化抗F cで予めコートされ、ブロックされたマイクロタイターウェルへ加えた。5 μ Lの捕捉4 E 1 0 M A b (1 0 0 n g / m L) を対応するウェルに加え、プレートを3 7 にて攪拌 (4 5 0 r . p . m) しながらインキュベートした。2時間のインキュベーション後にウェルをP B Sによって6回洗浄し、p 2 4の酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) によってウイルス当量を定量するか、またはH i g h P u r e V i r a l R N A K i t (R o c h e) を製造者の指示に従って用いることにより、R N Aを抽出した。

30

【 0 1 8 6 】

ネステッドR T - P C RによるH I V - 1 e n v R N Aの増幅。分離したH I V - 1 e n v R N Aを、R T - P C Rキット (G e n e A m p (登録商標) G o l d R N A P C R R e a g e n t K i t , A p p l i e d B i o s y s t e m s) 、およびE x p a n d H i g h F i d e l i t y P C R S y s t e m (R o c h e) を用いた逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) によって増幅した。8 μ Lの量の鋳型R N AをR T - P C R反応に用い、R N Aをプライマー1 0 2 (逆方向) によって5 0 にて2 0分間逆転写した。5 μ Lの量のc D N Aからプライマー1 0 1 (順方向) および1 0 4 (逆方向) を用い、それに続いて2 μ Lの量の鋳型からプライマー1 7 9 (順方向) および1 8 0 (逆方向) を用いたネステッドP C Rによってe n v領域を増幅した。両方のe n v増幅P C Rの条件は以下のとおりであった：9 4 2分を1サイクル；9 4 2分、5 5 1分、および7 2 3分を3 5サイクル；7 2 7分を1サイクル；および4 にて保持。得られたアンプリコン (2 5 8 3 b p) を、1 K b分子量マーカーと共に、S Y B R (登録商標) S a f e D N A g e l s t a i nによって染色した1 . 0 %アガロースゲル内で電気泳動した。

40

【 0 1 8 7 】

50

クローニングおよびライブラリー L 1 L 2 L 3 R 1。PCR 産物の p N L 4 . 3 ベクター内へのクローニング、およびそれぞれによる S t b l 2 コンピテント細胞の形質転換は上記のように行った。Q I A p r e p S p i n M i n i p r e p K i t (Q i a g e n) を用いてプラスミド DNA を精製した後、X b a I および N o t I によりさらに消化して、エンベロープ遺伝子の存在を確認した。M a b 4 E 1 0 による選択後に得たこの新規ライブラリーを、L 1 L 2 L 3 R 1 と命名した。

【 0 1 8 8 】

ディープシーケンシング。次に全般的手順の 1 0 . に記載したディープシーケンシングを用いて、ライブラリー L 1 L 2 L 3 R 1 を詳細に特徴付けた (図 6 ~ 1 2 を参照されたい) 。

【 0 1 8 9 】

本明細書において、上で言及したすべての刊行物は、その全体が参照によって本明細書に取り込まれる。

【 0 1 9 0 】

上記の発明は、明確さと理解のために幾つかの詳細な内容を記載しているが、この開示を読んだ当業者は、本発明の真の範囲および添付の請求項から逸脱することなく、形態および細部に様々な変更が為されてよいことを理解するであろう。

【 図 1 】

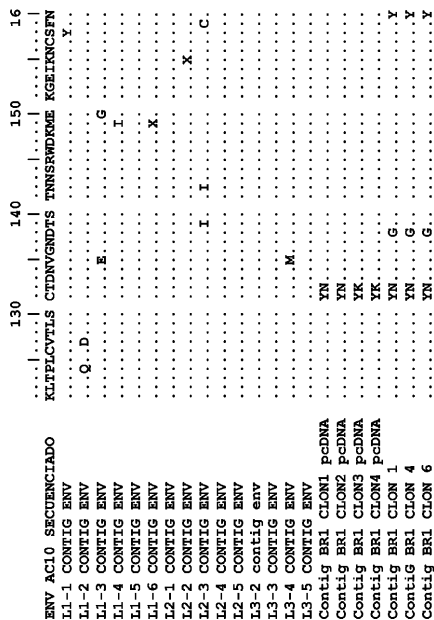


FIG. 1

【 図 2 A 】

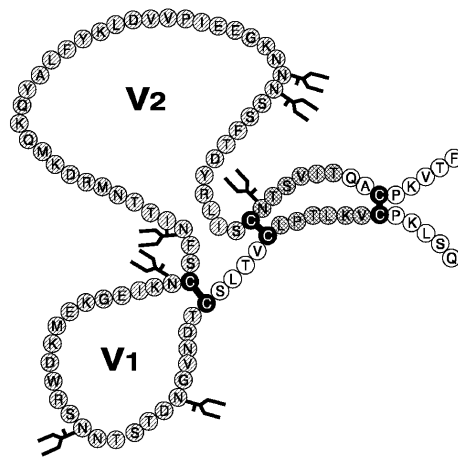


FIG. 2A

【図 4 C】

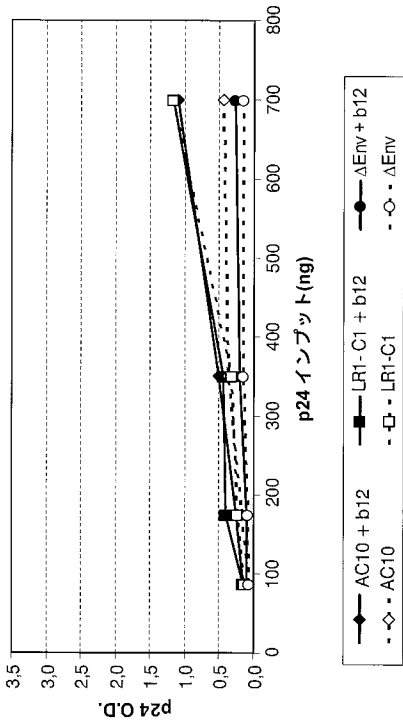


FIG.4C

【図 5 B】

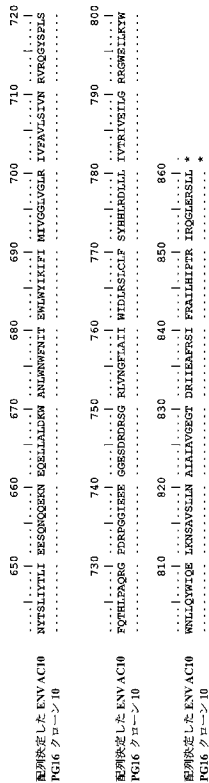


FIG. 5 (Cont.)

【図 5 A】

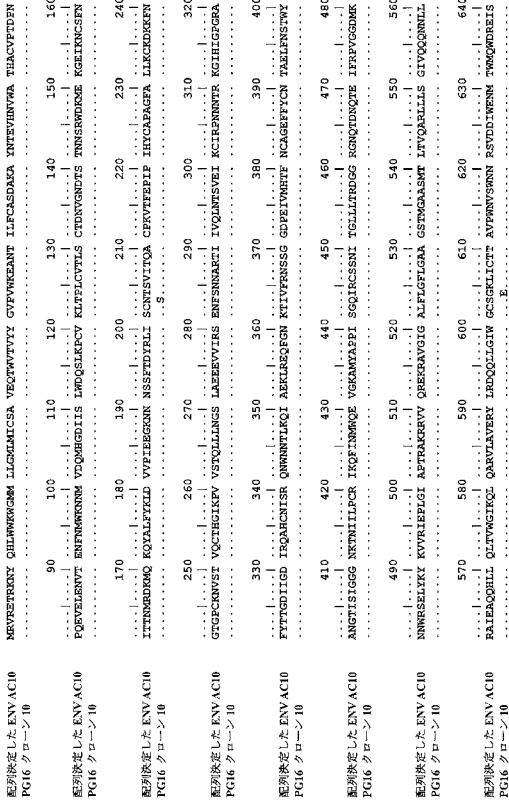


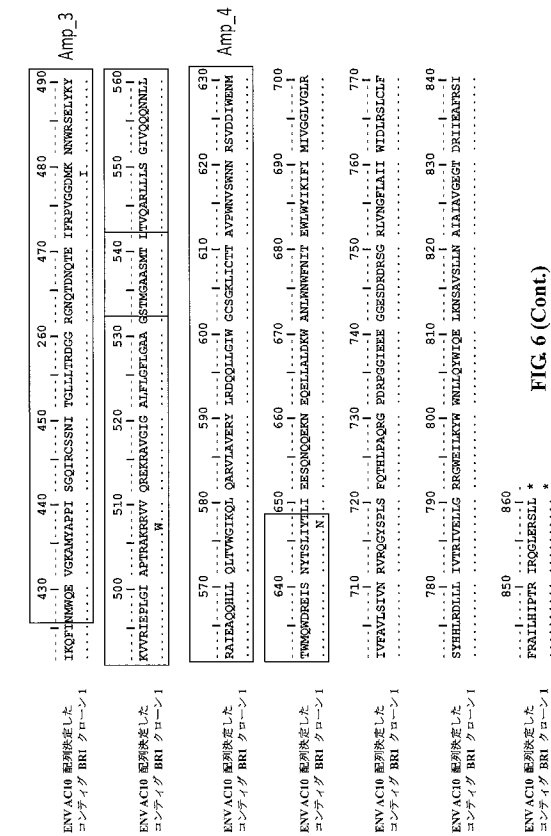
FIG.5

【図 6 A】



FIG.6

【図 6 B】



710720730740750760770

IVFVLSTVN RVKQXSPIS FQTHLPQNG PDAPSGIEE GSESDRDSQ RVNGFIAYI WIDISLCIF

780790800810820830840

STHRLNDILL IVIRIVELLG RQWELIATV WMLQWIGE LKNSVSLIN AINAVGEGT DRIDAFREI

850860

FRALHIFPE IQGERSULL *

ENV AC10 配列決定した
コンプライド BRI クローン1

ENV AC10 配列決定した
コンプライド BRI クローン1

ENV AC10 配列決定した
コンプライド BRI クローン1

ENV AC10 配列決定した
コンプライド BRI クローン1

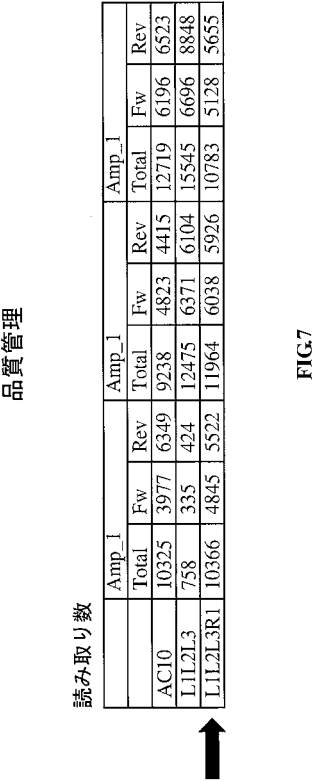
ENV AC10 配列決定した
コンプライド BRI クローン1

ENV AC10 配列決定した
コンプライド BRI クローン1

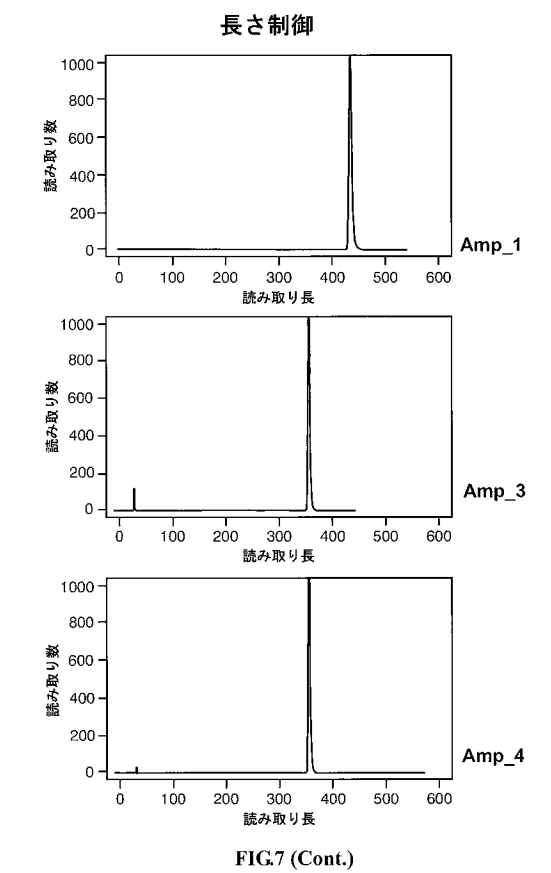
ENV AC10 配列決定した
コンプライド BRI クローン1

FIG. 6 (Cont.)

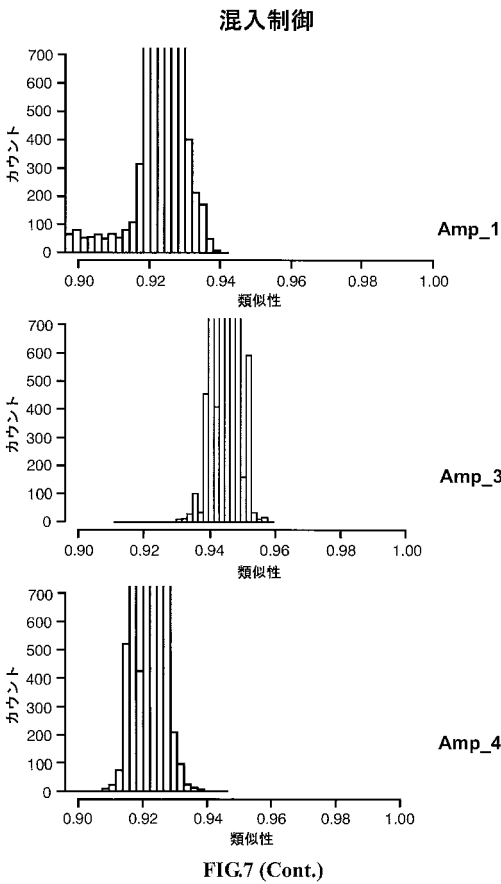
【図 7 A】



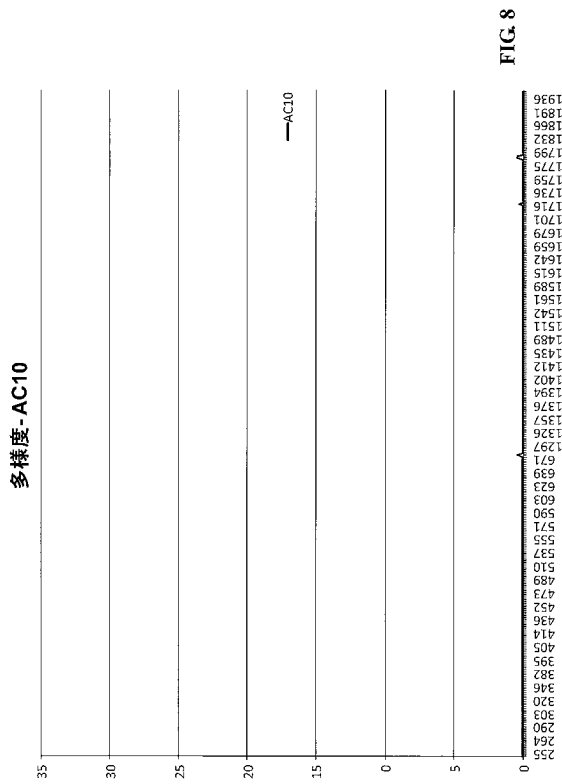
【図 7 B】



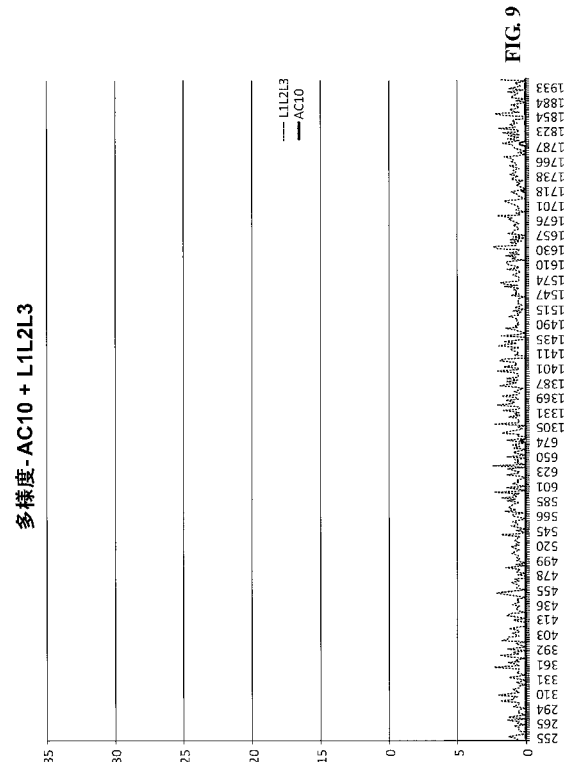
【図 7 C】



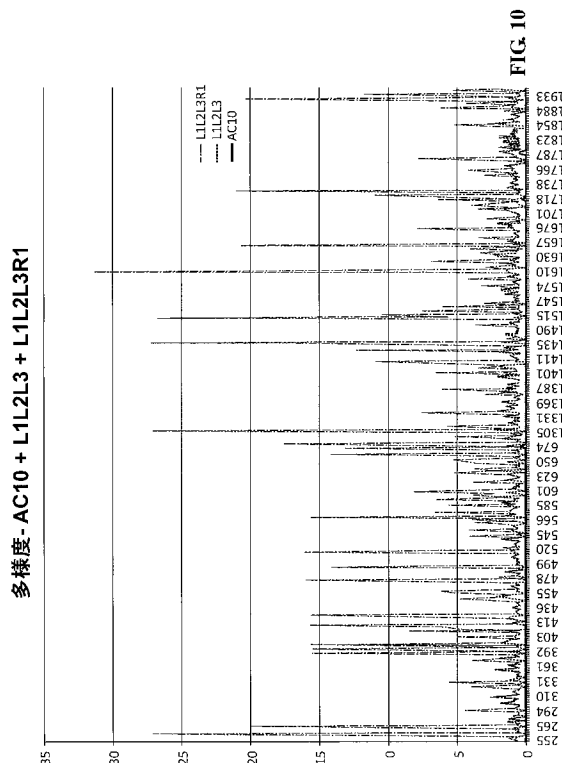
【図 8】



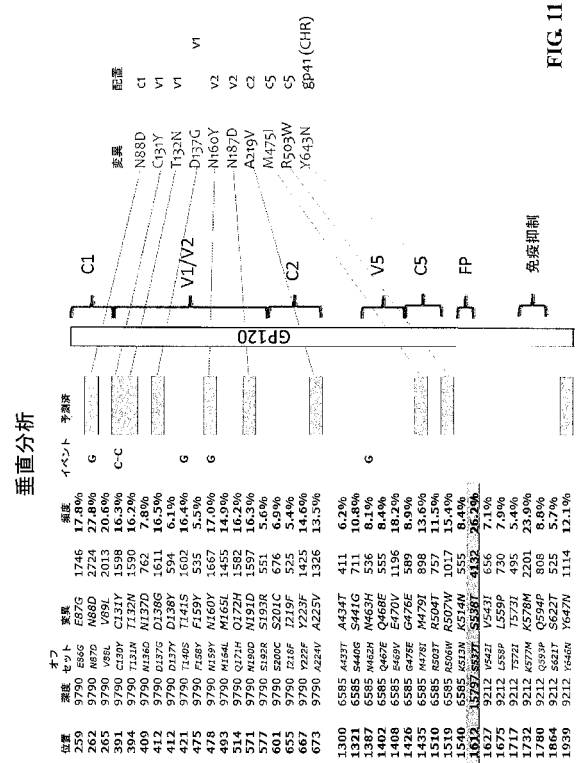
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【 図 1 2 A - 1 】

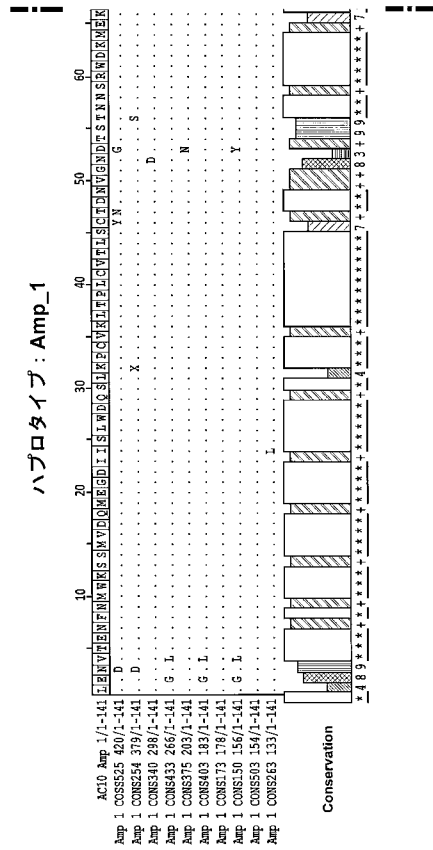


FIG. 12A

【 図 1 2 A - 2 】

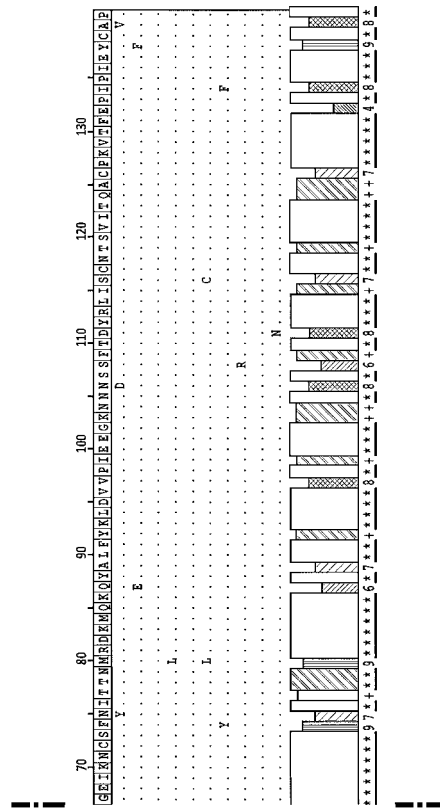


FIG. 12A (Cont.)

【 図 1 2 B - 1 】

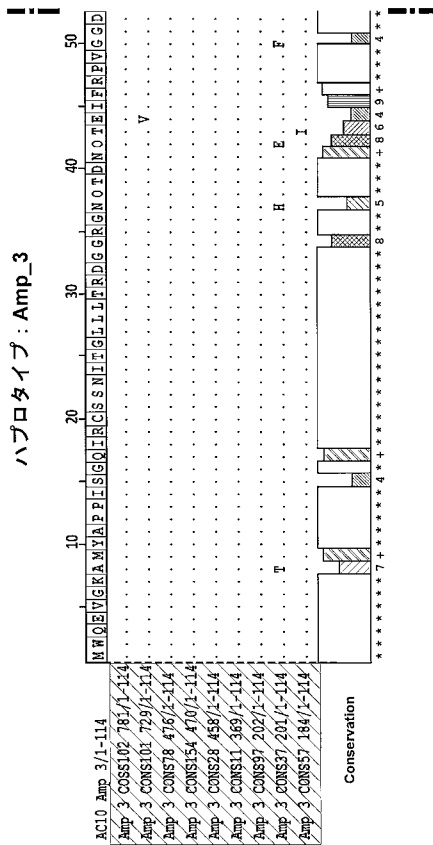
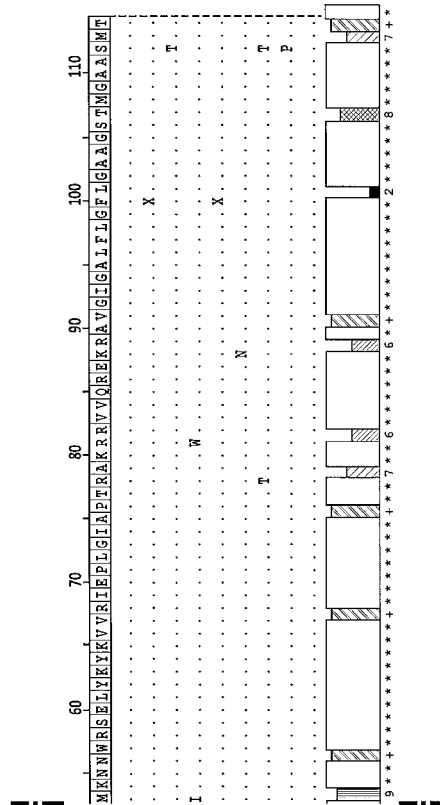


FIG. 12B

【 図 1 2 B - 2 】



【 図 1 2 C - 1 】

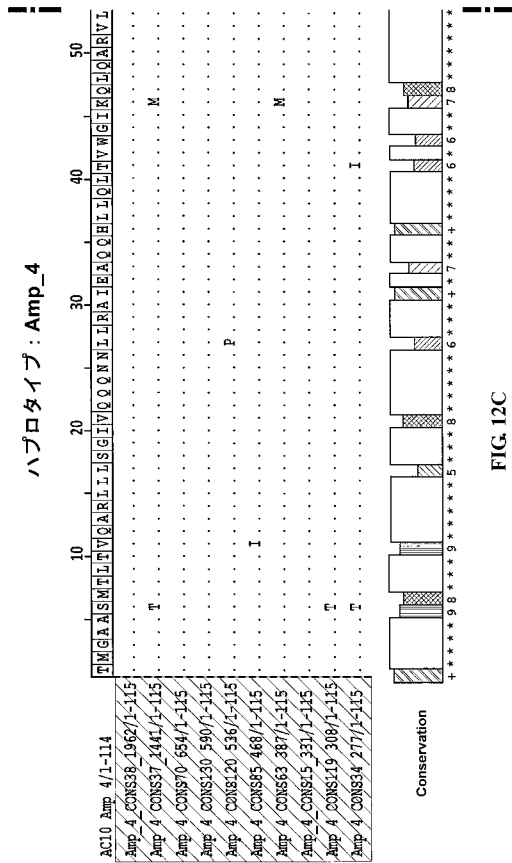


FIG. 12C

【配列表】

2015532591000001.app

【 図 1 2 C - 2 】

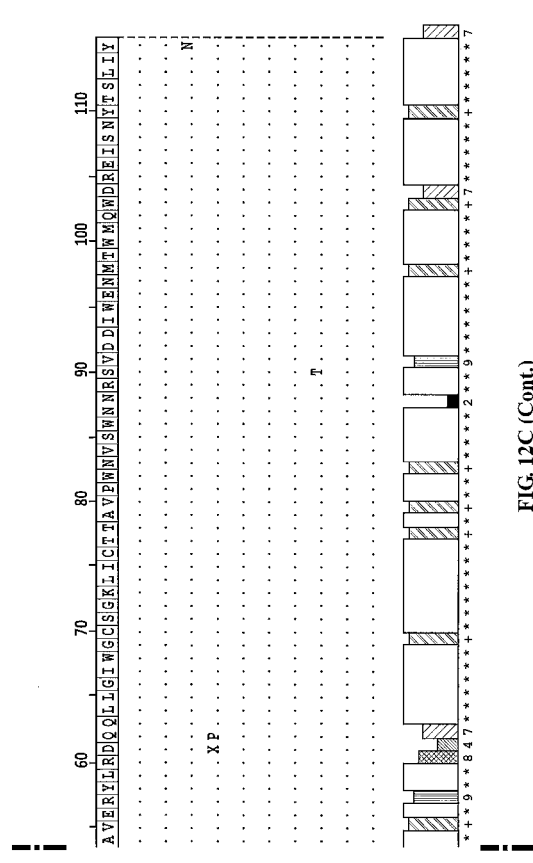


FIG. 12C (Cont.)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2013/067131

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 application No
PCT/EP2013/067131

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/067131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	EP 2 492 279 A1 (ESTEVE LABOR DR [ES]; FUNDACIO PRIVADA INST DE RECERCA DE LA SIDA CAIX) 29 August 2012 (2012-08-29) cited in the application paragraphs [0059], [0039] - [0041] claims 1-6 -----	1-12
X,P	WO 2012/113921 A1 (ESTEVE LABOR DR [ES]; FUNDACIO PRIVADA INST DE RECERCA DE LA SIDA CAIX) 30 August 2012 (2012-08-30) cited in the application page 13, paragraph 2 - page 14, paragraph 1 page 19, lines 10-13 claims 17-27 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2013/067131**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.:

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.:
1-12(completely); 13-27(partially)

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 SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/067131

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2492279	A1	29-08-2012	AU 2012219418 A1 19-09-2013
			CA 2827967 A1 30-08-2012
			CN 103459410 A 18-12-2013
			EP 2492279 A1 29-08-2012
			EP 2678351 A1 01-01-2014
			WO 2012113921 A1 30-08-2012

WO 2012113921	A1	30-08-2012	AU 2012219418 A1 19-09-2013
			CA 2827967 A1 30-08-2012
			CN 103459410 A 18-12-2013
			EP 2492279 A1 29-08-2012
			EP 2678351 A1 01-01-2014
			WO 2012113921 A1 30-08-2012

International Application No. PCT/ EP2013/ 067131

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-12(completely); 13-27(partially)

Relating to a method for identifying immunogens capable of eliciting neutralizing antibodies using lentiviral display. Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Glu at position 87 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a E87G mutation, including SEQ ID NO:22.

2. claims: 13-27(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, including SEQ ID NO:20.

3. claims: 13-27(partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Val at position 89 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a V89L mutation, including SEQ ID NO:22.

4. claims: 13-27(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, including SEQ ID NO:20.

5. claims: 13-27(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, including SEQ ID NO:20.

6. claims: 13, 14, 16-27(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Asn at position 137 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a N137D mutation, including SEQ ID NO:21.

7. claims: 13-27(partially)

International Application No. PCT/ EP2013/ 067131

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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, including SEQ ID NO:20.

8. claims: 13-27(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, including SEQ ID NO:20.

9. claims: 13-27(partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Met at position 165 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a M165L mutation, including SEQ ID NO:22.

10. claims: 13-27(partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Asn at position 191 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a N191D mutation, including SEQ ID NO:20.

11. claims: 13-27(partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Ala at position 225 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a A225V mutation, including SEQ ID NO:20.

12. claims: 13, 14, 16-27(all partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Glu at position 470 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a E470V mutation, including SEQ ID NO:24.

13. claims: 13-27(partially)

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Ser at position 538 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a S538T mutation, including SEQ ID NOs:25 and 27.

14. claims: 13-27(partially)

International Application No. PCT/ EP2013/ 067131

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Subject-matter relating to a variant gp120 comprising at least a mutation of Lys at position 578 with respect to the numbering of SEQ ID NO:2, in particular a K578M mutation, including SEQ ID NO:27.

15. claims: 13, 14, 16-27(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, including SEQ ID NO:28.

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	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 4 0 B 40/08 (2006.01)	C 4 0 B 40/08	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
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 33/569	H
	G 0 1 N 33/53	N

(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, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(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 ヘルマンズ 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 ノゲラ イ フリアン、マルク

スペイン国 エ - 0 8 0 2 4 バルセロナ、4 2 - 4 4、カリェ トレント デ レス フロルス

(72)発明者 バレデス、ロヘル

スペイン国 エ - 0 8 3 9 1 ティアナ、1 8、カリェ アイグエス

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 AA20 BA35 BA61 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11

HA01 HA03 HA11

4B063 QA01 QA13 QA20 QQ10 QQ13 QQ43 QQ79 QR08 QR48 QR62

QR82 QS03 QS36 QX02

4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA45

CA46

4C085 AA03 BA69 CC08 DD62 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA05 CA40 DA75 DA86 EA31

EA53 FA74 GA26

专利名称(译)	HIVGP 120突变体的快速免疫原选择改进		
公开(公告)号	JP2015532591A	公开(公告)日	2015-11-12
申请号	JP2015526998	申请日	2013-08-16
[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德拉赫佳兆业 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德拉赫 - 佳兆业		
[标]发明人	ノゲライフリアンマルク パレデスロヘル		
发明人	ノゲラ イ フリアン、マルク パレデス、ロヘル		
IPC分类号	C12Q1/68 C07K16/10 C07K14/16 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C40B40/08 A61K39/00 A61P31/18 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	C12N15/1055 A61K39/00 A61K2039/575 C07K14/005 C07K16/1063 C12N7/00 C12N2740/16043 C12N2740/16122 C12N2740/16134 C12N2740/16234 C12Q1/6874 G01N33/56988 G01N2333/162 G01N2500/04		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.Z C07K16/10 C07K14/16 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N15/00.A C40B40/08 A61K39/00.H A61P31/18 G01N33/53.D G01N33/569.H G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/AA20 4B024/BA35 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024 /DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA20 4B063/QQ10 4B063/QQ13 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR48 4B063 /QR62 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA72X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065 /CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA69 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA05 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045 /DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	伊奈美稔 田村 庆政		
优先权	2012382328 2012-08-17 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及基于与重组病毒文库结合的快速免疫原选择的改进方法 (RIS) , 所述重组病毒文库包含针对中和抗体呈递的表面多肽的随机变体。 。本发明还涉及根据本发明的RIS方法分离的免疫原在治疗由病毒引起的疾病的药物中的用途, 并用于诊断以鉴定患者的中和抗体。

(21) 出願番号	特願2015-526998 (P2015-526998)	(71) 出願人	500031124
(86) (22) 出願日	平成25年8月16日 (2013. 8. 16)		ラボラトリオス・デル・ドクトル・エステ
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月6日 (2015. 4. 6)		ベ・ソシエダッド・アノニマ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/067131		スペイン、エー08041バルセロナ、ア
(87) 国際公開番号	WO2014/027082		ベニーダ・マレ・デ・ドゥ・デ・モンセラ
(87) 国際公開日	平成26年2月20日 (2014. 2. 20)		ット221番
(31) 優先権主張番号	12382328.8		
(32) 優先日	平成24年8月17日 (2012. 8. 17)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
最終頁に続く			