

(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2004-514406

(P2004-514406A)

(43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A 6 1 K 35/76</b>	A 6 1 K 35/76	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	B
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 K 39/395	J
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	4 C O 8 4
		(全 131 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-579818 (P2001-579818)  
 (86) (22) 出願日 平成13年4月20日 (2001. 4. 20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年10月24日 (2002. 10. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/013031  
 (87) 国際公開番号 W02001/082944  
 (87) 国際公開日 平成13年11月8日 (2001. 11. 8)  
 (31) 優先権主張番号 09/561, 366  
 (32) 優先日 平成12年4月28日 (2000. 4. 28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502385975  
 テイモン・エルエルシー  
 アメリカ合衆国ニュージャージー州070  
 78シヨートヒルズ・ドリソンドライブ3  
 O  
 (74) 代理人 100060782  
 弁理士 小田島 平吉  
 (72) 発明者 ゴールドスタイン, ギデオ  
 アメリカ合衆国ニュージャージー州070  
 78シヨートヒルズ・ドリソンドライブ3  
 O  
 Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50  
 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV-1 の増殖を減じる方法および組成物

## (57) 【要約】

両Bおよび非-BクレードのHIV-1のTatタンパク質の既知の変異体のほとんど(例えば95%より多く)に対する抗体を誘導する組成物は、式: R<sub>1</sub>-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>1,2</sub>-R<sub>2</sub>[配列番号8]のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体を含む。この式に従い、Y<sub>7</sub>はArg、Lys、SerまたはAsnである; X<sub>9</sub>はGluまたはAspであり; Z<sub>1,2</sub>はLysまたはAsnであり; R<sub>1</sub>は水素、水素、低級アルキル、低級アルカノイルまたは低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1~約5個の間のアミノ酸配列であり; そしてR<sub>2</sub>は、遊離ヒドロキシル、アミドまたはアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列である。この組成物中、2つの変異体の少なくとも1つはY<sub>7</sub>でArgを、そしてZ<sub>1,2</sub>でLysを含み、そして2つの変異体の少なくとも第2では、Y<sub>7</sub>はAsnであり、そしてZ<sub>1,2</sub>はAsnである。ワクチンおよび医薬組成物は、多数の抗原性ペプチドを付随するか、または組換えタンパク質の1つとして、キャリアタンパク質を付随する1以上のそのようなペプチドを含むことができる。この組み合わせに他の任意の免疫原を付加することは、多数の株およびHIV-1 Tatタンパク質の変異体と交差反応する霊長類の抗-Tat抗体の誘導に有用である。ワクチンおよび医薬組成物は、受動療法に使用するためのペプチド組成物により誘導される霊長類抗体を含むことができる。診断用組成物および使用は、予防接種した個体の免疫状態の評価について記載する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

式

R<sub>1</sub> - A s p - P r o - Y<sub>7</sub> - L e u - X<sub>9</sub> - P r o - T r p - Z<sub>1 2</sub> - R<sub>2</sub> 配列

番号 8

式中、Y<sub>7</sub> は、A r g、L y s、S e r および A s n から成る群から選択され；式中、X<sub>9</sub> は、G l u および A s p から成る群から選択され；式中、Z<sub>1 2</sub> は、L y s および A s n から成る群から選択され；式中、R<sub>1</sub> は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよび低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1～約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され； 10式中、R<sub>2</sub> は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択され；そして式中、上記2つの変異体の少なくとも1つにおいて、Y<sub>7</sub> は A r g であり、そして Z<sub>1 2</sub> は L y s であり、そして該2つの変異体の少なくとも第2において、Y<sub>7</sub> は A s n であり、そして Z<sub>1 2</sub> は A s n である、

のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体を含んで成る組成物。

## 【請求項2】

R<sub>1</sub> が V a l であり、配列 V a l - A s p - P r o - Y<sub>7</sub> - L e u - X<sub>9</sub> - P r o - T r p - Z<sub>1 2</sub> 配列番号 20  
37を生じる請求項1に記載の組成物。

## 【請求項3】

R<sub>1</sub> が X<sub>2</sub> - P r o - V a l であり、ここで X<sub>2</sub> が G l u および A s p から成る群から選択され、低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された配列 X<sub>2</sub> - P r o - V a l - A s p - P r o - Y<sub>7</sub> - L e u - X<sub>9</sub> - P r o - T r p - Z<sub>1 2</sub> [配列番号38]を生じる請求項1に記載の組成物。

## 【請求項4】

R<sub>2</sub> がアミドで場合により置換された - H i s - P r o - G l y - S e r - 配列番号16である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項5】

少なくとも3個以上のアミノ酸配列を含んで成り、該配列が、

R<sub>1</sub> - A s p - P r o - A r g - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - R<sub>2</sub> 配列  
番号17R<sub>1</sub> - A s p - P r o - A s n - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R<sub>2</sub> 配列  
番号18

ならびに：

R<sub>1</sub> - A s p - P r o - L y s - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - R<sub>2</sub> 配列  
番号19R<sub>1</sub> - A s p - P r o - L y s - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R<sub>2</sub> 配列  
番号22 40R<sub>1</sub> - A s p - P r o - S e r - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - R<sub>2</sub> 配列  
番号20R<sub>1</sub> - A s p - P r o - S e r - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R<sub>2</sub> 配列  
番号24R<sub>1</sub> - A s p - P r o - A s n - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - R<sub>2</sub> 配列  
番号21およびR<sub>1</sub> - A s p - P r o - A s n - L e u - A s p - P r o - T r p - A s n - R<sub>2</sub> 配列  
番号23から成る群から選択される1以上の配列、  
を含んで成る、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 6】

さらに上記アミノ酸配列の少なくとも7個を含んで成る、請求項5に記載の組成物。

## 【請求項 7】

上記配列の8個すべてを含んで成る、請求項5に記載の組成物。

## 【請求項 8】

上記ペプチドまたはポリペプチドが合成的に生成される、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 9】

上記ペプチドまたはポリペプチドが組換え的に生成される、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 10】

上記ペプチドの1以上が、キャリアータンパク質に結合した合成ペプチドとして発現する、請求項1に記載の組成物。 10

## 【請求項 11】

上記ペプチドの1以上が、場合によりキャリアータンパク質に結合した多抗原性ペプチドとして発現する、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 12】

1以上の選択したペプチドがキャリアータンパク質と枠内で融合した組換え的に生産されたタンパク質内で発現する、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 13】

上記キャリアータンパク質が、大腸菌 (*E. coli*) DnaKタンパク質、GSTタンパク質、マイコバクテリア熱ショックタンパク質 70、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、ガラクトキナーゼ、ユビキチン、 $\lambda$ -接合因子、 $\lambda$ -ガラクトシダーゼおよびインフルエンザ NS-1タンパク質から成る群から選択される、請求項10ないし12のいずれかに記載の組成物。 20

## 【請求項 14】

(a) 式  $R_1 - Asp - Pro - Y_7 - Leu - X_9 - Pro - Trp - Z_{1,2} - R_2$  配列番号 8、

式中、 $Y_7$  は、Arg、Lys、SerおよびAsnから成る群から選択され；式中、 $X_9$  は、GluおよびAspから成る群から選択され；式中、 $Z_{1,2}$  は、LysおよびAsnから成る群から選択され；式中、 $R_1$  は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよび低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1~約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され；式中、 $R_2$  は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択され；そして式中、上記2つの変異体の少なくとも1つにおいて、 $Y_7$  はArgであり、そして $Z_{1,2}$  はLysであり、そして該2つの変異体の少なくとも第2において、 $Y_7$  はAsnであり、そして $Z_{1,2}$  はAsnである、 30

のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体；ならびに

(b) 式  $R_3 - Lys - X_{4,2} - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - R_4$  配列番号 5、

式中、 $X_{4,2}$  は、GlyまたはAlaから成る群から選択され；式中、 $R_3$  は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよび低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1~約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され； 40

式中、 $R_4$  は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列（塩基性アミノ酸 - Lys - Arg - Arg - を除く）から成る群から選択される、

の少なくとも1つのペプチドまたはポリペプチドを含んで成る組成物。

## 【請求項 15】

上記ペプチドまたはポリペプチドが合成的に生成される、請求項14に記載の組成物。

## 【請求項 16】

上記ペプチドまたはポリペプチドが組換え的に生成される、請求項14に記載の組成物。

## 【請求項 17】

上記ペプチドの1以上が、キャリアータンパク質に結合した合成ペプチドとして発現する、請求項14に記載の組成物。

【請求項18】

上記ペプチドの1以上が、場合によりキャリアータンパク質に結合した多抗原性ペプチドとして発現する、請求項14に記載の組成物。

【請求項19】

1以上の選択したペプチドがキャリアータンパク質と場合により枠内で融合した組換え的に生産されたタンパク質内で発現する、請求項14に記載の組成物。

【請求項20】

上記キャリアータンパク質が、大腸菌 (*E. coli*) DnaKタンパク質、GSTタンパク質、マイコバクテリア熱ショックタンパク質70、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、ガラクトキナーゼ、ユビキチン、 $\beta$ -接合因子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびインフルエンザNS-1タンパク質から成る群から選択される、請求項17、18または19に記載の組成物。

【請求項21】

請求項1に記載の組成物、製薬学的に許容されるキャリアーおよび任意のアジュバントを含んで成る医薬組成物。

【請求項22】

個体を、種々のHIV-1株またはサブタイプに由来するHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を活発に誘導する請求項1に記載の組成物の有効量に暴露する工程を含んで成る、抗-HIV-1 Tat抗体の誘導法。

【請求項23】

免疫不全のヒトにおいてHIV-1増殖を減じるために有用な組成物の調製法であって：

(a) 霊長類を請求項1に記載の組成物で免疫感作し；そして

(b) 該免疫感作した哺乳動物から滅菌状態で抗体を単離し、そして精製する、ことを含んで成り、ここで該抗体は該組成物の成分を形成する上記方法。

【請求項24】

上記の単離された抗体が、単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、および抗体フラグメントから成る群から選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

Tat免疫原に対する免疫感作により誘導される抗体の存在かつまたは力価を測定する方法であって：

(A) 免疫感作した個体に由来する生物サンプルを、固体支持体に結合した請求項1に記載のペプチドまたはポリペプチド組成物と接触させ；

(B) 支持体を洗浄して、該生物サンプルから該配列に結合していないものすべてを排除し；

(C) 該支持体と、検出可能な標識を結合した試薬とを接触させ、ここで該試薬は該固体支持体上の該配列と生物サンプル中の抗体との間の結合を検出し、そして該標識は検出可能なシグナルを生成する、ことを含んで成る上記方法。

【請求項26】

式 - Asp - Pro - Y<sub>7</sub> - Leu - X<sub>9</sub> - Pro - Trp - Z<sub>1,2</sub> - 配列番号9  
 式中、Y<sub>7</sub>は、Arg、Lys、SerおよびAsnから成る群から選択され；式中、X<sub>9</sub>は、GluおよびAspから成る群から選択され；式中、Z<sub>1,2</sub>は、LysおよびAsnから成る群から選択される、  
 のエピトープに特異的に結合する抗体。

【請求項27】

単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗

体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、および抗体フラグメントから成る群から選択される、請求項 26 に記載の抗体。

【請求項 28】

請求項 26 に記載の少なくとも 1 つの抗体を含んで成る抗体組成物。

【請求項 29】

式  $R_1 - Asp - Pro - Y_7 - Leu - X_9 - Pro - Trp - Z_{1,2} - R_2$  配列番号 8

式中、 $Y_7$  は、Arg、Lys、Ser および Asn から成る群から選択され；式中、 $X_9$  は、Glu および Asp から成る群から選択され；式中、 $Z_{1,2}$  は、Lys および Asn から成る群から選択され；式中、 $R_1$  は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよび低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された 1 ~ 約 5 個の間のアミノ酸の配列から成る群から選択され；式中、 $R_2$  は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された 1 または最高約 5 個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択され；そして式中、上記 2 つの変異体の少なくとも 1 つにおいて、 $Y_7$  は Arg であり、そして  $Z_{1,2}$  は Lys であり、そして該 2 つの変異体の少なくとも第 2 において、 $Y_7$  は Asn であり、そして  $Z_{1,2}$  は Asn である、  
のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも 2 つの変異体に特異的に結合する少なくとも 2 つの異なる抗体を含んで成る抗体組成物。

10

【請求項 30】

多数の HIV-1 株に由来する HIV-1 Tat タンパク質エピトープに結合する 2 以上の異なる抗体の混合物を含んで成る、請求項 29 に記載の組成物。

20

【請求項 31】

上記抗体が、単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、抗体フラグメントおよびそれらの混合物から成る群から選択される、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 32】

アミノ酸配列  $Lys - X_{4,2} - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys -$  配列番号 10 (ここで  $X_{4,2}$  は Gly および Ala から成る群から選択される) を有するエピトープに特異的に結合する抗体であって、該抗体はアミノ酸配列  $- Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys -$  配列番号 11 を有するエピトープを認識する抗体とは異なる、上記抗体。

30

【請求項 33】

単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、および抗体フラグメントから成る群から選択される、請求項 32 に記載の抗体。

【請求項 34】

請求項 32 に記載の少なくとも 1 つの抗体を含んで成る抗体組成物。

【請求項 35】

請求項 26 ないし 34 のいずれかに記載の抗体または抗体組成物、および製薬学的に許容されるキャリアーおよび任意のアジュバントを含んで成る医薬組成物。

40

【請求項 36】

ヒトに請求項 26 ないし 34 のいずれかに記載の抗体または抗体組成物を投与する工程を含んで成る、HIV-1 のウイルスレベルを下げる方法。

【請求項 37】

式  $R_1 - Asp - Pro - Y_7 - Leu - X_9 - Pro - Trp - Z_{1,2} - R_2$  配列番号 8

式中、 $Y_7$  は、Arg、Lys、Ser および Asn から成る群から選択され；式中、 $X_9$  は、Glu および Asp から成る群から選択され；式中、 $Z_{1,2}$  は、Lys および Asn から成る群から選択され；式中、 $R_1$  は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよ

50

び低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1～約5個の間のアミノ酸の配列から成る群から選択され；式中、R<sub>2</sub>は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択され；そして式中、上記2つの変異体の少なくとも1つにおいて、Y<sub>7</sub>はArgであり、そしてZ<sub>1,2</sub>はLysであり、そして該2つの変異体の少なくとも第2において、Y<sub>7</sub>はAsnであり、そしてZ<sub>1,2</sub>はAsnである、  
のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体を連続的にコードする核酸配列を含んで成る合成遺伝子。

【請求項38】

上記ペプチドまたはポリペプチドが、キャリアタンパク質に融合されている請求項37に記載の合成遺伝子。 10

【請求項39】

アミノ酸配列をコードする各核酸配列がスペーサー配列により分けられている、請求項37に記載の合成遺伝子。

【請求項40】

請求項37に記載の合成遺伝子、製薬学的に許容されるキャリアーおよび任意のアジュバントを含んで成る医薬組成物。

【請求項41】

個体を、種々のHIV-1株またはサブタイプに由来するHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を活発に誘導する請求項37に記載の合成遺伝子の有効量に暴露する工程を含んで成る、抗-HIV-1 Tat抗体の誘導法。 20

【請求項42】

免疫不全のヒトにおいてHIV-1増殖を減じるために有用な組成物の調製法であって：

(a) 霊長類を請求項37に記載の合成遺伝子で免疫感作し；そして

(b) 該免疫感作した霊長類から滅菌状態で抗体を単離し、そして精製する、

ことを含んで成り、ここで該抗体は該組成物の成分を形成する上記方法。

【請求項43】

上記の単離された抗体が、単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、および抗体フラグメントから成る群から選択される、請求項42に記載の方法。 30

【請求項44】

宿主細胞中で上記合成遺伝子産物の発現を支配し、そして制御する調節核酸配列に操作可能に連結された、請求項37に記載の合成遺伝子を含んで成る合成分子。

【請求項45】

プラスミドである請求項44に記載の分子。

【請求項46】

請求項44に記載の合成分子、製薬学的に許容されるキャリアーおよび任意のアジュバントを含んで成る、医薬組成物。

【請求項47】

個体を、種々のHIV-1株またはサブタイプに由来するHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を活発に誘導する請求項44に記載の合成分子の有効量に暴露する工程を含んで成る、抗-HIV-1 Tat抗体の誘導法。 40

【請求項48】

免疫不全のヒトにおいてHIV-1増殖を減じるために有用な組成物の調製法であって：

(a) 霊長類を請求項44に記載の分子で免疫感作し；そして

(b) 該免疫感作した霊長類から滅菌状態で抗体を単離し、そして精製する、

ことを含んで成り、ここで該抗体は該組成物の成分を形成する上記方法。

【請求項49】

上記の単離された抗体が、単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ 50

抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、および抗体フラグメントから成る群から選択される、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

(a) 請求項1に記載の少なくとも2つのペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る第1合成遺伝子、該遺伝子はキャリアタンパク質に場合により融合しており；または

(b) 宿主細胞中で上記合成遺伝子産物の発現を支配し、そして制御する調節核酸配列に操作可能に連結された(a)の合成遺伝子を含んで成る合成分子、  
を含んで成る微生物。

10

【請求項51】

宿主細胞中で上記遺伝子産物の複数のコピーを発現することができる組換えウイルス(該ウイルスはヒトに対して非病原性である)、および宿主中で該遺伝子産物の複数のコピーを発現することができる片利共生細菌から成る群から選択される、請求項50に記載の微生物。

【請求項52】

請求項51に記載の微生物、製薬学的に許容されるキャリアーおよび任意のアジュバントを含んで成る医薬組成物。

【請求項53】

個体を、種々のHIV-1株またはサブタイプに由来するHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を活発に誘導する請求項50に記載の微生物の有効量に暴露する工程を含んで成る、抗-HIV-1 Tat抗体の誘導法。

20

【請求項54】

免疫不全のヒトにおいてHIV-1増殖を減じるために有用な組成物の調製法であって：

(a) 哺乳動物を請求項50に記載の微生物で免疫感作し；

(b) 該免疫感作した哺乳動物から滅菌状態で抗体を単離し、そして精製する、ことを含んで成り、ここで該抗体は該組成物の成分を形成する上記方法。

【請求項55】

上記の単離された抗体が、単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、および抗体フラグメントから成る群から選択される、請求項54に記載の方法。

30

【請求項56】

式 R<sub>1</sub>-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>1,2</sub>-R<sub>2</sub> 配列番号8

式中、Y<sub>7</sub>は、Arg、Lys、SerおよびAsnから成る群から選択され；式中、X<sub>9</sub>は、GluおよびAspから成る群から選択され；式中、Z<sub>1,2</sub>は、LysおよびAsnから成る群から選択され；式中、R<sub>1</sub>は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよび低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1~約5個の間のアミノ酸の配列から成る群から選択され；式中、R<sub>2</sub>は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択され；そして式中、上記2つの変異体の少なくとも1つにおいて、Y<sub>7</sub>はArgであり、そしてZ<sub>1,2</sub>はLysであり、そして該2つの変異体の少なくとも第2において、Y<sub>7</sub>はAsnであり、そしてZ<sub>1,2</sub>はAsnである、  
のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体をコードする核酸配列を含む哺乳動物宿主細胞。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

発明の分野

50

本発明は、一般に症候的または無症候的な感染患者において、ヒト免疫不全症ウイルス - 1 (HIV - 1) の増殖を阻害するために、ならびに以前に感染したことが無い個体において一次感染後の HIV - 1 増殖を弱めるために有用な組成物および方法、すなわち AIDS への進行を最少とすることに関する。

#### 発明の背景

1 型ヒト免疫不全症ウイルス (HIV - 1) の処置に対する様々な取り組みは、ウイルスの転写に必須なタンパク質 (Tat) を生成する HIV - 1 のトランス活性化 (tat) 遺伝子に集中した。この tat 遺伝子およびそのタンパク質は配列決定され、そして HIV の推薦された処置への関与が調査された [例えば、米国特許第 5, 158, 877 号; 同第 5, 238, 882 号; および同第 5, 110, 802 号明細書; それぞれ 1992 年 5 月 14 日、1991 年 7 月 25 日、1991 年 7 月 11 日、そして 1987 年 5 月 21 日に出版された国際公開第 92/07871 号、同第 91/10453 号、同第 91/09958 号および同第 87/02989 号明細書を参照にされたい]。Tat タンパク質は細胞外に放出され、別の感染細胞に取り込まれて細胞中の HIV - 1 の転写を強化し、そして非感染細胞により宿主細胞の遺伝子の活性化を改変させることに利用できる。Tat は細胞をウイルスに感染され易くする。細胞による Tat の取り込みは大変強力であり、そしてタンパク質の短い塩基性配列により媒介されることが報告された [S. Fawcett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 664 - 668 (1994)]。

10

#### 【0002】

有力な AIDS ワクチンとして HIV - 1 Tat タンパク質を用いた免疫感作が盛んに調査されている。報告された研究では HXB/LAV HIV - 1 Tat 配列は、組換えタンパク質 [A. Cafaro et al., Nat. Med., 5: 643 - 650 (1999)]、DNA ワクチン [S. Calarota et al., Lancet, 351: 1320 - 5 (1998)]、不活性化タンパク質 (Tat トキソイド) [S. S. Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 (19): 10842 - 10847 (1999); A. Gringeri et al., J. Hum. Virol., 1: 293 - 8 (1998)]、または不活性化 Tat を発現する DNA ワクチン [E. Caselli et al., J. Immunol., 162: 5631 - 5638 (1999)] のいずれかの免疫原として使用された。完全な Tat 配列を用いた免疫感作は、細胞性および体液性免疫の両方を誘導した。M. C. Rhee et al., J. Acquir Immune Defic. Syndr. Hum. Virol. 10: 408 - 416 (1995); C. J. Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8116 - 8120 (1997); およびその他も参照にされたい]。

20

30

#### 【0003】

1992 年 9 月 3 日に公開された国際公開第 92/14755 号明細書は、Tat タンパク質および Tat タンパク質に結合することができるインテグリン細胞表面レセプターに関する。インテグリンに結合する 2 つの Tat 配列が同定されている: - Arg - Lys - Lys - Arg - Arg - Gln - Arg - Arg - Arg - [配列番号 1] ならびに - Gly - Arg - Gly - Asp - Ser - Pro - [配列番号 2]。これらの配列はインテグリンに関して優勢な結合部位である塩基性領域またはドメインである。この明細書はこれらの Tat 配列に対応する多数のペプチドおよび対応するインテグリンが、抗体が適当なインテグリンに対するように、インビトロで細胞の Tat コートプレートへの結合を遮断することを示す。しかしこの明細書は、これらの試薬が細胞による機能的 Tat の取り込みを遮断しないことと示し (国際公開第 92/14755 号明細書の実施例 9 を参照にされたい)、すなわち HIV 感染における治療的利益に関して提案された作用機作を無効にする。この国際出願に記載される Tat 配列は、本発明のペプチド免疫原とは異なる。

40

#### 【0004】

50

Tatタンパク質に対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体は動物中で容易に生成され、そしてインビトロでTatタンパク質の取り込みを遮断することが示された[例えば、D. Brake et al, J. Virol., 64:962(1990); D. Mann et al, EMBO J., 10:1733(1991); J. Abraham et al. 同上; P. Auron et al, 同上; M. Jaye et al, 同上; G. Zauli et al, 同上を参照にされたい]。より最近の報告では、組織培養基に加えたTatタンパク質に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体が、インビトロのHIV-1感染を弱めることを示した[L. Steinaa et al, Arc h. Virol., 139:263(1994); M. Re et al, 同上; およびG. Zauli et al, J. Acq. Imm. Def. Syndr. Hum. Retr ovir ol., 10:306(1995)]。

10

## 【0005】

発明者が所有する公開[G. Goldstein, Nature Med., 2:960(1996); および1995年11月30日に公開された国際公開第95/31999号明細書]は、感染細胞からのHIV-1 Tatタンパク質の分泌および感染および非感染細胞による取り込みがHIV-1の感染性に重要であったことを示す証拠を検討した。以前の研究では、Tatタンパク質に対する抗体がTatの取り込みをインビトロで遮断し、そしてインビトロの感染性を阻害することも示した。哺乳動物の能動免疫感作は、有力なAIDSワクチンとしてHIV-1 Tatタンパク質に対する抗体を誘導することを示唆した。G. Goldstein, et al, 「合成HIV-1 Tatペプチドで免疫感作し、そしてキメラサルノヒト免疫不全症ウイルス(SHIV<sub>33</sub>)を感染させたアカゲザルにおける慢性ウイルス血症の最少化(Minimization of chronic plasma viremia in rhesus macaques immunized with synthetic HIV-1 Tat peptides and infected with a chimeric simian/human immunodeficiency virus(SHIV<sub>33</sub>))」、Vaccine, 18:2789(2000)。

20

## 【0006】

発明者による他の公開、1999年1月21日に公開された国際公開第99/02185号明細書および1999年4月6日に発効された米国特許第5,891,994号明細書(両方とも引用により本明細書に編入する)は、ウサギの免疫系によりエピトープと認識されたTat配列を使用したHIV-1感染の処置および防止における新たな概念を明らかにした。上記に検討したこれまでの開示とは異なり、これらの公開は、以下の: - Asp-Pro-X<sub>7</sub>-Leu-Glu-Pro-[配列番号3]またはR<sup>1</sup>-Val-Asp-Pro-X<sub>7</sub>-Leu-Glu-Pro-R<sup>2</sup>[配列番号4](ここで、X<sub>7</sub>はArg、Lys、SerまたはAsnである)のようなTatアミノ酸残基4(または5)から10に広がる「エピトープI」配列を含んで成る少なくとも2つの、そして好ましくは4つのすべてのTatペプチドまたはポリペプチドを必要とする治療用および免疫原の組み合わせに関する。そのような組成物は、ほとんどのHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を誘導し、そしてHIV-1の増殖を減じる。この公開によれば、式R3-Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R4[反応番号5](式中、X<sub>42</sub>はGlyまたはAlaから成る群から選択される)のTatアミノ酸残基41-50に広がる「エピトープII」ペプチドまたはポリペプチドを含んで成るある種の他のTatタンパク質をこの組成物に加えることができる。あるいは式R5-Arg-Arg-X<sub>58</sub>-Z<sub>59</sub>-A<sub>60</sub>-Y<sub>61</sub>-Ser-R6[反応番号6](式中、X<sub>58</sub>はAla、Pro、SerおよびGlnから成る群から選択され; 式中、Y<sub>61</sub>はAsp、Asn、GlyおよびSerから成る群から選択され; 式中、Z<sub>59</sub>はProおよびHisから成る群から選択され; 式中、A<sub>60</sub>はGlnおよびProから成る群から選択される)のTatアミノ酸残基56-62に広がる「エピトープIII」ペプチドまたはポリペプチドをこの組成物に加えることができる。さらに他には、式R7

30

40

50

- Ser - Gln - X<sub>64</sub> - His - Gln - Y<sub>67</sub> - Ser - Leu - Ser - Lys - Gln - Pro - R<sub>8</sub> [ 反応番号 7 ] ( 式中、X<sub>64</sub> は Asn および Thr から成る群から選択され；式中、Y<sub>67</sub> は Ala および Val から成る群から選択される ) の Tat AA 残基 62 - 73 に広がる「エピトープ I V」ペプチドまたはポリペプチドをこの組成物に加えることができる。この組成物自体を、HIV - 1 の多数の変異体に特徴的な多数の Tat 配列に対する抗体を誘導するために使用することができる。この組成物または生成した抗体を、これらの多数の変異体に対するワクチンまたは予防的処置として使用する。

#### 【 0 0 0 7 】

HIV - 1 疾患の進行に関して増大する知識にもかかわらず、当該技術分野には予防的および治療的の両方で HIV - 1 を処置するための組成物および方法を開発する必要性が存在し、これらはその後、多くは致命的な AIDS 疾患の処置および可能であれば防止のために、HIV - 1 のウイルスレベルを下げるために有用である。

#### 発明の要約

1 つの観点では本発明は、式 R<sub>1</sub> - Asp - Pro - Y<sub>7</sub> - Leu - X<sub>9</sub> - Pro - Trp - Z<sub>12</sub> - R<sub>2</sub> [ 配列番号 8 ] ( 式中、Y<sub>7</sub> は、Arg、Lys、Ser および Asn から成る群から選択され；式中、X<sub>9</sub> は、Glu および Asp から成る群から選択され；式中、Z<sub>12</sub> は、Lys および Asn から成る群から選択され；式中、R<sub>1</sub> は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよび低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された 1 ~ 約 5 個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され；式中、R<sub>2</sub> は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された 1 または最高約 5 個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択される ) のエピトープ I のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも 2 つの変異体を含んで成る組成物を提供する。この組成物において、2 つの変異体の少なくとも 1 つは、Y<sub>7</sub> が Arg であり、そして Z<sub>12</sub> が Lys である式を持たなければならない。この組成物の各ペプチドは、HIV - 1 Tat エピトープ I として霊長類の免疫系により認識される。この式は、種々のペプチドの組み合わせの構築および使用を可能とする。

#### 【 0 0 0 8 】

別の観点では、上記組成物は HIV - 1 Tat アミノ酸残基 5 からアミノ酸残基 12 に対応する他のアミノ酸配列を表す 1 以上のさらなるペプチドまたはポリペプチド ( 1 つまたは複数 ) をさらに含む。これらの任意のアミノ酸配列を以下に詳細に記載する。これらの配列は好ましくはその位置に Tat タンパク質変異体を含む HIV - 1 株に由来する。

#### 【 0 0 0 9 】

別の観点では、本発明は 1 以上の HIV - 1 Tat エピトープ I I、I I I および / または I V と組み合わせて、霊長類により認識される少なくとも 2 つの必要なエピトープ I ペプチド ( および好ましくはさらなるエピトープ I ペプチド ) を含んで成るペプチドまたはポリペプチドを含む上記組成物を提供する。エピトープ I I、I I I および I V は、引用により本明細書に編入する国際公開第 99 / 02185 号明細書に記載された HIV - 1 Tat ペプチドの式である。そのような組成物は適当な HIV - 1 Tat ペプチドと組み合わせて、すべての既知の HIV - 1 Tat タンパク質の約 95% より多くと反応性の抗体を誘導する組成物を提供することができる。

#### 【 0 0 1 0 】

さらなる観点では本発明は、式 R<sub>1</sub> - Asp - Pro - Y<sub>7</sub> - Leu - X<sub>9</sub> - Pro - Trp - Z<sub>12</sub> - R<sub>2</sub> [ 配列番号 8 ] ( 式中、Y<sub>7</sub> は、Arg、Lys、Ser および Asn から成る群から選択され；式中、X<sub>9</sub> は、Glu および Asp から成る群から選択され；式中、Z<sub>12</sub> は、Lys および Asn から成る群から選択され；式中、R<sub>1</sub> は、水素、低級アルキル、低級アルカノイルおよび低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された 1 ~ 約 5 個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され；式中、R<sub>2</sub> は、遊離ヒドロキシル、アミドおよびアミドで場合により置換された 1 または最高約 5 個の

10

20

30

40

50

さらなるアミノ酸の配列から成る群から選択される)のペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する、好ましくは霊長類で生成される少なくとも1つの抗体を含んで成る抗体組成物を提供する。この抗体組成物は好ましくは少なくとも2つの抗体、すなわち $Y_7$ がArgであり、そして $Z_{12}$ がLysであるエピトープI変異体に結合する1つの抗体、および $Y_7$ がAsnであり、そして $Z_{12}$ がAsnである第2のエピトープI変異体に結合する少なくとも第2の抗体を含んで成る。2つの特定した変異体以外の他の変異体に対する他の抗体も、この組成物に含むことができる。組成物中のこれらの抗体は霊長類の免疫系により認識されるエピトープI配列に結合し、このエピトープはHIV-1 Tatタンパク質の多数の変異体上に存在する。これらの抗体は以下に詳細に記載するモノクローナル抗体のような種々の抗体構築物を含む。

10

## 【0011】

さらに別の観点では、本発明はHIV Tatタンパク質の霊長類が認識するエピトープに特異的に結合する抗体、特にモノクローナル抗体を提供し、このエピトープはアミノ酸配列 - Asp - Pro -  $Y_7$  - Leu -  $X_9$  - Pro - Trp -  $Z_{12}$  - [配列番号9] (ここで、 $Y_7$ 、 $X_9$  および  $Z_{12}$  は上記定義の通りである)を含んで成る。

## 【0012】

さらに別の観点では、本発明は - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - [配列番号11]のエピトープを認識するすでに記載した抗体とは異なるエピトープ、エピトープIIペプチド配列 - Lys -  $X_{42}$  - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - [配列番号10] (ここで $X_{42}$ はGlyまたはAlaである)を認識する少なくとも1つの抗体を含んで成る抗体組成物を提供する。好ましくは組成物は、 $X_{42}$ がGlyであるペプチドおよび $X_{42}$ がAlaであるペプチドの両方を認識する1つの抗体を含んで成る。これらの抗体は好ましくは霊長類で生成される。組成物中のこれらの抗体は霊長類の免疫系により認識されるエピトープII配列に結合し、このエピトープは、HIV-1 Tatタンパク質の多数の変異体上に存在する。これらの抗体は以下に詳細に記載するように種々の抗体構築物を含む。

20

## 【0013】

さらに別の観点では、本発明はすでに記載した抗体により認識される - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - [配列番号11]のエピトープとは異なる、エピトープIIペプチド配列 - Lys -  $X_{42}$  - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - [配列番号10] (ここで $X_{42}$ はGlyまたはAlaである)を認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体を提供する。

30

## 【0014】

さらなる観点では、本発明は上記定義の式 R1 - Asp - Pro -  $Y_7$  - Leu -  $X_9$  - Pro - Trp -  $Z_{12}$  - R2 [配列番号8]のエピトープIのペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体を含むペプチドまたはポリペプチドを連続的にコードする組換え体または合成遺伝子を提供する。この合成遺伝子において、2つの変異体の少なくとも1つは、 $Y_7$ がArgであり、そして $Z_{12}$ がLysである式を持たなければならない、そしてこの2つの変異体の少なくとも第2は、 $Y_7$ がAsnであり、そして $Z_{12}$ がAsnである式を持たなければならない。場合によりこの合成遺伝子は霊長類の免疫系により認識されるようなカルボキシ末端エピトープIIペプチドを含んで成る。あるいは組換え体または合成遺伝子は、以下に同定する7または8個の好適な霊長類が認識するエピトープIIアミノ酸配列を含む。この合成遺伝子はスペーサー配列により分けられた各アミノ酸配列を含むことができ、あるいはキャリアータンパク質を含むオープンリーディングフレーム中に各ペプチド/ポリペプチドを発現することができる。合成遺伝子はスペーサーが霊長類により認識されたエピトープI配列に融合している場合、スペーサーによりキャリアータンパク質から分けることができ、組換えタンパク質のカルボキシ末端にエピトープII配列を残す。さらなる態様には一緒に融合し、そしてキャリアータンパク質に融合した上記式の多数のエピトープIペプチドを含む。

40

## 【0015】

50

さらなる観点では、本発明は宿主細胞中で合成遺伝子産物の発現を支配し、そして制御する調節核酸配列に操作可能に連結された上記合成遺伝子を含んで成る合成分子、例えばベクターを提供する。

【0016】

別の観点では、本発明は上記合成遺伝子または合成分子を含む組換え微生物、例えばウイルスまたは片利共生細菌を提供する。この微生物は宿主中で遺伝子または分子の産物の複数のコピーを発現することができる

本発明のさらに別の観点は、多数の既知のHIV-1 Tatタンパク質、例えば約95%より多く、好ましくは99%より多くの既知のTatタンパク質と反応する抗体を誘導するために有用な医薬組成物である。これらの誘導された抗体は、HIV-1の増殖を減じることができる。医薬組成物は少なくとも1つの上記の組換えまたは合成ペプチド/ポリペプチド組成物；または上記の合成遺伝子/分子；または上記組換え微生物を製薬学的に許容されるキャリアー中に含んで成る。

【0017】

本発明のさらなる観点は、HIV-1の増殖を減じるのに有用な医薬組成物であり、この組成物は上記抗体組成物またはモノクローナル抗体組成物を含む。

【0018】

本発明のさらに別の観点では、HIV-1のウイルスレベルを下げるための方法には、ヒトまたは他の霊長類を上記の抗体を誘導する医薬組成物に暴露し、ほとんどのHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を活発に誘導し、そしてインビボでウイルスの増殖を減じることを含む。

【0019】

この方法はコンピテントな免疫系(competent immune system)を持つHIV-1感染個体に、あるいは感染していないか、または慢性的に感染しているが無症候性の個体に適当である。この方法はHIV-1 Tatタンパク質と反応し、そしてHIV-1による初期の急性感染中にウイルス増殖を下げ、そしてさらにAIDSを導く慢性ウイルス血症を最少にする抗体を誘導する。

【0020】

さらに別の観点では、本発明はHIV-1による感染に対する効果的な、または迅速な免疫応答を形成することができないヒトに、上記の抗体組成物を含有する医薬組成物を投与することにより、HIV-1のウイルスレベルを減じる方法を提供する。この方法は、長期に組成物を投与することを含むことができる。

【0021】

本発明の別の観点は、上記組成物の調製法およびそのような組成物でトランスフェクトした宿主細胞を含む。

【0022】

本発明の別の観点は、上記組成物を用いた免疫感作により誘導される抗体の力価および特異性の測定および検出に有用なキットである。本発明のキットは好ましくは上記2つの必要なエピトープIペプチド、ならびに霊長類により認識されるエピトープIのさらなるペプチド、そしてエピトープIIからIVの可能なさらなるペプチド、およびコートされた固体支持体、これらの抗体のペプチドへの抗体の結合を検出するための標識試薬、および多種雑多な基質および標識により提供されるシグナルを引き出すか、または検出する装置、ならびに血液サンプル、適当なウイルスまたは他の診断アッセイ成分を採取するための通例の装置を含む。

【0023】

さらなる観点では、本発明は本発明の組成物で免疫感作した個体中の抗体の力価および反応パターンを検出する方法を提供する。本発明は個体の生物学的流体、例えば血清の希釈物を、本発明のエピトープI配列および場合によりエピトープIIからIVの1以上のペプチドを結合したプレートまたはビーズとインキューベーションし、非結合生物材料を洗い出し、そして標識試薬、例えば酵素が付随した抗-ヒト免疫グロブリンを含むペプチド

10

20

30

40

50

への抗体の結合を測定する工程を含む。使用する標識の種類に依存して、標識により生成されるシグナルは、酵素と反応するさらに付加する基質により生成することができる（例えば色の変化を生じる）。他の通例の標識も本アッセイの計画に包含してよい。

#### 【0024】

本発明の他の観点および利点は、以下の詳細な説明およびそれらの好適な態様でさらに記載する。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、免疫原に対する免疫応答を上げる（mounting）ことができる非感染または初期のHIV-1感染個体に抗体を誘導するさらなる組成物を提供することにより、上記の問題の解決を提供し、この抗体は多数の既知のHIV-1 Tatタンパク質変異体（すなわち95%より多い、好ましくは99%より多い）と反応する。用語「Tat配列（またはタンパク質）変異体」は、Tatタンパク質アミノ酸残基を含有するポリペプチドまたはペプチド、すなわち表I [配列番号15]のコンセンサス配列と実質的に同じである別のHIV-1株 Tatタンパク質に由来する配列を意味する。各変異体はエピトープIからIVについて目的の残基中の少なくとも1つのアミノ酸変化により、コンセンサス配列および/または別の変異体とは異なり得る。この変化は、本発明の組成物に加えた時にその特定のTatエピトープに対して同じか、または異なる抗原性特異性を提供することができる。

10

#### 【0025】

本発明の組成物により誘導される抗体はHIV-1の増殖を阻害することができ、これにより疾患がさらにAIDSへ進行することを防止する。抗体組成物は、HIV-1感染に対する効果的または迅速な免疫応答を上げることができない感染または非感染のヒトに使用するためにも提供することができる。これらの組成物は多数のTatタンパク質と反応することができ、これによりHIV-1のウイルスレベルを下げる。これらの抗体は、感染で免疫学的に異なるTatタンパク質を生成するHIV-1に暴露されるか、または感染した大きな集団において、AIDSの発症を制御するために、治療的および予防的内容の両方に有用である。

20

#### 【0026】

本発明の組成物には霊長類が抗体を生成するHIV-1 Tatタンパク質のエピトープにより提供されるペプチドに基づくペプチドまたはタンパク質、あるいは霊長類においてTatに対する抗体を誘導するペプチドおよびポリペプチドをコードする核酸配列を含む。次にこれらの誘導された抗体はHIV-1の増殖を減じる。

30

#### 【0027】

HIV-1 Tatタンパク質は2つのエキソンから生成される；エキソン1は、スプライシング無しで、またはエキソン2によりコードされる約15～32アミノ酸残を含むスプライシングされて発現され得る72アミノ酸（AA）タンパク質をコードする。HIV-1 TatエキソンI配列は表1に表し、そして共通するBサブタイプ [NIHロスアラモスデータベース]に見いだされる31の既知のHIV-1株のTatタンパク質配列に基づくコンセンサス配列である。変異体が現れるアミノ酸位置は、ロアーケースの文字である。表I [配列番号15]で、73位のアミノ酸残基はHIV-1 Tatのエキソン2の最初のProである。エキソンIの72アミノ酸産物は、細胞性の取り込みおよび活性化を単独で行うことができるので、これは抗体が72アミノ酸ペプチドと反応し、細胞内の取り込みを阻止することに必須である。HIV-1 Tatは、Cys<sub>21</sub>とCys<sub>37</sub>との間に1つの共有結合を持つエキソン1 [配列番号15]のAA位22と37の間にシステイン-リッチ領域を含み、複雑な3次構造を生じる。科学文献は、この領域が免疫原性ではないらしいことを示した。Tatに対する主な抗体は、AA62-73に対して報告されたさらなる抗体とともに、直線状のN-末端Pro-リッチ領域（AA1-21）および直線状塩基性領域（AA44-65）に対するものである。

40

#### 【0028】

本発明者は以前にエピトープ、すなわちTat変異体のエキソン1 [配列番号15]のN

50

- 末端直線状の配列 1 - 2 1 ( 2 2 A A ) 中のウサギ抗体 ( 抗原性配列 ) により認識される領域を同定し、そして H I V - 1 T a t 中の 4 つの B 細胞エピトープを定めた。国際公開第 9 9 / 0 2 1 8 5 号明細書に以前に記載したように、このより大きな配列の免疫原性領域は、ウサギの免疫系により認識された。これらの領域は以下の表 I でエキソン I のコンセンサス配列中に同定された：エピトープ I は、エキソン 1 の A A 位 2 - 1 0 の 9 個のアミノ酸配列としてウサギ抗体により同定された。エピトープ I I は、エキソン 1 の A A 位 4 3 - 5 0 の 8 個のアミノ酸配列として同定された。エピトープ I I I は、エキソン 1 の A A 位 5 6 - 6 2 の 7 個のアミノ酸配列として同定された。エピトープ I V は、T a t の A A 位 6 2 - 7 3 の 1 2 個のアミノ酸配列として同定され、エキソン 2 の最初の P r o ( A A 7 3 ) およびエピトープ I I I の重複 S e r 6 2 を含んだ。

10

【 0 0 2 9 】

【 表 1 】

表 I - コンセンサス T a t 配列

1	10	20
Met glu Pro <u>Val asp pro arg Leu Glu Pro Trp lys</u> His Pro Gly Ser Gln Pro lys thr		
	30	40
ala cys thr asn Cys Tyr Cys Lys lys Cys Cys phe his Cys gln val Cys Phe ile thr		
	50	60
<u>Lys gly Leu gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg arg arg ala pro gln</u>		
	70	
asp Ser gln thr his Gln val ser Leu ser Lys gln [配列番号:15]		

20

【 0 0 3 0 】

しかし本発明では、発明者は霊長類の B 細胞により特に認識されるエピトープ I のアミノ酸配列に驚くべきシフトを検出した。表 I では霊長類が認識するエピトープ I および I I 配列に下線を付す。霊長類が認識するエピトープ I は、T a t アミノ酸残基 5 ~ 1 2 に広がる。霊長類の B 細胞により認識されるエピトープ I I の配列は、アミノ酸 4 1 ~ 5 0 に広がる。エピトープ I I I および I V は、引用により本明細書に編入する国際公開第 9 9 / 0 2 1 8 5 号明細書に報告されるように、ウサギで認識されるエピトープと同じである。

30

#### A . 霊長類が認識するエピトープ I の免疫原性組成物

1 つの態様では、本発明は霊長類の免疫系により認識され、そしてインビボでその配列に暴露された霊長類に特異的な体液性免疫応答 ( 本発明の目的に関する ) を誘導する少なくとも 2 つのペプチドまたはポリペプチド変異体を含む組成物を提供する。これらの霊長類が認識するエピトープ I アミノ酸配列は、多数の “ T a t 配列変異体 ” に由来する表 I の T a t コンセンサス配列 [ 配列番号 1 5 ] のアミノ酸残基 5 ~ 1 2 に対応する。霊長類が認識するエピトープ I は、一般式：R 1 - A s p - P r o - Y <sub>7</sub> - L e u - X <sub>9</sub> - P r o - T r p - Z <sub>1 2</sub> - R 2 配列番号 8 ( 式中、Y <sub>7</sub> は、A r g 、 L y s 、 S e r または A s n であり；X <sub>9</sub> は、G l u または A s p であり；そして Z <sub>1 2</sub> は、L y s または A s n である ) のペプチドと定める。この式は種々の変異体哺乳動物エピトープ I ペプチドを可能にする。本発明の組成物は、Y <sub>7</sub> は A r g であり、そして Z <sub>1 2</sub> は L y s である少なくとも 1 つのペプチド変異体、および Y <sub>7</sub> は A s n であり、そして Z <sub>1 2</sub> は A s n である少なくとも第 2 のペプチド変異体を含まなければならない。

40

【 0 0 3 1 】

50

上記の霊長類が認識するエピトープ I の式において現れる特定のアミノ酸は、最少反応性の霊長類エピトープ I 配列である。最少エピトープ I 配列に対する抗体を生じるために、本発明の方法に使用される式により定められる各免疫原は、より大きなアミノ酸配列であることができる。例えば最少エピトープ I アミノ酸は、全エピトープ I 免疫原性配列が 8 から約 25 の間のアミノ酸長となるように、別のアミノ酸により挟まれる。挟むアミノ酸の同一性はエピトープ I 免疫原の生物学的機能に必須ではない。特に霊長類が認識するエピトープ I 配列の N - 末端上のさらなるアミノ酸は、免疫原性に影響しない。すなわち、霊長類が認識する各エピトープ I ペプチドについて、N - 末端 R 1 は非修飾 N 末端アミノ酸上の遊離水素、あるいは低級アルキル（例えば C 1 - C 10 アルキル）、またはアセチル基のような低級 C 1 - C 10 アルカノイルであることができる。R 1 は、低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された 1 から約 5 の間のアミノ酸の配列も含んでよい。好ましくは R 1 は 2 アミノ酸を表す。1 つの態様では、R 1 が Val であり、配列 Val - Asp - Pro - Y<sub>7</sub> - Leu - X<sub>9</sub> - Pro - Trp - Z<sub>1,2</sub> [ 配列番号 37 ]（ここで X<sub>7</sub>、X<sub>9</sub> および Z<sub>1,2</sub> は上記定義の通りである）を生じる。別の態様では、R 1 が X<sub>2</sub> - Pro - Val であり、配列 X<sub>2</sub> - Pro - Val - Asp - Pro - Y<sub>7</sub> - Leu - X<sub>9</sub> - Pro - Trp - Z<sub>1,2</sub> [ 配列番号 38 ]（ここで X<sub>2</sub> が Glu または Asp であり；ここで X<sub>7</sub>、X<sub>9</sub> および Z<sub>1,2</sub> は上記定義の通りである）を生じる。好ましくは R 1 は 3 アミノ酸を表す。

10

## 【0032】

霊長類が認識するエピトープ I の最少配列の C - 末端上のさらなるアミノ酸は、抗体力価を強化することができる。C - 末端 R 2 は C 末端アミノ酸上の単なる遊離ヒドロキシル基であることができるが、それはまた C 末端アミドであることもできる。しかし力価を強化するために、R 2 は好ましくは 1 から約 14 個の間、好ましくはカルボキシル末端がアミド化された約 4 個のさらなるアミノ酸の配列である。好適な態様では、R 2 は - His - Pro - Gly - Ser - アミドであり、配列 Asp - Pro - Y<sub>7</sub> - Leu - X<sub>9</sub> - Pro - Trp - Z<sub>1,2</sub> - His - Pro - Gly - Ser - [ 配列番号 16 ]（ここで X<sub>7</sub>、X<sub>9</sub> および Z<sub>1,2</sub> は上記定義の通りである）を生じる。

20

## 【0033】

好ましくは本発明の組成物は、上記に同定した 2 つの必要なペプチドに加えて、霊長類が認識するエピトープ I の式の少なくとも 5 または 6 個の異なる変異アミノ酸配列を含む。最も好ましくは、組成物は直ぐ下に同定する 7 または 8 個の変異アミノ酸配列を含んで成る。この組成物は、各々が異なる X<sub>9</sub>、Y<sub>7</sub> および Z<sub>1,2</sub> の組み合わせを含む他のペプチドまたはポリペプチド配列を含んでもよい。以下の実施例で示すように、霊長類が認識するエピトープ I 中で抗原可変性の 3 つの部位を用いて、本発明の好適な組成物は既知のすべての B クレイドおよび非 - B クレイド HIV - I Tat 変異体の 95 % を含むための 2 つの「必要な」ペプチド：

30

R 1 - Asp - Pro - Arg - Leu - Glu - Pro - Trp - Lys - R 2 配列  
番号 17 および

R 1 - Asp - Pro - Asn - Leu - Glu - Pro - Trp - Asn - R 2 配列  
番号 18

40

ならびに以下のさらなるエピトープ I ペプチド：

R 1 - Asp - Pro - Lys - Leu - Glu - Pro - Trp - Lys - R 2 配列  
番号 19

R 1 - Asp - Pro - Ser - Leu - Glu - Pro - Trp - Lys - R 2 配列  
番号 20

R 1 - Asp - Pro - Asn - Leu - Glu - Pro - Trp - Lys - R 2 配列  
番号 21

R 1 - Asp - Pro - Lys - Leu - Glu - Pro - Trp - Asn - R 2 配列  
番号 22 および

R 1 - Asp - Pro - Asn - Leu - Asp - Pro - Trp - Asn - R 2 配列

50

番号 2 3

の 1 ~ 5 個、ならびにさらに場合により稀な変異体 R 1 - A s p - P r o - S e r - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R 2 配列番号 2 4 ] を含むことにより、霊長類が認識するエピトープ I の十分なペプチドを含むことができる。

【 0 0 3 4 】

本発明の霊長類が認識するエピトープ I の組成物は、配列番号 1 5 の A A 5 から A A 1 2 の間のアミノ酸残基に相当するが、霊長類が認識するエピトープ I 組成物に対する抗体とは十分に交差反応しない他の T a t 変異体に由来する他の配列を含むさらに多数のペプチドまたはポリペプチドを含んでもよい。本発明のエピトープ I の組成物は、5 以上の異なるエピトープ I ペプチドの複数のコピーを任意の順序で含むことができる。1 つの態様では、上記の [ 配列番号 1 7 ~ 2 4 ] の 7 またはすべての 8 つのアミノ酸配列の少なくとも 1 コピーが存在する。

10

【 0 0 3 5 】

本発明のこれらのペプチドまたはポリペプチドは、合成的または組換え的に生成される。任意のアミノ酸 (例えば - G l y - S e r - ) または他のアミノ酸または化学的化合物のスペーサーをペプチドと一緒に、またはキャリアーに連結する目的でペプチドの末端に含むことができる。この組成物はキャリアータンパク質に結合した合成ペプチドとして発現する 1 以上の上記ペプチドの状態を取ることでもできる。あるいは組成物は多数のエピトープ I ペプチドを含んでもよく、多抗原性ペプチドとして発現した各々を、場合によりキャリアータンパク質に結合する。あるいは選択したペプチドは連続的に連結し、そして組換え的に生産されるタンパク質中に発現させることができる。1 つの態様として、上記の 8 つの特異的に特定された配列をその間にスペーサーアミノ酸を用いて、または用いずに連続的に連結してより大きな組換えタンパク質を形成する。あるいは組換えタンパク質はキャリアータンパク質と枠内で融合することができる。これらの霊長類エピトープ I 組成物は、H I V - 1 B および非 - B クレードの T a t タンパク質を含む H I V - 1 T a t タンパク質の既知の変異体の 9 5 % より多くと反応性の抗体を誘導するように設計される。

20

【 0 0 3 6 】

霊長類が認識するエピトープ I 組成物は、免疫感作した、免疫的にコンピテントな ( i m m u n e c o m p e t e n t ) 霊長類、すなわち非 - 感染ヒト、または無症候性の感染したヒトに、H I V - 1 の T a t タンパク質の既知の変異体の 9 5 % より多く、そして好ましくは 9 9 % より多くに対して向けられた活性化体液性免疫応答 (すなわち抗体) を誘導する生物活性を示す。そのような処置の最終結果は、急性感染後の H I V - 1 の増殖を損なうことである。この減損は、A I D S への進行に関係する H I V - 1 の高いポスト - 血清変換血漿レベルを防止する。H I V 感染の無症状期における抗体の活発な誘導は、ウイルスの増殖を減少させ、血漿ウイルス負荷量を下げ、そして同様に A I D S への進行を減少させる。少なくとも 2 つの必要な霊長類が認識するエピトープ I 免疫原、そして好ましくは 7 または 8 個のそれらエピトープ I 配列 [ 例えば配列番号 1 7 ~ 2 4 ] を含む組成物は、H I V - 1 の共通の B サブタイプの 2 9 4 の既知の T a t 配列、およびすでに配列決定された 5 6 種の非 - B H I V - 1 サブタイプのすべての T a t タンパク質の約 9 5 % に対して免疫応答を誘導することができる [ E s t h e r G u z m a n 博士の好意による、ロスアラモス N I A I D H I V データベース ; G e n e B a n k データベース ] 。

30

40

#### B . さ ら な る エ ピ ト ー プ を 含 有 す る 免 疫 原 組 成 物

別の態様では、本発明は少なくとも 1 つのエピトープ I I 配列および場合により 1 以上のエピトープ I I I または I V ペプチドと組み合わせた、霊長類が認識する 2 以上のエピトープ I 配列を使用する他の組成物を提供する。ウサギの免疫系により認識されるこれら H I V - 1 T a t エピトープ I I 、 I I I および I V は、本明細書に編入する国際公開第 9 9 / 0 2 1 8 5 号明細書に詳細に記載されている。

【 0 0 3 7 】

簡単に説明すると、エピトープ I I 配列はインビボでエピトープ I I 配列に暴露された霊

50

長類に、特異的な体液性の免疫応答を誘導する。霊長類により認識されるエピトープ I I は、式  $R_3 - Lys - X_{4_2} - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - R_4$  [ 配列番号 5 ] (ここで  $X_{4_2}$  は Gly または Ala である) のペプチドと定める。霊長類の免疫系により認識される最少エピトープは、式、すなわち  $Lys - Gly - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys -$  (配列番号 15 のアミノ酸 41 ~ 50) の特異的に同定されたアミノ酸である。これはまた、エピトープ I I の現在好適な免疫原の配列でもある。 $X_{4_2}$  が Gly であるこの免疫原は、 $X_{4_2}$  が Ala である配列と交差反応性の抗体を誘導する。これは既知の HIV - 1 Tat タンパク質の 95% より多くと反応 / 交差反応する。このエピトープ I I 配列は多数の既知の HIV - 1 Tat 変異体中の抗原可変性をもたない。N 末端の  $R_3$  は非修飾 N 末端アミノ酸 Lys 上の水素を表すか、または  $R_3$  は Lys 上の置換基である低級アルキルまたはアセチル基のような低級アルカノイルであることができる。また  $R_3$  は、低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された 1 から 5 個の間のアミノ酸の配列を含んでもよい。C 末端の  $R_4$  は、C 末端アミノ酸の遊離ヒドロキシルを表すか、または  $R_4$  はその C 末端アミノ酸上のアミドでもよい。 $R_4$  はスペーサーのようなさらなる非極性アミノ酸を含んでもよい。スペーサーの例として  $gly - ser - gly - ser -$  を使用することができ、配列  $Lys - X_{4_2} - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - Gly - Ser - Gly - Ser$  [ 配列番号 25 ] (ここで  $X_{4_2}$  は Gly または Ala である) を生じる。しかし  $R_4$  はエピトープ I I の式中の最後のアミノ酸後に Tat 配列中に自然に存在する塩基性アミノ酸  $Lys - Arg - Arg -$  であることはできない。294B クレード Tat 変異体中に見いだされるエピトープ I I 配列は、霊長類により認識される (国際公開第 99 / 02185 号明細書に報告されているように、ウサギの免疫系は配列番号 15 の AA43 - 50 に由来するエピトープを認識する)。

#### 【0038】

エピトープ I I は他の配列中に存在する時、それほど免疫原性ではない。すなわち最適な免疫原性には、この配列をキャリアタンパク質に融合または結合した合成ペプチドとして、あるいは場合によりキャリアタンパク質に結合した多数の抗原性ペプチドとして調製する。あるいはエピトープ I I を組換えタンパク質の C 末端配列として発現させることができ、これは場合によりそのアミノ末端配列でキャリアタンパク質に枠内融合される。本発明の組成物では、エピトープ I I ペプチドは好ましくは単独、または 1 以上の霊長類が認識するエピトープ I ペプチドと組み合わせ提示される。

#### 【0039】

エピトープ I I I は簡単に記載すると、そして国際公開第 99 / 02185 号明細書に同定されているように、式  $R_5 - Arg - Arg - X_{5_8} - Z_{5_9} - A_{6_0} - Y_{6_1} - Ser - R_6$  [ 配列番号 6 ] (式中、 $X_{5_8}$  は Ala、Pro、Ser または Gln であることができ； $Y_{6_1}$  は Asp、Asn、Gly または Ser であることができ； $Z_{5_9}$  は Pro または His であることができ；そして  $A_{6_0}$  は Gln または Pro であることができる) のペプチドと定める。エピトープ I V は式： $R_7 - Ser - Gln - X_{6_4} - His - Gln - Y_{6_7} - Ser - Leu - Ser - Lys - Gln - Pro - R_8$  [ 配列番号 7 ] (式中、 $X_{6_4}$  は Asn または Thr であることができ；そして  $Y_{6_7}$  は Ala または Val であることができる) のペプチドと定める。

#### 【0040】

このように本発明の組成物、すなわち上記に同定したアミノ酸配列を含有するペプチド / ポリペプチドは、ヒト個体に提供した時、ほとんどの HIV - 1 株の細胞外 Tat タンパク質の免疫学的阻止に有用である。これらの組成物はウイルスの長期の増殖を極めて下げないように機能し、そしてウイルスの効果的な免疫防御を可能とする。

#### 【0041】

各エピトープの免疫原は好ましくは、各エピトープの自然に存在する変異体の最高群と反応性の抗体を誘導するように設計する。霊長類が認識するエピトープ I のようなエピトープ

ブには、免疫原の多数のコピーを合成または組換え免疫原に包含させて免疫原性を強化し、そしてより高力価の抗体を生成することができる。さらに、各エピトープの配列における変異は独立して生じるので、2以上のエピトープに関する免疫原を組み合わせる範囲を広げることができる。すなわち1例として、本発明の組成物は霊長類が認識する2つの必要なエピトープIペプチドならびにキャリアタンパク質に結合される末端上にCysを用いて上記のように特異的に同定される4または5の他のエピトープIペプチドを含む。あるいは場合によりキャリアタンパク質に結合された多数の抗原性ペプチドを調製し、そして本発明の組成物を形成するために合わせることができる。あるいは2以上の免疫原の混合物を使用することができる。

#### 【0042】

任意のエピトープII、IIIもしくはIVまたは他の任意の免疫原を含むか、または含まない本発明の霊長類が認識するエピトープI免疫原は、例えば化学的に合成された、または組換えペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質または融合ペプチドとして様々な状態に調製し、そして免疫原性組成物中に使用することができる。

#### 1. キャリアーに結合した組換えまたは合成ペプチド/タンパク質

1つの態様として、本発明の組成物は霊長類が認識する少なくとも2つの必要なエピトープI免疫原性アミノ酸配列(ならびにさらなる他のエピトープI配列)を含有し、そしてまた選択したキャリアタンパク質に結合された1以上のエピトープII/III/IV免疫原性アミノ酸配列を含有する合成または組換えで生成されるペプチドであることができる。本発明の組成物のこの態様では、フランキング配列を含むか、または含まない、多数の上記の霊長類が認識するエピトープIアミノ酸配列をポリペプチドに連続して連結し、そして同じキャリアーに結合することができる。あるいはエピトープI、II、IIIまたはIV免疫原をペプチドとして個別に同じかまたは異なるキャリアタンパク質に結合し、そして生成した免疫原キャリアー構築物を一緒に混合して、1つの組成物を形成することができる。そのような配列は化学合成の常法により合成的に、またはこれもまた現在では通例の手段により選択した宿主細胞中での発現により組換式的に作ることができる。

#### 【0043】

この態様に関して、キャリアタンパク質は望ましくは選択した免疫原の免疫原性を強化することができるタンパク質または他の分子である。そのようなキャリアーは、アジュバント効果を有するより大きな分子でよい。通例のタンパク質キャリアーの例には限定するわけではないが、大腸菌(*E. coli*) DnaKタンパク質、ガラクトキナーゼ(galK、これは細菌におけるガラクトース代謝の第1段階を触媒する)、ユビキチン、 $\alpha$ -接合因子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよびインフルエンザNS-1タンパク質を含む。ジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドのようなトキソイド(すなわち毒性活性を排除するために十分に修飾した自然に存在するトキシンをコードする配列)もキャリアーとして使用することができる。同様に種々の細菌の熱ショックタンパク質、例えばマイコバクテリアhsp-70を使用することができる。グルタチオンレダクターゼ(GST)は別の有用なキャリアーである。当業者は、適当なキャリアーを容易に選択することができる。

#### 【0044】

特に望ましい免疫原-キャリアタンパク質構築物では、2つの必要なエピトープI免疫原および霊長類が認識する3~6個のさらなるエピトープI免疫原および場合により免疫原性ペプチド/ポリペプチドを、マイコバクテリアの大腸菌(*E. coli*)熱ショックタンパク質70(hsp70)に共有的に連結することができる[K. Szuete et al, *J. Immunol.*, 156: 873 (1996)]。別の望ましい態様では、組成物は免疫原を含有するペプチドまたはポリペプチド配列をジフテリアトキソイドに共有的に連結することにより形成される。

#### 2. 多抗原性ペプチド

さらに別の態様では、ペプチドまたはポリペプチドエピトープ免疫原および選択された任

10

20

30

40

50

意の免疫原は多抗原性ペプチド(“MAP”、または8量体リシンコアペプチドとも呼ぶ)構築物の状態であることができる。そのような構築物は、Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5409-5413(1988)により記載されているMAP系を使用して設計することができる。この系は記載されているように本発明の霊長類が認識する同じエピトープIの多数のコピーが中に合成されるリシン残基のコアマトリックスを使用する[D. Posnett et al., J. Biol. Chem., 263(4):1719-1725(1988); J. Tam, 「化学的に定めた合成免疫原および多抗原ペプチド法によるワクチン(Chemically Defined Synthetic Immunogens and Vaccines by the Multiple Antigen Peptide Approach)」、ワクチンの研究開発(Vaccine Research and Developments)、第1巻、W. Koff and H. Six編集、pp51-87(マーセル デブラウ(Marcel Deblau)社、ニューヨーク、1992)]。各MAPは唯一のペプチドの多数のコピーを含む。したがってMAPを含有する組成物は少なくとも2つ、そして好ましくは約7個のMAPを含むだろう。1つのMAPは各リシンコアに結合した必要とされる第1のペプチドまたはポリペプチドエピトープI免疫原を含み;第2のMAPはMAPは各リシンコアに結合した必要とされる第2のペプチドまたはポリペプチドエピトープI免疫原を有するだろう。さらに、各々が上記で同定した霊長類により認識される異なるエピトープIアミノ酸配列を含む他のMAPも含むことができる。多数の異なるMAPは、エピトープI、II、IIIまたはIV配列の所望する組み合わせを得るために使用することができる。好ましくはこれらのMAP構築物は他のT細胞刺激配列を付随するか、または医薬組成物として既知のアジュバントのようなT細胞刺激剤と併せて投与される。

### 3. スペーサー

上記組成物のいずれにおいても、例えばペプチド/ポリペプチド-キャリアー構築物またはMAPとして、各ペプチド/ポリペプチド免疫原または免疫原中の各アミノ酸配列は、場合により「スペーサー」と呼ばれる任意のアミノ酸配列により分けることができる。スペーサーは、2つの配列の間に挟まれて免疫原の3次元的構造に悪影響を及ぼすことなくそれらの間の連結を可能とする1~約4個の間のアミノ酸配列である。スペーサーは所望する場合、制限エンドヌクレアーゼ開裂部位を含んでスペーサーの分離を可能とすることができる。適当なスペーサーまたはリンカーは当業者に知られており、そして容易に設計および選択され得る。好適なスペーサーは、Glyおよび/またはSerアミノ酸を含有する配列である。

### F. 合成または組換え的に生成した遺伝子を含有する本発明の核酸組成物

本発明の他の態様には、上記組成物のペプチドおよびポリペプチド免疫原を含み、そしてキャリアータンパク質に融合したそれらペプチドおよびポリペプチドを含む、上記の霊長類が認識するエピトープIペプチド/ポリペプチド組成物をコードする核酸配列を含む。核酸配列はキャリアータンパク質をコードする配列も含むことができる。

#### 【0045】

このように本発明の1つの好適な態様は、霊長類が認識する少なくとも2つの必要なエピトープI免疫原ペプチド/ポリペプチドを連続的にコードする「合成遺伝子」である。遺伝子は「合成」と言うが、これは所望により化学的合成または組換え手段により設計することに注目されたい。合成遺伝子は好ましくは、特異的に同定される霊長類が認識するエピトープIアミノ酸配列[配列番号17~24]の7またはすべての8個をコードする。また合成遺伝子は、エピトープIIまたはIIIペプチドが霊長類が認識するエピトープI配列のC末端に融合され、そしてそれが持つC末端でさらに修飾されないならば、場合により選択したエピトープIIまたはIII免疫原をコードすることもできる。合成遺伝子は2つの必要なエピトープIアミノ酸配列の複数のコピー、あるいはさらなる多数の異なる免疫原またはアミノ酸配列のコピー、あるいは多数の異なる免疫原またはアミノ酸配列の多数のコピーをコードすることができる。合成遺伝子は選択したアミノ酸配列を、

キャリアタンパク質をコードする核酸配列を含む、または融合するオープンリーディングフレーム内にコードする合成遺伝子であることができる。さらに合成遺伝子の特徴は、それが免疫原をコードする各配列間に、かつ/または免疫原をコードする配列とキャリアタンパク質をコードする配列の間にスペーサーをコードすることである。

#### 【0046】

本発明の合成遺伝子は、合成または組換え分子の一部でもよい。合成分子は、プロモーター、終止シグナル等のような調節要素をコードする核酸配列の操作的制御下に、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質または融合ペプチドをコードする合成遺伝子を含むベクターまたはプラスミドのような核酸構築物でよい。そのような合成分子は、ポリペプチド/ペプチド免疫原組成物を組換え的に生成するために使用することができる。合成遺伝子または合成分子は、化学合成法または好ましくは組換え技法の使用により調製することができる。例えば、合成遺伝子または分子は、示す宿主細胞種について特定の好ましいコドンを含むことができる。

10

#### 【0047】

好ましくはDNAの状態の合成遺伝子または分子は、種々の方法で使用することができる。例えばこれらの合成核酸配列は、宿主細胞培養においてインピトコで本発明のペプチド/ポリペプチドを発現するために使用することができる。発現した免疫原は、適当な精製後、医薬試薬またはワクチンに包含することができる。あるいは本発明の合成遺伝子または合成分子は、哺乳動物、好ましくはヒトにいわゆる「裸のDNA」として直接投与して、患者内にてインピボでタンパク質/ペプチド免疫原を発現することができる。例えば、

20

#### G. 合成遺伝子を発現する微生物

本発明のさらに別の観点では、本発明の合成遺伝子または分子を非-病原性微生物に取り込むことができる。生成した微生物は哺乳動物宿主に投与した時に発現し、そしてインピボで本発明の発現した組成物を複製して、特異的な抗体形成を誘導する。例えば本発明の組成物または合成遺伝子を運び、そして哺乳動物患者へ投与するために有用な非-病原性の組換えウイルスまたは片利共生細菌は、通例の方法により調製され、そして既知の非-病原性微生物の中から選択することができる。

30

#### 【0048】

合成分子を患者に外から送達するために、かつ/または合成遺伝子を患者のインピボに運ぶために有用であり得る片利共生細菌には、限定するわけではないが、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、例えば *S. ゴルドニー* (*gordonii*)、または大腸菌 (*E. coli*)、バチルス (*Bacillus*)、ストレプトマイセス (*Streptomycetes*) およびサッカロミセス (*Saccharomyces*) の種々の株を含む。

40

#### 【0049】

合成遺伝子を宿主の細胞に運ぶために工作できる適当な非病原性ウイルスは、ワクシニアのようなポックスウイルス、アデノウイルス、アデノ-随伴ウイルス、カナリア痘ウイルス、レトロウイルス等を含む。そのような多数の非-病原性ウイルスは通常、ヒトの遺伝子療法に、そして他のワクチン剤のキャリアーとして使用され、そして当業者には既知であり、そして選択可能である。

#### H. 本発明の組成物の調製または製造

本発明の組成物、および本発明の霊長類が認識するエピトープ I 免疫原および場合により

50

1 以上のエピトープ I I、I I I または I V を含有する個々のポリペプチド/ペプチド、本発明の合成遺伝子および合成分子は、Merrifield, J. Amer. Chem. Soc., 85: 2149 - 2154 (1963) に記載されるように、既知の化学合成技法により通常に調製することができる。あるいは本発明の組成物は、任意の他の免疫原および任意のキャリアタンパク質を含む霊長類が認識する少なくとも2つの必要なエピトープ I 配列を含むペプチド/ポリペプチドをコードする配列を持つ DNA フラグメントをクローニングし、そして宿主微生物または細胞内で発現させることにより、既知の組換え DNA 法により調製することができる。エピトープ I および任意の免疫原のコード配列は、合成的に調製することができるか [W. P. C. Stemmer et al., Gene, 164: 49 (1995)]、または既知の技法によりウイルス RNA から、または利用できる cDNA - を含有するプラスミドから誘導することができる。

10

## 【0050】

これらの技法の組み合わせを使用してもよい。例えば通常の分子生物学的技法による連続的な免疫原の集成は合成遺伝子の生成に使用することができ、そして部位特異的突然変異誘発法を使用して所望の免疫原の配列を提供することができる。次いで合成遺伝子の産物を組換え的に生産する。これらの操作のすべては、通例の技法により行うことができる。

## 【0051】

合成遺伝子または分子を使用した本発明のペプチド/ポリペプチド組成物のクローニングおよび発現に関する系には、組換え法で周知な種々の微生物および細胞の使用を含む。これらには例えば、大腸菌 (E. coli)、バチルス (Bacillus)、ストレプトマイセス (Streptomyces) およびサッカロミセス (Saccharomyces) の種々の株、ならびに哺乳動物、酵母および昆虫細胞を含む。それらに適当なベクターは既知であり、そして私的および公的な研究室および寄託機関ならびに市販の売り主から入手することができる。現在、最も好適な宿主は、チャイニーズハムスター卵母細胞 (CHO) または COS-1 細胞のような哺乳動物細胞である。これらの宿主はワクシニアまたはプタボックスのようなボックスウイルスベクターと一緒に使用することができる。形質転換、培養、増幅、スクリーニングおよび産物の生産および精製のための他の適当な宿主細胞および方法の選択は、既知の技法を参照にすることにより当業者により行うことができる。例えば、中でも Gething and Sambrook, Nature, 293: 620 - 625 (1981) を参照にされたい。他の好適な系には、バキュロウイルス発現系およびベクターを含む。

20

30

## 【0052】

通例の組換え手段により生成した時、本発明の組成物、すなわち霊長類が認識するエピトープ I 免疫原および任意の免疫原の示したコピーを含むポリペプチド/ペプチドは、細胞の内容物から通例の溶解技法により、またはクロマトグラフィーのような通例の方法によりいずれかで細胞媒質から単離することができる。例えば Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, )、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、ニューヨーク (1989) を参照にされたい。DNA ワクチンとしてペプチド/ポリペプチドのいずれかの成分の生産に使用する適当なプラスミドおよびウイルスベクターは当業者には周知であり、そして本発明を限定するものではない。タンパク質の生産については Sambrook et al. 同上および上記の技術文献を参照にされたい。または1994年1月20日に公開された国際公開第94/01139号明細書も参照にされたい。簡単に説明すると、選択したペプチド/ポリペプチドをコードする DNA を、他の任意のランキング配列、プロモーター、mRNA リーダー配列、開始部位およびインピボまたはインピト口でその配列の増幅および発現を支配することができる他の調節配列を含むベクターまたはプラスミドに挿入する。これらのベクターは患者の細胞の感染およびインピボで合成遺伝子配列のタンパク質/ペプチドとしての発現、またはインピト口で融合タンパク質/ペプチドとしてその発現を可能とする。

40

50

## 【0053】

調製した組成物は、任意の数の免疫原を含む霊長類が認識するエピトープI組成物に配合し、そしてインビボアッセイにより効力をスクリーニングすることができる。そのようなアッセイは、動物、例えばサルを組成物で免疫感作し、そしてHIV-1のTatタンパク質または変異体Tat配列に対応する合成の検出体(detecter)ペプチドに対する抗体の力価の評価を使用する(以下の実施例で示すように)。

## I. 本発明の抗体組成物

本発明の抗体組成物またはリガンド-結合組成物は、式 - Asp - Pro - Y<sub>7</sub> - Leu - X<sub>9</sub> - Pro - Trp - Z<sub>12</sub> - [配列番号9] (式中、Y<sub>7</sub>は、Arg、Lys、SerおよびAsnから成る群から選択され; 式中、X<sub>9</sub>は、GluおよびAspから成る群から選択され; 式中、Z<sub>12</sub>は、LysおよびAsnから成る群から選択される)のエピトープIに特異的に結合する少なくとも1つの抗体を包含する。好ましくはそのような抗体組成物は、本明細書で定める少なくとも2つの必要なエピトープI配列に特異的に結合する少なくとも2以上の異なる抗体またはリガンドを含む。抗体(または他の結合リガンド)は、エピトープIの2つの必要な配列 R1 - Asp - Pro - Arg - Leu - Glu - Pro - Trp - Lys - R2 [配列番号17]; および R1 - Asp - Pro - Asn - Leu - Glu - Pro - Trp - Asn - R2 [配列番号18] に対して生成される。組成物の抗体はこのようにHIV-1 Tatタンパク質の多数の変異体上に存在するHIV Tatタンパク質に結合する。さらに上記のエピトープIの式内に入る(falling)他の配列に対する抗体またはリガンドを生成する。

## 【0054】

1つの態様では、上記のように本発明のエピトープIペプチドまたはポリペプチドに結合するように向けられた単離された抗体も本発明の観点の中にある。そのようなポリクローナル抗体は、典型的には哺乳動物、好ましくは霊長類を上記の2つの必要なエピトープI免疫原、ならびに霊長類が認識する他のエピトープI免疫原および任意の免疫原の寄せ集めを含有するペプチド/ポリペプチド組成物で免疫感作することにより生成される。特に免疫原として望ましいのは、以下の実施例3に記載する合成遺伝子または融合タンパク質のような7価の霊長類が認識するエピトープI免疫原(すなわち稀な変異体無しの)または8価の免疫原、および/または一価のエピトープII免疫原(すなわち場合によりキャリアーに結合した単一のエピトープIIペプチド)である。霊長類で生成することに加えて、そのような抗体はいわゆる「ヒト化」トランスジェニックマウスを含むトランスジェニック動物でも生成することができる。しかし本発明の組成物に対してポリクローナル抗体を生じるために望ましい宿主にはヒトを含む。エピトープI組成物に対して暴露された哺乳動物で生成するそのようなポリクローナル抗体の力価は、酵素-結合免疫吸着アッセイを用いるような標準的な技法により監視することができる。所望により、抗体分子は哺乳動物から、例えば全血、血漿または血清から単離することができ、そしてさらに通例の技法により免疫感作した哺乳動物の血漿または血清から精製することができる。通例の回収法には、中でも血漿瀉血、プロテインAクロマトグラフィーを含む。そのようなポリクローナル抗体組成物は、それら自体で本発明の医薬組成物として使用することができる。

## 【0055】

あるいは抗体生産細胞を哺乳動物から得、そして他の形態の抗体およびリガンド、例えばモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイ(phage display)をスクリーニングすることにより生成されるリガンド、それらの抗体フラグメントおよび混合物、および合成抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および完全なヒト抗体を調製することができる。これらの種類のリガンドを生成する調製的技法は既知であり、そしてリガンド自体は霊長類が認識するエピトープIおよび任意の免疫原の開示されたアミノ酸配列を使用して生成することができる。例えばKohler and Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-497; Kozbor et al., (1983) *Immunol. Today*, 4: 72; Cole et al., 1985, モノクローナル抗体および癌療法(Monoclonal

10

20

30

40

50

nal Antibodies and Cancer Therapy)、アラン R. リス (Alan R. Liss) 社、第 77-96 頁; Harlow et al., 抗体: アラボラトリーマニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)、コールドスプリングハーバーラボラトリー、(1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10032 (1989); Hodgson et al., Bio/Technology, 9: 421 (1991); 国際特許出願 PCT/GB91/01554 号、国際公開第 92/04381 号明細書、および国際特許出願 PCT/GB93/00725 号、国際公開第 93/20210 号明細書を参照にされたい]。

## 【0056】

例えば別の態様ではモノクローナル抗体は、上記に定める可変アミノ酸および R 基を含むエピトープ I の式により定められる任意のより大きな免疫原を含んで成る HIV Tat タンパク質の - Asp - Pro - Y<sub>7</sub> - Leu - X<sub>9</sub> - Pro - Trp - Z<sub>12</sub> - [配列番号 9] により定められる最小のエピトープ I 配列に特異的に結合する。1つの態様として、モノクローナル抗体はアミノ酸配列 - Asp - Pro - Asn - Leu - X<sub>9</sub> - Pro - Trp - Asn - [配列番号 26] (ここで X<sub>9</sub> は Glu または Asp である) に特異的に結合する。さらに上記式により定められる最小のエピトープ I 配列に特異的に結合する他のモノクローナル抗体は、本発明の一部である。

## 【0057】

本発明の別の態様ではモノクローナル抗体は、すでに記載した抗体により認識される - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - [配列番号 11] のエピトープとは異なるエピトープとして、アミノ酸配列 - Lys - X<sub>42</sub> - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - [配列番号 10] (ここで X<sub>42</sub> は Glu または Ala である) を含んで成る最小エピトープ II 配列に特異的に結合する。好ましくは抗体組成物は、X<sub>42</sub> が Gly であるペプチドおよび X<sub>42</sub> が Ala であるペプチドの両方に交差反応性である 1つの抗体を含んで成る。これらの抗体は好ましくは霊長類で生成される。上記式により定める最小エピトープ II 配列に特異的に結合するさらに別のモノクローナル抗体は、本発明の一部である。

## 【0058】

他の抗 - Tat 抗体は、HIV-1 Tat に結合する免疫グロブリンライブラリーの員を単離するために、本発明の霊長類が認識する HIV-1 Tat エピトープを用いて組換え組み合わせ免疫グロブリンライブラリー (例えば抗体展示ファージ) をスクリーニングすることにより開発することができる [W. D. Huse et al., Science, 246: 1275-1281 (1988)]。ファージディスプレイライブラリーの作成およびスクリーニングに関するキットは販売されており、例えばファルマシア (Pharmacia) の組換えファージ抗体系、カタログ番号 27-9400-01; ストラテジーン (Stratagene) 展示ファージキット等。例えば米国特許第 5,223,409 号明細書、国際公開第 92/09690 号、同第 90/02809 号明細書等を参照にされたい。キメラ抗体も既知の技法を使用して同様に開発することができる [中でも Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851; Takeda et al., Nature, 313: 452 (1984)]。キメラ抗体は異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。単鎖抗体は本発明により生成されるポリクローナルまたはモノクローナル抗体の可変部分を使用して、通例の方法 [例えば米国特許第 4,946,778 号および第 4,704,692 号明細書] により調製することもできる。Fab、F(ab')<sub>2</sub> および Fv フラグメントのような抗体フラグメントおよびそれらのライブラリーも、本発明の様々な観点で使用することができる。

## 【0059】

これらの抗体/リガンド組成物は、望ましくはほとんどの既知の HIV-1 Tat タンパク質変異体 (例えば既知の Tat タンパク質変異体の 95% より多く、そして好ましく

10

20

30

40

50

は99%より多い)に結合し、そしてさらにTatタンパク質によるHIV-1増殖の支持を防止する。そのような組成物はHIV-1の多数の株に由来するHIV-1 Tatタンパク質のエピトープ配列に結合する多数の異なる抗体の混合物を含むことができる。すなわちこれらの抗体は以下に記載する製薬的方法および製剤に有用である。

#### J. 本発明の医薬組成物

本発明の別の観点で、既知のHIV-1 Tatタンパク質のほとんど(例えば95%より多く、そして好ましくは99%より多い)と反応し、そしてHIV-1の増殖を減じる抗体を誘導するために有用な医薬組成物は、その活性剤として霊長類が認識する本発明の少なくとも2つの必要なエピトープペプチドまたはポリペプチド、および好ましくはさらなるエピトープペプチドを含んで成ることができる。幾つかの望ましい組成物には、

10

(a) 少なくとも2つの必要な、そしてより好ましくは少なくとも7つの霊長類が認識するエピトープアミノ酸配列[配列番号17~24]を含むペプチド/ポリペプチド免疫原;

(b) さらに任意のエピトープII、IIIまたはIVのアミノ酸配列、好ましくは一価のエピトープII免疫原を含む(a)のペプチド/ポリペプチド免疫原;

(c) 霊長類が認識する2つの必要なエピトープI配列、および好ましくはエピトープI配列[配列番号17~24]の7つおよび上記の任意の配列をコードする合成または組換え的に生成した遺伝子;

(f) (c)の合成遺伝子を含む合成分子;

20

(g) 合成遺伝子または上記の分子を持つ組換えウイルス; および

(h) 合成遺伝子または上記の分子を持つ片利共生細菌。

#### 【0060】

選択した活性成分(1つまたは複数)は製薬学的に許容されるキャリアー中に存在し、そして組成物はさらなる材料を含んでもよい。本発明の組成物を含有する医薬製剤は、タンパク質/ペプチド組成物にMAPのT細胞刺激剤、アジュバントおよびIL-12のような免疫刺激サイトカイン、および他の周知のサイトカインのような他の活性剤を含むことができる。これらすべての医薬組成物は、哺乳動物のウイルスレベルを下げるために作動することができる。

#### 【0061】

30

医薬組成物として、霊長類が認識するエピトープペプチドまたは核酸配列および任意の免疫原配列を含んで成る組成物は、ウイルス感染の予防または処置のための哺乳動物への投与に適する製薬学的に許容される賦形剤と混合する。タンパク質/ペプチドは投与のための単一の医薬調製物中で合わせることができる。本発明の免疫原性タンパク質様組成物で使用するために適当な製薬学的に許容されるキャリアーは、当業者には周知である。そのようなキャリアーには例えば塩水、緩衝化塩水、水酸化アルミニウムおよびマグネシウムの水性懸濁液のような選択したアジュバント、リポソーム、水中油型乳液およびその他を含む。適当なアジュバントは、本発明のタンパク質-含有組成物中に使用することができる。DNA、プラスミド核酸または組換えベクターの投与に適当な賦形剤には、限定するわけではないが、塩水またはシュクロース、プロタミン、ポリブレン、ポリリシン、ポリカチオン、タンパク質、CaPO<sub>4</sub>またはスペルミジンを含む。例えば国際公開第94/01139号明細書および上記に引用した技術文献を参照にされたい。ペプチド/ポリペプチド組成物および合成遺伝子または分子はインビボで、免疫感作した宿主の哺乳動物、例えばヒトにHIV-1に由来する多数の(例えば約95~約99%より多く)既知の細胞外Tatタンパク質変異体を阻止することができる免疫応答を誘導し、そしてこれによりウイルスレベルを下げる。

40

#### 【0062】

HIV-1の増殖を減損するために有用なさらに別の医薬組成物は、上に詳細に記載した1以上の抗体を含有する抗体組成物を含んで成る。医薬組成物では、抗体は塩水溶液または他の適当なキャリアー中で運ばれる。抗体組成物は即座の、外から提供されるTatの

50

阻止を提供することができる。

【0063】

本発明は通例の生理学的に許容されるキャリアー、アジュバント、または上記の種類の医薬調製物に有用な他の材料の選択に限定されない。適当なpH等張性、安定性および他の通例の特性を有する上記成分からのこれらの製薬学的に許容される組成物の調製は、当該技術の範囲内である。

K. 本発明の方法 - HIV - 1 増殖の減損

本発明により、HIV - 1 のウイルスレベルを減少させる方法には、ヒトを上記の Tat 抗体 - 誘導医薬組成物に暴露し、多数の HIV - 1 Tat タンパク質（例えば既知の 95% より多く、そして好ましくは 99% より多い）と反応する抗体を活発に誘導し、そしてインビボでウイルスの増殖を減じることを含む。この方法はコンピテントな免疫系を持つ HIV - 1 に感染した個体に、あるいは非感染個体の能動免疫感作に相当である。この方法は、HIV - 1 Tat タンパク質と反応する抗体を誘導し、HIV - 1 の初期の急性感染中にウイルス増殖を減少させ、そして AIDS を導く慢性のウイルス血症を最小とする。またこの方法は、感染した個体の慢性的なウイルス増殖も下げ、ここでも AIDS への進行を最小とする。これらの方法の使用は慢性の HIV - 1 感染を防御し、耐性の発生に供することなく新規な処置のメカニズムを提供する。細胞外 Tat タンパク質はウイルス複製部分とは関係しないので、Tat に対する抗体は、生成されている Tat とは無関係に HIV - 1 準種 (quasispecies) の複製を阻害する。よってどのメカニズムにより Tat 抗体が非反応性の エスケープ Tat 変異体に関する選択圧を生じることができたのかは明らかではない。

【0064】

この方法により、医薬組成物は好ましくはペプチド/ポリペプチド組成物、合成遺伝子または分子、組換えウイルスまたは片利共生細菌を含む。好ましくは組成物は 7 価の合成遺伝子または融合タンパク質（エピトープ I の稀な変異体無しで）、あるいは実施例 3 の 8 価の合成遺伝子または融合タンパク質および任意に 1 価のエピトープ II ペプチドを含む。医薬組成物のこれらの活性成分の各々は、感染細胞から他の感染または非感染細胞への Tat の輸送を遮断する抗 - Tat 抗体の形成を暴露したヒト中で活発に誘導する。この作用は感染の多重度を下げ、そして HIV - 1 ウイルス拡大のバーストを遮断し、すなわちウイルスレベルを下げる。すでに感染した患者では、このウイルスレベルの低下法は慢性ウイルス血症および AIDS への進行を下げるができる。非感染のヒトでは、本発明の組成物の投与は急性の感染を減じることができ、すなわち慢性ウイルス血症および AIDS への進行を最小にする。

【0065】

さらに本発明の別の観点は、HIV - 1 による感染に対して効果的または迅速な免疫応答を上げることができないヒトに、上記の抗体組成物を含有する医薬組成物を投与することにより、HIV - 1 のウイルスレベルを下げる方法である。この方法は組成物を長期に投与することを含むことができる。中でもこの方法を用いた処置に適するような患者は、疾患により免疫抑制になり、そして強力な免疫応答を上げることができない HIV - 1 感染患者である。HIV - 1 感染の後期では、疾患に付随する免疫傷害により抗体の効果的な力価生成の見込みは低い。また中でもそのような患者は、HIV - 1 に感染した妊婦、感染した母親から生まれた新生児、および暴露されたと推定される非免疫感作患者である（例えば、HIV - 1 感染したヒトにより使用された針で偶然「刺された」ヒト）。

【0066】

そのような患者に関して、本発明の方法は好ましくは医薬組成物として本発明の抗体組成物を使用する。抗体組成物には他の哺乳動物、好ましくは正常なヒトで調製されたポリクローナル抗体組成物、あるいは上記の他の抗体形態、例えばモノクローナル等を含む。これらの抗体組成物は、受動免疫療法として投与してウイルス増殖を阻害し、そしてウイルス負荷量を下げる。HIV - 1 に由来する多数の既知の Tat タンパク質と反応する外因性抗体は患者内に、ウイルス感染した細胞からの Tat を他の感染または非感染細胞へ輸

送することを直ちに阻止することを提供する。この方法により、患者は長期の処置養生中、抗体組成物で長期に処置することができる。

【0067】

上記の各方法では、本発明の組成物を適当な経路、例えば皮下、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、鼻内または吸入経路により投与する。現在好適な投与経路は、免疫感作（能動誘導）組成物には筋肉内であり、そして抗体（受動療法）組成物には静脈内（i.v.）、皮下（s.c.）または筋肉内（i.m.）である。組換えウイルスベクターまたは裸のDNAは好ましくは筋肉内に投与される；しかし他の特定の組換えウイルスベクターおよび/または生きている片利共生細菌を経口的に送達してもよい。

【0068】

各ワクチン用量中に存在する本発明のタンパク質、ペプチドまたは核酸配列の量は、患者の年齢、体重、性別、一般的な身体状態等を考慮して選択される。免疫応答、好ましくは防御応答を誘導するために、あるいは重大な副作用無しに患者に外因的効果を生じるために必要な活性成分の量は、使用する医薬組成物およびアジュバントの任意の存在（例えばタンパク質を含有する組成物について）に依存して変動する。

【0069】

一般に、タンパク質/ペプチド、融合タンパク質、MAPまたは結合したタンパク質を含有する組成物、あるいは抗体組成物について、各々の用量は1mLの滅菌溶液あたり約50 $\mu$ g～約20mgの間のペプチド/ポリペプチド免疫原を含んで成るだろう。より好適な投薬用量は、約500 $\mu$ gの免疫原である。他の投薬用量範囲も、当業者により企図される。初期用量は場合により望む場合は追加免疫により繰り返される。

【0070】

本発明の抗体組成物は、針により刺されたり、または材料の感染により急性感染の危険性がある個体の長期処置に使用することができる。そのような「急性」感染に関する投薬頻度は、約6週間にわたり毎日の投薬から1週に1または2回のi.v.、s.c.またはi.m.の範囲でよい。本発明の抗体組成物は感染患者、または進行したHIV患者の長期の処置に使用することができる。感染患者では、長期投与の頻度は毎日の投薬から1カ月に1または2回のi.v.、s.c.またはi.m.の範囲でよく、そして免疫原の半減期（例えば約7～21日）に依存するだろう。しかしそのような感染した患者の長期的処置の期間は定まらず、しかし長期になると思われる。

【0071】

あるいは本発明の組成物は、「裸のDNA」として本発明の合成遺伝子または分子の直接投与を設計することができる。タンパク質免疫原組成物のように、DNAおよびベクター組成物中の成分の量および投与様式（例えば注射または鼻内）は、当業者により選択され、そして調整され得る。一般に各用量は1mLの滅菌溶液あたり約50 $\mu$ gから約1mgの間の免疫原をコードするDNAを含んで成る。

【0072】

合成遺伝子または分子を含有する組換えウイルスについては、用量は約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$  pfu/mlの本発明の組換えウイルスの濃度を含有する約20から約50mlの塩溶液の範囲であり得る。好適なヒトへの投薬用量は、上記濃度で約20mlの塩溶液である。しかし当業者はそのような投薬用量が宿主に送達される組換えウイルスの独自性および免疫原の作りに依存して変わり得ると理解している。

【0073】

患者に送達される合成遺伝子または分子を運ぶ片利共生細菌の量は、一般に約 $10^3$ から $10^{12}$ 細胞/kgの間の範囲である。これらの投薬用量は、使用する細菌および生きている細菌により送達されるエピトープIおよび任意の免疫原を含有する特定の組成物に依存して、当業者により変えることができる。

【0074】

このよう本発明の組成物は、選択したウイルスによる非感染哺乳動物、例えばヒトの感染を遅らせるか、または最小にするように設計する。そのような組成物は、このようにワク

10

20

30

40

50

チンとしての用途を有する。抗-Tatタンパク質抗体は、感染後の血清変換を検出するために診断アッセイに使用されるHIV-1タンパク質と反応性ではない。すなわち本発明の組成物で処置された個体は、HIV-1感染について疑陽性試験の烙印を押されず、そして処置した患者がHIV-1に感染するようになった場合、血清変換を検出する可能性を残す。

#### 【0075】

たとえタンパク質/ペプチドを含有する組成物として、または免疫原をコードする新規核酸配列の投与によるいずれでも、哺乳動物に本発明の組成物を提供すると、これは望ましくはHIV-1の既知のTatタンパク質変異体の約95%より多く、そして好ましくは約99%より多くの生物学的阻止によりウイルスレベルを下げるのが可能となり、HIV-1の多重度を下げるので、根本的に異なる方法のAIDS予防接種を可能とする。

10

#### 【0076】

Tat免疫原を含有する組成物の使用は、そのようなウイルスに対して使用される他の処置および予防法とは対照的に、特に望ましい利点を有する。細胞外でのTatタンパク質の阻止は、すべてのHIV準種または株の増幅を無差別に阻害するので、突然変異体ウイルス変異体の選択について親のウイルス自体に関する選択圧を生じない。すなわち、患者の細胞によるTatタンパク質の取り込みの遮断は、ウイルス血症のレベルを減少するだけでなく、「エスケープ変異体」の選択を排除する様式でもウイルス血症のレベルを減少する。

#### 【0077】

さらに疾患の経過中、細胞外Tタンパク質はHIV-1感染のその段階で存在する持続的感染および免疫異常に寄与するので、本発明はウイルス血症の無症状HIV-1感染患者を活発に処置する方法を含んで成る。本発明に従い免疫感作により誘導される抗体による細胞外Tタンパク質の阻止は、より効果的な免疫防御でウイルス血症を低下させ、そしてAIDSへの進行の遅れまたは防止をもたらす。

20

#### 【0078】

上記の本発明のメカニズムは、ウイルス感染の過程を妨げ、そして望ましい臨床結果を生じる。より具体的には、本発明の組成物は非感染細胞によるTatタンパク質のさらなる取り込みを遮断することにより、ウイルスにすでに感染した患者のウイルス血症を減少することができる。単独またはHIV感染患者のための他の治療的処方と一緒に使用される本発明の組成物は、ウイルス血症の減少および臨床的な悪化の防止を補助すると思われる。

30

#### 【0079】

そのような治療的使用については、投与の製剤および様式は上記に具体的に記載したものと実質的に同一であり、具体的なウイルス感染について他の通例の治療と同時(*concurrently or simultaneously*)に投与することができる。治療的使用または予防的使用のために、1年後の追加免疫または他の間隔の追加免疫のような免疫感作組成物の繰り返し投与が望ましいかもしれない。

#### L. 本発明の診断キット

上記のペプチドおよびポリペプチドは、上記組成物の予防接種により誘導される抗体の力価および特異性を測定および検出するために有用なキットの試薬としても使用することができる。本発明のキットは上記に同定した少なくとも2つの必要なエピトープIペプチド、および好ましくは2以上の霊長類が認識するエピトープIおよび任意の免疫原を含むことができる。1つの態様では、各ペプチドはそのN末端にタンパク質ピオチンおよびスペーサー、例えば-Ser-Gly-Ser-Gly-[配列番号27]を有する。あるいは、ペプチドはそのC末端にスペーサー、例えば-Gly-Ser-Gly-Ser-[配列番号39]およびタンパク質ピオシチンを有する。これらの態様で、ペプチドがアビジン-コート固体支持体、例えばプレートまたはビーズに結合できるようになる。診断アッセイ分野で当業者に既知の他の結合剤は、同じ目的に使用することができる。またキットに提供されるのは、ヤギ抗-ヒト免疫グロブリン等のような固定化エピトープペプチド

40

50

への抗体の結合を検出する標識試薬である。試薬上の標識は、放射性化合物、蛍光化合物およびタンパク質、発色酵素等のような多くの既知の診断標識から選択することができる。キットはまた、標識を読むための種々雑多の試薬および装置、例えば発色シグナルを生成するために、このように酵素標識と相互作用する特定の基質、例えば血液サンプルを採取する装置ならびに適当なバイアルおよび他の診断アッセイ部品を含む。当業者はこのキットのために他の通例の診断成分も容易に選択することができる。

#### 【0080】

そのようなキットおよび試薬は本発明の組成物で予防接種した個体中の抗体の力価および反応性パターンを検出する方法に使用することができる。Tat免疫原に対する免疫感作により誘導される抗体の存在およびまたは力価を測定する方法には、免疫感作した個体由来する生物サンプル（例えば体液、好ましくは血液、血清または血漿、しかしまた尿、唾液および他の流体または組織も可能）を、好ましくはプレートまたはビーズのような固体支持体上に固定化された霊長類が認識するエピトープIおよび任意の免疫原の1以上の結合配列と接触させる工程を含む。この方法で使用する霊長類が認識するエピトープIおよび任意の結合配列は、非修飾の最小エピトープ結合領域である。

10

#### 【0081】

いったん生物サンプルを固定化されたペプチドに十分な時間暴露したら、支持体を洗浄してペプチドに結合しない生物サンプルからのいかなる材料も排除する。そのような洗浄工程は診断アッセイでは通例であり、そして塩水を用いて行われる。エピトープIおよび任意の免疫原またはそれらの組み合わせに対する抗体が上記の処置により個体に誘導されれば、固定化されたペプチドは生物サンプルに由来する抗体に結合した。その後、標識試薬を支持体上の材料に加えて、支持体上のペプチドと該生物サンプル中の抗体との間の結合を検出する。好ましくはそのような試薬はヤギ抗-ヒト免疫グロブリンのような抗-ヒト免疫グロブリンである。この標識は、上記に検討したような通常使用される診断用標識の広い配列から選択される。1つの態様では、標識は基質と接触すると検出可能な色のシグナルを生成する発色酵素であることができる。色の存在および/または強度は、処置した個体中の抗体の誘導の証明を提供する。このアッセイは免疫感作の効力を測定するために、ならびに患者の免疫状態を監視するために使用することができる。

20

#### 【0082】

特定のアッセイ工程ならびに種々の検出可能な標識系の選択は、当該技術の範囲内である。そのような選択は日常的であり、そして本発明を限定しない。

30

#### M. 本発明の利点

本発明の組成物の利点の1つは、共通するBサブタイプのHIV-1の既知のTatタンパク質変異体の95から99%より多くと交差反応させるために、本発明の組成物に包含するために必要な少数の免疫原である。以下の実施例で具体的に説明するように、2つの必要な霊長類が認識するエピトープIアミノ酸配列ならびに6個のさらなるエピトープI配列を含む霊長類が認識するエピトープI免疫原性組成物は、共通するBサブタイプのHIV-1の95%のTatタンパク質ならびにHIV-1の少ない非-Bサブタイプに由来するすべての56個のTatタンパク質配列と交差反応する。このように1つの組成物は、遭遇し得るほとんどのHIV-1株により引き起こされる感染に対して保護し、そして処置するために有用に使用され得る。

40

#### 【0083】

さらに結合が望まれるTatの正確なエピトープが同定されれば（すなわち、配列番号15のAA5-12）、本明細書に記載した方法を使用して新しく発生したHIV-1株または新たに発見された株に由来する新しい望ましいTatペプチド免疫原を容易に同定し、そしてこの組成物に含めることができる。この柔軟性により、本発明の組成物を将来同定される任意の新規HIV-1株（1つまたは複数）に対して予防的に有用とすることができる。本明細書に教示する観点において、当業者はTat免疫原（およびそれらをコードする核酸構築物）の新規組み合わせを組成物に容易に包含できると予想される。

#### 【0084】

50

例えば、PCRおよび高密度オリゴヌクレオチド配列 [ M . J . K o z a l e t a l , Nature Med. , 2 : 7 5 3 ( 1 9 9 6 ) ] のような通例の技法を使用して、当該技術分野の技術の1つでHIV-1株およびサブタイプの臨床的単離物の変異体を表すHIV-1 Tatタンパク質の大きな列のアミノ酸配列が得られるようになる。そのような技法の使用により、HIV-1 Bサブタイプの他の変異体ならびに今日までそれほど徹底的に研究されていない発展途上国での他のサブタイプの決定が可能となる。新規Tat配列の決定により、免疫原として対応するペプチドを本発明の組成物に直ちに含めることができ、他の稀なHIV-1のTatタンパク質に対する抗体応答の誘導を可能とする。

#### 【0085】

各Tat変異体に対応する合成ペプチドに対して生じる抗体との交差反応性の実験を使用して、配列の変化が免疫学的にサイレントなTat変異体を用いた免疫感作の必要性を排除することができる(これらのペプチドはコンセンサス配列または他の変異体に対する抗体により強力に結合するので)。

#### 【0086】

以下の実施例は、本発明の組成物を調製し、そしてこれら組成物を使用して免疫感作された宿主中のウイルスのTatタンパク質に対する抗体を誘導する好適な方法を具体的に説明する。これらの実施例は具体的説明のみであり、本発明の範囲を限定しない。

#### 【0087】

##### 【実施例】

実施例1 - HIV-1 Tatタンパク質中の霊長類が認識するエピトープIに関する抗体に結合するために必要な最小Tatタンパク質アミノ酸配列に関する免疫学的研究。配列変異およびこれらの配列に対する抗血清の免疫学的交差反応性

##### A. 合成ペプチドおよび結合物

合成ペプチドは固相合成により誘導化したポリエチレン支持体上で合成した [ R . M . V a l e r i o e t a l . , Int. J. Peptide Res. , 4 4 : 1 5 8 - 1 6 5 ( 1 9 9 4 ) ] 。免疫感作するペプチドはキャリアータンパク質に結合し易くするために含めるアミノ末端Cysおよびアミド化C-末端を用いて合成した。検出体ペプチドはアミノ末端ピオチン-Ser-Gly-Ser-Gly-配列 [ 配列番号7 ] および反応性および交差反応性を検出するためのELISAアッセイに使用するC-末端での遊離酸官能基を用いて合成した。ジフテリアトキシド(DT)キャリアータンパク質にシステインの側鎖を介して結合した、5~8のペプチド-キャリアー比を有する免疫感作ペプチド [ A . C . J . L e e e t a l . , Molec. Immunol. , 1 7 : 7 4 9 ( 1 9 8 0 ) ] は、高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)により、分析用HPLCおよび質量分析で95%より高い純度に精製し、検出体ペプチドは50%より高い純度で使用した。

##### B. 免疫感作

ペプチド結合体は精製水に溶解し、そして完全フロインドアジュバント(CFA)または不完全フロインドアジュバント(IFA)で1:1に乳化した [ 抗体-アラボラトリーマニュアル ( ANTI BODIES - A LABORATORY MANUAL ) 、 E . H a r l o w a n d P . L a n e 編集、コールドスプリングハーバーラトリー ( 1 9 9 8 ) ] 。霊長類あたりの総容量は1mlであり、これはDTに結合した100μgのペプチドを含んだ。

#### 【0088】

ウイルス対抗実験の一部であったアカゲザルは、IFA/CFA中の抗原で以下のように免疫感作した。免疫感作ペプチドには数匹の霊長類を使用し、最初にCFA中の結合体で初期筋肉内(IM)注射、そして続いてIFA中の結合体を用いて2週目にIMで追加免疫した。前血液は最初の注射前に採取し、そしてより大量の血液は追加免疫注射から3および5週間後に採取した。

##### C. ELISA力価

10

20

30

40

50

ELISAアッセイは、H. M. Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3998 (1983)に記載されているように行った。抗体力価はバックグラウンドより高い1.0 ODの吸収を生じる血清希釈物の逆数である。2~3血清の幾何平均力価(GMT)を各応答について計算するか、または1つの血清のみを数匹のサル免疫感作に利用した。

#### 【0089】

ウサギ対サルにおけるこのアッセイに関するELISAの結果を、それぞれ図1Aおよび1Bに示す。ELISAの結果はエピトープIを包含する免疫原に対する霊長類の抗体が、配列 - Asp - Pro - Arg<sub>7</sub> - Leu - Glu<sub>9</sub> - Pro - Trp - Lys<sub>1,2</sub> [配列番号15のAA5~12]と反応していたことを示した。以下に検討するように、7、9および12位は、霊長類により認識されるこのエピトープIペプチドの共通する変異を表す。D. エピトープ内のアミノ酸配列多様性の分析

HIV-1 Tatの第1エクソン配列はGene BankおよびロスアラモスのヒトレトロウイルスおよびAIDSデータベース[ニューメキシコ州、ロスアラモスのロスアラモス国立研究所の理論生物学および生物物理学グループにより公開された、ヒトレトロウイルスおよびAIDS 1996 (HUMAN RETROVIRUSES and AIDS 1996)、およびロスアラモス研究所のEsther Guzmanの好意によりGene Bankから得たさらなる配列]から引き出した。フレームシフトを導く不完全配列および終結コドンまたは塩基欠失を持つ配列は、同じ単離物からの明らかな同一反復配列であったので削除した。エピトープ中のその位置でのアミノ酸の変化を記録し、そして表にした。

#### E. 変異体間の抗原の交差反応性

エピトープのコンセンサス配列に対する抗血清は、コンセンサス配列および共通アミノ酸変異体を含む配列でELISAにより滴定して、抗原性に対するアミノ酸多形性の効果を決定した。

#### F. 配列の変化

霊長類が認識するエピトープIコンセンサス配列は、最大頻度および霊長類の抗体による認識について評価した。294個のBクレード(I)ウイルスに由来するHIV-1 Tatタンパク質および56個の非-Bクレード(II)ウイルスに由来するHIV-1 Tatタンパク質中の抗原性および配列保存をエピトープについて評価し、そして結果を以下の表IIからIVにまとめた。

#### 【0090】

表IIおよびIIIの上列は、最大頻度のコンセンサス配列を示す。中列は複数の場合に各位置で5%より高い配列に見いだされるアミノ酸の発生率を含む。各表の下列は複数の場合に5%より高い配列が生じるアミノ酸を含む総発生率である。表II中のこれらの選択のすべて; およびアミノ酸4に入る場合を除いて表IIIにおけるこの選択のすべてが抗原的に際立つエピトープ(<25%交差反応性)を生成する。

#### 【0091】

#### 【表2】

10

20

30

表Ⅱ  
 エピトープⅠ-294個のBクレード

Val <sub>4</sub>	Asp <sub>5</sub>	Pro <sub>6</sub>	Arg <sub>7</sub>	Leu <sub>8</sub>	Glu <sub>9</sub>	Pro <sub>10</sub>	Trp <sub>11</sub>	Lys <sub>12</sub>
			Arg (73)					Lys (96)
			Lys (12)					Asn (2)
			Ser (11)					
			Asn (4)					
100%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

10

【 0 0 9 2 】

【 表 3 】

表Ⅲ  
 エピトープⅠ-56個の非Bクレード

Val <sub>4</sub>	Asp <sub>5</sub>	Pro <sub>6</sub>	Asn <sub>7</sub>	Leu <sub>8</sub>	Glu <sub>9</sub>	Pro <sub>10</sub>	Trp <sub>11</sub>	Asn <sub>12</sub>
Val (89)			Asn (79)		Glu (86)			Asn (87)
Ile (11)			Lys (14)		Asp (14)			Lys (13)
			Ser (5)					
100%	100%	100%	98%	96%	100%	98%	100%	100%

20

【 0 0 9 3 】

表ⅠⅠおよびⅠⅠⅠに示すように、霊長類が認識するエピトープⅠは有力な16倍の抗原性多形を有するが、Bクレードに関しては1つの主要抗原が存在し、そして非-Bクレードに関しては別の主要抗原が存在する。5個の他の変異体は、既知のT a t変異体の95%より多くの要因である。表ⅠⅤおよびⅤを参照にされたい；アスタリスクで示す配列は、Bおよび非-Bクレードの両方で表される。

30

【 0 0 9 4 】

【 表 4 】

表VI-Bクレート(294配列)

霊長類のエピトープ配列	配列番号	発生	発生率
ValAspProArgLeuGluProTrpLys	配列番号15の AA4-12	220	75
ValAspProLysLeuGluProTrpLys*	配列番号12の AA185-193	35	12
ValAspProSerLeuGluProTrpLys	配列番号12の AA120-127	20	7
ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*	配列番号12の AA55-63	7	2
		合計:282	合計:96
ValAspProArgLeuGluProTrpAsn	28	1	<1

10

【0095】

【表5】

20

表V-非-Bクレート(56配列)

霊長類のエピトープ配列	配列番号	発生	発生率
ValAspProAsnLeuGluProTrpAsn	配列番号13の AA227-235	36	64
ValAspProLysLeuGluProTrpAsn	配列番号13の AA344-352	8	14
ValAspProAsnLeuAspProTrpAsn	29	6	11
ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*	配列番号13の AA55-63	3	5
ValAspProLysLeuGluProTrpLys*	配列番号12の AA185-193	1	2
		合計:53	合計:95
ValAspProSerLeuGluProTrpAsn	配列番号13の AA279-287	1	2
ValAspProSerLeuAspProTrpAsn	30	1	2
ValAspProAsnLeuAspProTrpLys	31	1	2

30

40

【0096】

表VIは、エピトープIの位置7の変異体の悪い抗原交差反応性、位置9の変異体の抗原的特徴、および位置7および12の両方に変異を含むGluProValAspProArg<sub>7</sub>LeuGlu<sub>9</sub>ProTrpLys<sub>12</sub> [配列番号15のAA2~12]を含むGluProValAspProAsn<sub>7</sub>LeuGlu<sub>9</sub>ProTrpAsn<sub>12</sub> [配列番号13のAA225-235]に対する抗血清の極端に欠けた交差反応性を示す。これはさらにGlu<sub>9</sub>およびAsp<sub>9</sub>変異体の抗原的特徴を示す。

50

【 0 0 9 7 】

表 V I - T a t アミノ酸 7、9 および 1 2 位に変異を有する検出体ペプチドに関するエピートープ I 免疫原に対するサル抗血清の E L I S A 反応性

【 0 0 9 8 】

【 表 6 】

免疫原のエピートープ配列	検出体ペプチドのエピートープ配列力価 (自己ペプチドの力価%)			
GluProVal AspProAsn, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号12の AA53-63]	GluProVal AspProAsn, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号12の AA53-63]	GluProVal AspProArg, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号15の AA2-12]	GluProVal AspProLys, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号12の AA183-193]	GluProVal AspProSer, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号12の AA105-115]
	119,000 (100)	25,000 (21)	24,000 (20)	24,000 (20)
GluProVal AspProAsn, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpAsn <sub>12</sub>  [配列番号13の AA225-235]	GluProVal AspProAsn, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpAsn <sub>12</sub>  [配列番号13の AA225-235]	GluProVal AspProAsn, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号12の AA53-63]	GluProVal AspProArg, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号15の AA2-12]	
	157,000 (100)	23,000 (15)	2000 (1)	
GluProVal AspProAsn LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号12の AA53-63]	GluProVal AspProAsn, LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号12の AA53-63]	GluProVal AspProAsn, LeuAsp <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>  [配列番号32 ]		
	163,000 (100)	6000 (4)		

10

20

30

40

【 0 0 9 9 】

実施例 2 - H I V - 1 T a t タンパク質中の霊長類が認識するエピートープ I I に関する抗体への結合に必要な最小 T a t タンパク質アミノ酸配列に関する免疫学的研究。配列変異およびこれらの配列に対する抗血清の免疫学的交差反応性

実施例 1 に概説した手順と同じ手順を使用して、294種のB細胞および56種の非-Bクレード H I V - 1 T a t 配列に関するアミノ酸配列変異の発生率を、サルにおける抗体結合のエピートープ I I 境界内で定めた。結果を表 V I I および V I I I に報告する。表の上段は、コンセンサス配列を含む。中段は多数ある場合に、各位置で5%より多い配列が見られるアミノ酸の発生率を含む。下段は多数ある場合に、5%より多い配列で発生するアミノ酸を含む全発生率を示す。T a t 42位でのアミノ酸変異は、抗原的に交差反応

50

性であった。

【 0 1 0 0 】

【 表 7 】

表VII

エピトープⅡ-294Bクレード

Lys <sub>41</sub>	Gly <sub>42</sub>	Leu <sub>43</sub>	Gly <sub>44</sub>	Ile <sub>45</sub>	Ser <sub>46</sub>	Tyr <sub>47</sub>	Gly <sub>48</sub>	Arg <sub>49</sub>	Lys <sub>50</sub>
	Gly (72)								
	Ala (28)								
100%	100%	99%	99%	100%	98%	99%	100%	99%	100%

10

【 0 1 0 1 】

【 表 8 】

表VIII

エピトープⅡ-56非-Bクレード

Lys <sub>41</sub>	Gly <sub>42</sub>	Leu <sub>43</sub>	Gly <sub>44</sub>	Ile <sub>45</sub>	Ser <sub>46</sub>	Tyr <sub>47</sub>	Gly <sub>48</sub>	Arg <sub>49</sub>	Lys <sub>50</sub>
100%	100%	100%	99%	100%	95%	100%	100%	98%	100%

20

【 0 1 0 2 】

表V I IおよびV I I Iに示すように、エピトープI Iはほとんど完全な抗原性の保存を示した。

【 0 1 0 3 】

検出体配列内にT a t G l y<sub>42</sub>またはA l a<sub>42</sub> (変異体)を含む検出体ペプチドに関して、エピトープI I免疫原に対するサルの抗血清のE L I S A反応性を測定し、そして以下の表I Xに報告する。ウサギ対サルを対象とした結果のグラフ的比較に関しては、それぞれ図2 Aおよび2 Bを参照にされたい。

30

【 0 1 0 4 】

【 表 9 】

表IX

免疫原のエピトープ配列	検出体ペプチドのエピトープ配列力価 (自己ペプチドに対する%)	
LysGlyLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys [配列番号15のAA41-50]	LysGlyLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys [配列番号15のAA41-50]	LysAlaLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys [配列番号33]
	25,000 (100%)	19,000 (76%)

40

【 0 1 0 5 】

実施例3：無症候性H I V - 1感染に関するヒトモノクローナル抗体処置の開発

市販されているヒト化された抗体はマウスを、ジフテリアトキソイドキャリアータンパク質に結合させた適量のエピトープI I免疫原：C y s - G l y - S e r - L y s - G l y - L e u - G l y - I l e - S e r - T y r - G l y - A r g - L y s - アミド [ 配列

50

番号34]で免疫感作する。ハイブリドーマは、ストレプトアビジンをコートしたプレート上で、ピオチン-Ser-Gly-Ser-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-OH[配列番号35]およびナノモル以下の結合親和性を有するIgGモノクローナル抗体でスクリーニングし、そして相補的レセプターに対して結合しないものを選択する。特異性は組換えHIV-1 Tatタンパク質で確認する。

#### 【0106】

モノクローナル抗体は非-自己抗原に向けられるので、通例の前-臨床生産、精製および自己試験が予想される。内部のCD3で徹底的に消費されるマウスモノクローナル抗体であるOKT3の18時間の半減期に対して、ヒトモノクローナル抗体はヒトで20日の半減期を有する。毎日5mgのOKTの用量は、ヒトで約1マイクログラム/mlまでのトラフレベル(trough level)を維持する。すなわち5mgの抗-Tatモノクローナル抗体の隔週の用量は、同様なトラフレベルを維持するために十分であり、感染した患者中のHIV-1 Tatタンパク質について最高1ng/mlの予想される最大循環レベルを50倍より高いモル過剰になると期待される。

10

#### 【0107】

血漿ウイルス負荷量の対照は、今、HIV-1処置に関して許容される効力の基準である。抗-Tatモノクローナル抗体の効力は、最初の4週間の処置で無症候性HIV-1感染個体で迅速に決定することができる。このプロトコールは未処置患者、特に様々な理由からHAARTプロトコールで失敗した患者、またはHAART療法で管理されている患者に有用であり、この治療を4週間で離脱する(ウイルス負荷量はHAARTを止めれば急速にリバウンドする)。LOD(50ウイルスRNAコピー/ml)未満までの血漿ウイルス負荷量における2~3log減少は、長期間にわたり評価されるモノクローナル抗体での単独療法を支持する。1log(90%)以上ではあるがLOD未満ではない減少は、治療の成分としてのモノクローナル抗体の使用を支持している。

20

#### 実施例4-個体のAIDSへの進行を防止するための汎用的ワクチンの開発

##### A.合成遺伝子の構築

図3Aは、ウサギの抗体応答について検出されるエピトープIの各4つの多形の4つのコピーに加えて、大腸菌(E.coli)DnaK(HSP70)を含む線状融合タンパク質として大腸菌(E.coli)中で発現するエピトープIIの4つのコピーをコードする合成遺伝子を具体的に説明する。この発現タンパク質は、エピトープ特異的ウサギ血清を用いたELISAで試験した時に、すべての抗原性ペプチドを含んだ。しかしウサギまたはサルで免疫感作するために使用した時、すべてのエピトープI変異体は免疫原性であるが、エピトープIIは免疫原性ではなかった。すなわちエピトープIIは適当なキャリアタンパク質と結合した合成ペプチド結合体として最も良く使用される。

30

#### 【0108】

図3Bは、霊長類で認識されるエピトープI境界内の多形性にに基づき、霊長類が認識する8つのエピトープI多形を枠内に含むように構築された新規な8価の合成遺伝子を具体的に説明する：

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列 40  
番号17

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列  
番号19

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 配列  
番号22

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列  
番号20

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 配列  
番号24

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 配列 50

番号 2 1

R 1 - A s p - P r o - A s n - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R 2 配列  
番号 1 8 および

R 1 - A s p - P r o - A s n - L e u - A s p - P r o - T r p - A s n - R 2 配列  
番号 2 3。

【 0 1 0 9 】

エピトープ I 配列は、G l y および / または S e r 残基を含有するジペプチドスペーサーにより分けられている。この遺伝子は W . P . C . S t e m m e r e t a l . , G e n e , 1 6 4 : 4 9 ( 1 9 9 5 ) に記載されているように集成した。簡単に説明すると、上鎖の 6 0 - m e r オリゴヌクレオチド (オリゴ) および 2 0 ヌクレオチド ( n t ) を持つ底鎖オリゴの重複を、2 つの末端 5 0 - m e r と一緒に合成する。6 0 m e r をハイブリダイゼーション条件下で一緒にインキュベーションし、そしてポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) を使用して配列を埋め、そしてそれを増幅する。ついで末端の 5 0 - m e r を付加し、そして集成体を P C R により完成し、その完全長遺伝子をアガロースゲルで単離する。遺伝子を配列決定し、そして実際のエピトープ内に正しい配列を有することが分かる。類似の 7 個の遺伝子は、稀な変異体 R 1 - A s p - P r o - S e r - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R 2 [ 配列番号 2 4 ] を排除することにより構築することができる。

10

B . 融合タンパク質の発現

上に記載の遺伝子を次いで制限酵素により切り出し、そして枠内にジフテリアトキソイド ( H S P 7 0 ) の配列を含有する適当な発現ベクターに挿入する。大腸菌 ( E . c o l i ) をトランスフェクトし、そしてタンパク質を発現するコロニーを単離する。単離したコロニーを成長させ、そして発現を誘導する。融合タンパク質を発現しているコロニーに由来するタンパク質を同定する。生成したタンパク質は、常法を使用して精製する。

20

【 0 1 1 0 】

図 3 C は、類似の技術を使用してジフテリアトキソイドのようなキャリアータンパク質を持つ合成ペプチドの結合物として任意に調製した一価のエピトープ I I 免疫原を具体的に説明する。

C . 融合タンパク質内で正しいエピトープの発現および抗 - T a t 抗体の誘導における効力を評価するためのアッセイ

30

エピトープ I (ここで Y<sub>7</sub> は A r g , A s n , L y s または S e r のいずれかであり、そして X<sub>9</sub> は G l u であり、そして Z<sub>9</sub> は L y s である) の 4 つの変異体、およびエピトープ I I の両変異体は合成遺伝子中で構築し、そして A および B 章で記載したように融合タンパク質として発現させる。各エピトープが霊長類の抗血清により認識され得る状態の融合タンパク質で発現するかどうかを決定するために、エピトープ I 配列に対応する合成ペプチドに対して生成した霊長類の抗血清を、常法を使用して E L I S A により試験する。最初にプレートを融合タンパク質で直接コートし、ついでエピトープ I および I I に反応性であることが知られている 1 0 0 μ g / m l の抗血清溶液 (例えばウサギ抗血清) に暴露する。変異体のエピトープ配列は、各エピトープに関して 3 2 , 0 0 0 よりも大きな力価により示されるように、対応する合成ペプチドに対する抗体により認識される配列で発現される。

40

【 0 1 1 1 】

多価免疫原の免疫原性を評価するために、サルを I F A 中の融合タンパク質を用いて免疫感作した。サルの抗血清をエピトープ I および I I の合成ペプチドで評価した。有意な力価がエピトープ I 変異体で発生し、すなわちエピトープ I ( Y<sub>7</sub> が A r g であり、そして Z<sub>1 2</sub> が L y s である) に対して 2 8 , 0 0 0 の力価 ; エピトープ I ( Y<sub>7</sub> が A s n であり、そして Z<sub>1 2</sub> が L y s である) に対して 1 6 , 0 0 0 の力価 ; エピトープ I ( Y<sub>7</sub> が L y s であり、そして Z<sub>1 2</sub> が L y s である) に対して 3 7 , 0 0 0 の力価 ; そしてエピトープ I ( Y<sub>7</sub> が S e r であり、Z<sub>1 2</sub> が L y s である) に対して 4 , 0 0 0 の力価。エピトープ I I に対する力価は 7 0 0 であり、このエピトープが免疫感作に関してキャリア

50

ータンパク質に結合される合成ペプチドとして最高であることを表す。

実施例 5：予防接種により誘導された抗体の力価および特異性を検出するための方法およびキット

本発明のワクチンを用いて免疫感作した後に誘導された抗体の力価および特異性を追跡するために、アッセイ法を使用することができる。そのようなアッセイ法の 1 態様では、実施例 1 で報告した霊長類が認識するエピトープ I 配列を含有するペプチド（免疫感作ワクチンの組成物による）を使用して、予防接種した個体中の抗体の力価および反応性パターンを測定するキットを開発する。

【0112】

これらのペプチドは、N-末端にピオチン - Ser - Gly - Ser - Gly - [配列番号 36] を用いて合成する。各ペプチドは、関連する配列がアビジンのピオチン結合ポケットの外であることを確実にするために、スペーサーとして役立つ配列 - Ser - Gly - Ser - Glu - [配列番号 27] を用いて、別々のアビジンコートプレートに塗布する。次いでプレートを試験血清の希釈物とインキュベーションし、洗浄し、そして酵素で直接標識したヒト免疫グロブリン（例えばヤギ抗 - ヒト免疫グロブリン）に対する試薬を用いて抗体結合を測定する。試薬は酵素と反応するように採用され、そして発色シグナルを生成する（R & D キット インサート）。

10

【0113】

本発明の多数の修飾および変更は、上記に同定された明細書に含まれ、そして当業者には明白であると期待される。本発明の組成物および方法に対するそのような修飾および変更は、前記特許請求の範囲に包含されると考える。

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 A は、短縮化された検出体ペプチドでのより大きな直線状エピトープ I ペプチドに対するウサギ抗血清の ELISA 力価のグラフであり、大きなペプチドに対する最大結合の割合として表す。対応する検出体ペプチドの N - または C - 末端アミノ酸を、1 文字暗号で各カラムの下に示す。

図 1 B は、短縮化された検出体ペプチドでのより大きな直線状エピトープ I ペプチドに対する霊長類抗血清の ELISA 力価のグラフであり、大きなペプチドに対する最大結合の割合として表す。対応する検出体ペプチドの N - または C - 末端アミノ酸を、1 文字暗号で各カラムの下に示す。

30

【図 2】

図 2 A は、短縮化された検出体ペプチドでのより大きな直線状エピトープ II ペプチドに対するウサギ抗血清の ELISA 力価のグラフであり、大きなペプチドに対する最大結合の割合として表す。対応する検出体ペプチドの N - または C - 末端アミノ酸を、1 文字暗号で各カラムの下に示す。

図 2 B は、短縮化された検出体ペプチドでのより大きな直線状エピトープ II ペプチドに対する霊長類抗血清の ELISA 力価のグラフであり、大きなペプチドに対する最大結合の割合として表す。対応する検出体ペプチドの N - または C - 末端アミノ酸を、1 文字暗号で各カラムの下に示す。

40

【図 3】

図 3 A は、5 価のエピトープ I / エピトープ II HIV - 1 Tat 免疫原性構築物の設計を 3 文字アミノ酸暗号で具体的に説明する [配列番号 12]。

図 3 B は、8 価の汎用的エピトープ I の設計を 3 文字アミノ酸暗号で具体的に説明する [配列番号 13]。

図 3 C は、1 価の汎用的エピトープ II 免疫原性構築物の設計を 3 文字アミノ酸暗号で具体的に説明する [配列番号 14]。

【 図 1 】

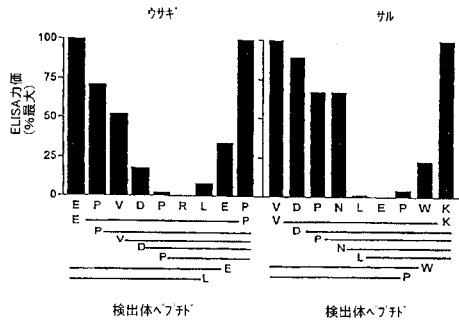


Fig. 1A

Fig. 1B

【 図 2 】

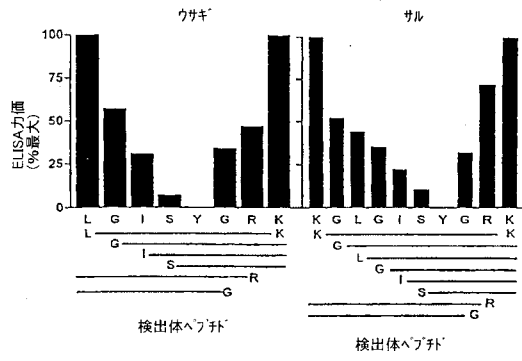


Fig. 2A

Fig. 2B

【 図 3 】

FIG. 3A [配列番号:12]

DnaK (HSP70)- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Arg -Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>n</sub>- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>n</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>n</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>n</sub> - (Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Ser-Gly-Ser)<sub>n</sub>

FIG. 3B [配列番号:13]

DnaK (HSP70) - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Arg -Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>n</sub>- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn -Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>n</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>n</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>n</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Asn -Leu-Ala-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>n</sub>- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>n</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>n</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>n</sub>

Fig. 3C [配列番号:14]

-Cys-Gly-Ser-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-アミノ酸に結合したシッフチンキリン結合体

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
8 November 2001 (08.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/82944 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 38/00, 38/04, 39/00, 39/12, 39/21, C07K 16/00, 17/00, 5/00, 7/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/13051
- (22) International Filing Date: 20 April 2001 (20.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/561,366 28 April 2000 (28.04.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THYMON L.L.C. [US/US]; 30 Dorison Drive, Short Hills, NJ 07078 (US).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): GOLDSTEIN, Gideon [US/US]; 30 Dorison Drive, Short Hills, NJ 07078 (US).
- (74) Agents: BAK, Mary, E. et al.; Howson and Howson, Spring House Corporate Center, P.O. Box 457, Spring House, PA 19477 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMPAIRING MULTIPLICATION OF HIV-1

WO 01/82944 A1

(57) Abstract: A composition which elicits antibodies to most (e.g., greater than 95 %) of the known variants of Tat protein of HIV-1 of both the B and non-B clades contains at least two variants of a peptide or polypeptide of the formula: R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>2</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID NO:8]. According to this formula, Y<sub>7</sub> is Arg, Lys, Ser or Asn; X<sub>2</sub> is Glu or Asp; Z<sub>12</sub> is Lys or Asn; R1 is hydrogen, a lower alkyl, a lower alkanoyl, or a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl; and R2 is a free hydroxyl, an amide, or a sequence of one or up to about 5 additional amino acids, optionally substituted with an amide. In this composition, at least one of the two variants contains Arg at Y<sub>7</sub> and Lys at Z<sub>12</sub>, and in at least a second of the two variants Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn. Vaccinal and pharmaceutical compositions can contain one or more such peptides associated with carrier proteins, associated in multiple antigenic peptides or as part of recombinant proteins. The addition to this combination of other optional immunogens can provide other compositions useful in eliciting primate anti-Tat antibodies which cross-react with multiple strains and variants of HIV-1 Tat protein. Vaccinal and pharmaceutical compositions can contain the primate antibodies induced by the peptide compositions for use in passive therapy. Diagnostic compositions and uses are described for assessing the immune status of vaccinated patients.

WO 01/82944

PCT/US01/13631

METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMPAIRING  
MULTIPLICATION OF HIV-1Field of the Invention

5 The present invention relates generally to compositions and methods useful for inhibiting the multiplication of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in infected patients, symptomatic or asymptomatic, and for attenuating HIV-1 multiplication following primary infection in previously uninfected subjects, thus minimizing progression to AIDS.

Background of the Invention

10 A variety of approaches to the treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) have focused on the transactivating (*tat*) gene of HIV-1, which produces a protein (Tat) essential for transcription of the virus. The *tat* gene and its protein have been sequenced and examined for involvement in proposed treatments of HIV [see, e.g., U. S. Patent Nos. 5,158,877; 5,238,882; and 5,110,802; International  
15 Patent Application Nos. WO92/07871, WO91/10453, WO91/09958, and WO87/02989, published May 14, 1992, July 25, 1991, July 11, 1991 and May 21, 1987, respectively]. Tat protein is released extracellularly, making it available to be taken up by other infected cells to enhance transcription of HIV-1 in the cells and by noninfected cells, to alter host cell gene activations. Tat renders the cells susceptible  
20 to infection by the virus. Uptake of Tat by cells is very strong, and has been reported as mediated by a short basic sequence of the protein [S. Fawell *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:664-668 (1994)].

Immunization with HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine is under active investigation. The HXB/LAV HIV-1 Tat sequence has been used as the immunogen in reported studies, either as a recombinant protein [A. Cafaro *et al.*, Nat. Med., 5:643-650 (1999)], a DNA vaccine [S. Calarota *et al.*, Lancet, 351:1320-5 (1998)], inactivated protein (Tat toxoid) [S. S. Cohen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(19):10842-10847 (1999); A. Gringeri *et al.*, J. Hum. Virol., 1:293-8 (1998)]  
25 or a DNA vaccine expressing inactive Tat [E. Caselli *et al.*, J. Immunol., 162:5631-

WO 01/82944

PCT/US01/13031

5638 (1999)]. Immunizations with the full Tat sequence induced both cellular and humoral immunity. See, also, M. C. Rhe *et al*, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Virol. 10:408-416 (1995); C. J. Li *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:8116-8120 (1997); and others].

5 International Patent Application No. WO92/14755, published September 3, 1992, relates to the Tat protein and to the integrin cell surface receptor capable of binding to the Tat protein. Two Tat sequences that bind integrin are identified: -Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg- [SEQ ID NO: 1], as well as -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro- [SEQ ID NO: 2]. These sequences are the basic region or  
10 domain which is the dominant binding site for the integrin. This specification demonstrates that a number of peptides corresponding to these Tat sequences and the corresponding integrins block *in vitro* cell binding to Tat coated plates, as do antibodies to the appropriate integrins. However, the specification also shows that these reagents do not block uptake of functional Tat by cells (see Example 9 in  
15 WO92/14755), thus nullifying the proposed mechanism of action for therapeutic benefit in HIV infection. The Tat sequences described in this international application are distinct from the peptide immunogens of the present invention.

Both monoclonal and polyclonal antibodies to Tat protein have been readily produced in animals and shown to block uptake of Tat protein *in vitro* [see,  
20 e.g., D. Brake *et al*, J. Virol., 64:962 (1990); D. Mann *et al*, EMBO L., 10:1733 (1991); J. Abraham *et al*, cited above; P. Auron *et al*, cited above; M. Jaye *et al*, cited above; G. Zauli *et al*, cited above]. More recent reports showed that monoclonal or polyclonal antibodies to Tat protein added to tissue culture medium attenuated HIV-1 infection *in vitro* [L. Steinaa *et al*, Arch. Virol., 132:263 (1994); M. Re *et al*, cited  
25 above; and G. Zauli *et al*, J. Acq. Imm. Def. Syndr. Hum. Retrovirol., 10:306 (1995)].

The inventor's own publications [G. Goldstein, Nature Med., 2:960 (1996); and International Patent Application No. WO95/31999, published November 30, 1995] reviewed the evidence indicating that secretion of HIV-1 Tat protein from infected cells and uptake by both infected and uninfected cells was important for the  
30 infectivity of HIV-1. Previous studies also showed that antibodies to Tat protein *in*

WO 01/82944

PCT/US01/13031

*in vitro* blocked uptake of Tat and inhibited *in vitro* infectivity. Active immunization of mammals was suggested to induce antibodies to HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine. See, also, G. Goldstein *et al.*, "Minimization of chronic plasma viremia in rhesus macaques immunized with synthetic HIV-1 Tat peptides and infected with a chimeric simian/human immunodeficiency virus (SHIV<sub>33</sub>)", *Vaccine*, 18:2789 (2000).

5  
10  
15  
20  
25  
30

Other publications by the inventor, International Patent Application No. WO99/02185, published January 21, 1999, and U.S. Patent No. 5,891,994, issued April 6, 1999 (both incorporated by reference herein), revealed a new concept in treatment and prevention of HIV-1 infection that utilized Tat sequences which were recognized as epitopes by the rabbit immune system. Unlike the prior disclosures discussed above, these publications relate to therapeutic and immunogenic combinations requiring at least two, and preferably all four, of the Tat peptides or polypeptides comprising the "Epitope I" sequences spanning Tat amino acid residues 4 (or 5) through 10, as follows: -Asp-Pro-X<sub>7</sub>-Leu-Glu-Pro- [SEQ ID NO: 3] or R<sup>1</sup>-Val-Asp-Pro-X<sub>7</sub>-Leu-Glu-Pro-R<sup>2</sup> [SEQ ID NO: 4], wherein X<sub>7</sub> is Arg, Lys, Ser or Asn. Such compositions induce antibodies that react with most HIV-1 Tat proteins and impair the multiplication of HIV-1. According to this publication, certain other Tat sequences, which comprise an "Epitope II" peptide or polypeptide spanning Tat amino acid residues 41-50 of the formula R<sup>3</sup>-Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R<sup>4</sup> [SEQ ID NO:5], wherein X<sub>42</sub> is selected from the group consisting of Gly or Ala, may be added to this composition. Alternatively, an "Epitope III" peptide or polypeptide spanning Tat amino acid residues 56-62 of the formula R<sup>5</sup>-Arg-Arg-X<sub>58</sub>-Z<sub>59</sub>-A<sub>60</sub>-Y<sub>61</sub>-Ser-R<sup>6</sup> [SEQ ID NO:6], wherein X<sub>58</sub> is selected from the group consisting of Ala, Pro, Ser and Gln; wherein Y<sub>61</sub> is selected from the group consisting of Asp, Asn, Gly and Ser; wherein Z<sub>59</sub> is selected from the group consisting of Pro and His; wherein A<sub>60</sub> is selected from the group consisting of Gln and Pro, may be added to this composition. Still alternatively, an "Epitope IV" peptide or polypeptide spanning Tat AA residues 62-73 of the formula R<sup>7</sup>-Ser-Gln-X<sub>64</sub>-His-Gln-Y<sub>67</sub>-Ser-Leu-Ser-Lys-Gln-Pro-R<sup>8</sup> [SEQ ID NO:7], wherein X<sub>64</sub> is selected from the group consisting of Asn and Thr; wherein Y<sub>67</sub> is selected from the group consisting of Ala

WO 01/82944

PCT/US01/13031

and Val, may be added to this composition. The composition itself may be employed to induce antibodies to a large number of Tat sequences characteristic of the multiple variants of HIV-1. The compositions or antibodies generated are used as vaccine or prophylactic treatments against these multiple variants.

5           Despite the growing knowledge about HIV-1 disease progression, there remains a need in the art for the development of compositions and methods for treatment of HIV-1, both prophylactically and therapeutically, which are useful to lower the viral levels of HIV-1 for the treatment and possible prevention of the subsequent, generally fatal, AIDS disease.

10   Summary of the Invention

In one aspect, the present invention provides a composition comprising at least two variants of a peptide or polypeptide of the Epitope I formula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID NO:8], wherein Y<sub>7</sub> is selected from the group consisting of Arg, Lys, Ser and Asn; wherein X<sub>9</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp; wherein Z<sub>12</sub> is selected from the group consisting of Lys and Asn; wherein R1 is selected from the group consisting of hydrogen, a lower alkyl, a lower alkanoyl, and a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl; wherein R2 is selected from the group consisting of a free hydroxyl, an amide, and a sequence of one or up to about 5 additional amino acids, optionally substituted with an amide. In this composition, at least one of the two variants must have the formula wherein Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys, and at least a second of the two variants must have the formula in which Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn. Each peptide of this composition is recognized as an HIV-1 Tat Epitope I by a primate immune system. This formula permits the construction and use of a variety of peptide combinations.

In another aspect, the above-described composition further contains one or more additional peptide or polypeptide(s) which represent other amino acid sequences which correspond to HIV-1 Tat amino acid residues 5 through amino acid residue 12. These optional amino acid sequences are described in detail below. These

WO 01/82944

PCT/US01/13031

sequences are preferably from an HIV-1 strain with a Tat protein variant at that location.

In another aspect, this invention provides a composition described above that contains peptides or polypeptides which comprise at least the two required  
5 Epitope I peptides, recognized by primates (and preferably additional Epitope I peptides), in combination with one or more HIV-1 Tat Epitopes II, III and/or IV. Epitopes II, III and IV are the HIV-1 Tat peptide formulae described in International Patent Publication No. WO99/02185, incorporated herein by reference. Such  
10 compositions can combine appropriate HIV-1 Tat peptides, so as to provide for a composition that induces antibodies reactive with greater than about 95% of all known HIV-1 Tat proteins.

In yet a further aspect, the invention provides an antibody composition comprising at least one antibody, preferably generated in a primate, which specifically binds to a peptide or polypeptide of the formula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-  
15 Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID NO:8], wherein Y<sub>7</sub> is selected from the group consisting of Arg, Lys, Ser and Asn; wherein X<sub>9</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp; wherein Z<sub>12</sub> is selected from the group consisting of Lys and Asn; wherein R1 is selected from the group consisting of hydrogen, a lower alkyl, a lower alkanoyl, and a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower  
20 alkyl or lower alkanoyl; wherein R2 is selected from the group consisting of a free hydroxyl, an amide, and a sequence of one or up to about 5 additional amino acids, optionally substituted with an amide. This antibody composition preferably comprises at least two antibodies, i.e., one antibody which binds to the Epitope I variant in which Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys, and at least a second antibody which binds to a second  
25 Epitope I variant in which Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn. Other antibodies directed to other variants than the two specified variants may also be included in this composition. These antibodies in the composition bind to Epitope I sequences recognized by the primate immune system, which epitope is present on multiple variants of HIV-1 Tat proteins. These antibodies include a variety of antibody  
30 constructs, such as monoclonal antibodies, as described in detail below.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

In still another aspect, the invention provides an antibody, particularly a monoclonal antibody, which specifically binds to a primate-recognized epitope of an HIV Tat protein, the epitope comprising the amino acid sequence -Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>- [SEQ ID NO:9], wherein Y<sub>7</sub>, X<sub>9</sub> and Z<sub>12</sub> are defined as above.

5 In yet another aspect, the invention provides an antibody composition comprising at least one antibody that recognizes Epitope II peptide sequence -Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [SEQ ID NO: 10], where X<sub>42</sub> is Gly or Ala, as a distinct epitope from previously described antibodies which recognize the epitope of -Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-[SEQ ID NO: 11]. Preferably, the composition  
10 comprises one antibody which recognizes both the peptide in which X<sub>42</sub> is Gly and the peptide in which X<sub>42</sub> is Ala. These antibodies are preferably generated in primates. These antibodies in the composition bind to Epitope II sequences recognized by the primate immune system, which epitope is present on multiple variants of HIV-1 Tat proteins. These antibodies include a variety of antibody constructs, as described in  
15 detail below.

In still another aspect, the invention provides an antibody, preferably a monoclonal antibody, that recognizes Epitope II peptide sequence -Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [SEQ ID NO: 10], where X<sub>42</sub> is Gly or Ala, as a distinct epitope from the epitope of -Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [SEQ ID NO: 11],  
20 recognized by previously described antibodies.

In yet a further aspect, the invention provides a recombinant or synthetic gene which encodes sequentially a peptide or polypeptide that contains at least two variants of a peptide or polypeptide of the Epitope I formula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID NO: 8], as defined above. In this synthetic gene,  
25 at least one of the two variants must have the formula wherein Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys, and at least a second of the two variants must have the formula in which Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn. Optionally, this synthetic gene comprises a carboxy terminal Epitope II peptide, as recognized by the primate immune system. Alternatively, the recombinant or synthetic gene contains the seven or eight preferred primate-  
30 recognized Epitope I amino acid sequences identified below. The synthetic gene may

WO 01/82944

PCT/US01/13031

contain each amino acid sequence separated by a spacer sequence, or may express each peptide/polypeptide in an open reading frame with a carrier protein. The synthetic gene may be separated from the carrier protein by a spacer if the spacer is fused to a primate-recognized Epitope I sequence, leaving an Epitope II sequence at the carboxy terminus of the recombinant protein. Further embodiments include multiple Epitope I peptides of the above formula fused together and to the carrier protein.

In yet a further aspect, the invention provides a synthetic molecule, e.g., a vector, comprising the above-described synthetic gene, operatively linked to regulatory nucleic acid sequences which direct and control expression of the product of the synthetic gene in a host cell.

In another aspect, the invention provides a recombinant microorganism, e.g., a virus or commensal bacterium, which contains the above described synthetic gene or synthetic molecule. This microorganism is capable of expressing multiple copies of the product of the gene or molecule in a host.

Still another aspect of the invention is a pharmaceutical composition useful for inducing antibodies that react with a large number of known HIV-1 Tat proteins, e.g., greater than 95%, and preferably greater than 99%, of the known Tat proteins. These induced antibodies can impair the multiplication of HIV-1. The pharmaceutical composition comprises at least one of the recombinant or synthetic peptide/polypeptide compositions described above; or the synthetic gene/molecule described above; or the recombinant microorganism described above, in a pharmaceutically acceptable carrier.

Still a further aspect of the invention is a pharmaceutical composition useful for impairing the multiplication of HIV-1, this composition containing an above described antibody composition or monoclonal antibody composition.

In yet a further aspect of the invention, a method for reducing the viral levels of HIV-1 involves exposing a human or other primate to antibody-inducing pharmaceutical compositions described above, actively inducing antibodies that react with most HIV-1 Tat proteins, and impairing the multiplication of the virus *in vivo*.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

This method is appropriate for an HIV-1 infected subject with a competent immune system, or an uninfected or chronically infected, but asymptomatic, subject. The method induces antibodies which react with HIV-1 Tat proteins, and which reduce viral multiplication during any initial acute infection with HIV-1 and which further minimize chronic viremia which leads to AIDS.

5 In still another aspect, the invention provides a method for reducing the viral levels of HIV-1 by administering to a human, who is incapable of mounting an effective or rapid immune response to infection with HIV-1, a pharmaceutical composition containing the antibody compositions described above. The method can involve chronically administering the composition.

10 Yet other aspects of the invention include methods for producing the compositions described above, as well as host cells transfected with such compositions.

15 Still another aspect of this invention is a kit useful for the measurement and detection of titers and specificities of antibodies induced by immunization with the compositions described above. The kit of the invention includes preferably the two required Epitope I peptides described above, as well as addition peptides of the Epitope I, recognized by primates, and possibly additional peptides of Epitopes II through IV, and coated solid supports, a labeled reagent for detecting the binding of antibodies to these peptides, and miscellaneous substrates and apparatus for evoking or detecting the signals provided by the labels, as well as conventional apparatus for taking blood samples, appropriate vials and other diagnostic assay components.

20 In yet a further aspect, the invention provides a method for detecting the titers and reactivity patterns of antibodies in subjects immunized with the compositions of this invention. The method includes the steps of incubating dilutions of the subject's biological fluid, e.g. serum, with plates or beads on which are bound one or more peptides of the Epitope I sequences of this invention and optionally, the Epitopes II through IV, washing away unbound biological materials, and measuring any antibody binding to the peptides with labeled reagent, e.g., an anti-human immunoglobulin to which is associated an enzyme. Depending on the type of label

30

WO 01/82944

PCT/US01/13031

employed, the signal produced by the label may be evoked by further adding a substrate which reacts with the enzyme, e.g., producing a color change. Other conventional labels may also be incorporated into this assay design.

Other aspects and advantages of the present invention are described further in the following detailed description of the preferred embodiments thereof.

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1A is a graph of ELISA titers of rabbit antiserum to larger linear Epitope I peptides on truncated detector peptides, expressed as a percentage of maximal binding to larger peptides. The N - or C - terminal amino acids of the corresponding detector peptides are shown below each column in single letter code.

Fig. 1B is a graph of ELISA titers of primate antiserum to larger linear Epitope I peptides on truncated detector peptides, expressed as a percentage of maximal binding to larger peptides. The N - or C - terminal amino acids of the corresponding detector peptides are shown below each column in single letter code.

Fig. 2A is a graph of ELISA titers of rabbit antiserum to linear Epitope II peptides on truncated detector peptides, expressed as a percentage of maximal binding to larger peptides. The N - or C - terminal amino acids of the corresponding detector peptides are shown below each column in single letter code.

Fig. 2B is a graph of ELISA titers of primate antiserum to larger linear Epitope II peptides on truncated detector peptides, expressed as a percentage of maximal binding to larger peptides. The N - or C - terminal amino acids of the corresponding detector peptides are shown below each column in single letter code.

Fig. 3A illustrates the design of a pentavalent Epitope I/Epitope II HIV-1 Tat immunogenic construct in three letter amino acid code [SEQ ID NO: 12].

Fig. 3B illustrates the design of an octavalent universal Epitope I in three letter amino acid code [SEQ ID NO: 13].

Fig. 3C illustrates the design of a univalent universal Epitope II immunogenic construct in three letter amino acid code [SEQ ID NO: 14].

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Detailed Description of the Invention

The present invention provides a solution to the above-stated problem by providing additional compositions which induce antibodies in uninfected or early stage HIV-1 infected subjects still capable of mounting an immune response to an immunogen, the antibodies reacting with a large number (i.e., greater than 95%, and preferably, greater than 99%) of known HIV-1 Tat protein variants. The term "Tat sequence (or protein) variant" means a polypeptide or peptide containing Tat protein amino acid residues, or a sequence from another HIV-1 strain Tat protein that is substantially similar to the consensus sequence of Table I [SEQ ID NO:15]. Each variant may differ from the consensus sequence and/or from another variant by at least one amino acid change within the residues of interest for Epitopes I through IV. This change may provide the same or different antigenic specificity to that particular Tat Epitope when added to the composition of the invention.

The antibodies induced by compositions of this invention can inhibit multiplication of HIV-1, which prevents further disease progression to AIDS. Antibody compositions are also provided for use in infected or non-infected humans, who are incapable of mounting an effective or rapid immune response to HIV-1 infection. These compositions are capable of reacting with large numbers of Tat proteins, thus reducing viral levels of HIV-1. These antibodies are useful in both therapeutic and prophylactic contexts to control the development of AIDS in a large population exposed to, or infected by, HIV-1 strains which produce upon infection immunologically distinct Tat proteins.

The compositions of the present invention include peptides or proteins, based on peptides provided by an epitope of HIV-1 Tat protein to which primates developed antibodies, or nucleic acid sequences which encode the peptides and polypeptides that induce antibodies to Tat in primates. These induced antibodies, in turn, impair multiplication of HIV-1.

HIV-1 Tat protein is produced from two exons: Exon 1 encodes a 72 amino acid (AA) protein which may be expressed without splicing or which may be spliced with the approximately 15-32 amino acids encoded by Exon 2. The HIV-1 Tat

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Exon I sequence appears in Table I, and is a consensus sequence based on Tat protein sequences of 31 known HIV-1 strains found in the common B subtype [NIH Los Alamos database]. The amino acid positions in which variations appear are in lower case letters. In Table I [SEQ ID NO: 15], the amino acid residue at position 73 is the first Pro of Exon 2 of HIV-1 Tat. Since the 72 amino acid product of Exon 1 is capable alone of cellular uptake and activation, it is essential that antibodies react with and interdict intercellular transport of the 72 amino acid peptide. HIV-1 Tat contains a cysteine-rich region between AA positions 22 and 37 of Exon 1 [SEQ ID NO: 15], with a single covalent bond between Cys<sub>21</sub> and Cys<sub>37</sub>, producing a complex tertiary structure. The scientific literature has indicated that this region does not appear to be immunogenic. Predominant antibodies to Tat are to the linear N-terminal Pro-rich region (AA1-21) and to the linear basic region (AA44-65), with an additional antibody reported to AA62-73.

The inventor has previously identified epitopes, i.e., binding regions, recognized by rabbit antibodies (antigenic sequences) in the N-terminal linear sequence 1-21 (22 AA) of Exon 1 [SEQ ID NO:15] of Tat variants, and had defined four B cell epitopes in HIV-1 Tat. As previously described in International Patent Publication WO99/02185, immunogenic regions of this larger sequence were recognized by the rabbit immune system. These regions are identified in the consensus sequence of Exon 1 in Table I below: Epitope I was identified by rabbit antibodies as the nine amino acid sequence of AA positions 2-10 of Exon 1. Epitope II was identified as the eight amino acid sequence of AA positions 43-50 of Exon 1. Epitope III was identified as the 7 amino acid sequence of AA positions 56-62 of Exon 1. Epitope IV was identified as the twelve amino acid sequence of AA positions 62-73 of Tat, including the first Pro (AA 73) of Exon 2, and overlaps Ser 62 of Epitope III.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Table I - Consensus Tat Sequence

	I	10	20
	Met glu Pro <u>Val asp pro arg</u> <u>Leu Glu Pro Trp lys</u> His Pro Gly Ser Gln Pro lys thr		
5	ala cys thr asn Cys Tyr Cys Lys lys Cys Cys phe his Cys gln val Cys Phe ile thr	30	40
	<u>Lys gly Leu gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg arg arg ala pro gln</u>	50	60
	asp Ser gln thr his Gln val ser Leu ser Lys gln [SEQ ID NO: 15].	70	

- 10 In the present invention, however, the inventor has detected a surprising shift in the amino acid sequences of particularly Epitope I recognized by B cells in primates. In Table I, Epitope I and II sequences recognized by primates are underlined. Primate-recognized Epitope I spans Tat amino acid residues 5 to 12. The sequence of Epitope II recognized by B cells in primates spans amino acids 41-50.
- 15 Epitopes III and IV are the same epitopes recognized in rabbits, as reported in WO99/02185, incorporated herein by reference.

*A. Primate Recognized-Epitope I Immunogenic Compositions*

- In one embodiment, the present invention provides a composition containing at least two variants of a peptide or polypeptide recognized by the primate immune system, and eliciting a specific humoral immune response (for the purpose of this invention) in a primate exposed to the sequences *in vivo*. These primate-recognized Epitope I amino acid sequences correspond to amino acid residues 5-12 of the Tat consensus sequence [SEQ ID NO:15] of Table I, derived from a number of "Tat sequence variants". Primate-recognized Epitope I defines peptides of the general formula: R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 [SEQ ID NO: 8], wherein Y<sub>7</sub> is Arg, Lys, Ser or Asn; X<sub>9</sub> is Glu or Asp; and Z<sub>12</sub> is Lys or Asn. This formula permits a variety of variant mammalian Epitope I peptides. The composition of this invention must contain at least one peptide variant wherein Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys, and at least a second peptide variant in which Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

The specified amino acids appearing in the formula of primate-recognized Epitope I above is a minimum reactive primate Epitope I sequence. Each immunogen defined by that formula which is employed in methods of this invention to raise antibodies to the minimum Epitope I sequence may be a larger amino acid sequence. For example, the minimum Epitope I amino acids are flanked by other amino acids, so that the entire Epitope I immunogenic sequence is between 8 and about 25 amino acids in length. The identity of the flanking amino acids is not essential to the biological function of the Epitope I immunogen. In particular, additional amino acids on the N-terminus of primate-recognized Epitope I sequences do not affect immunogenicity. Thus, for each primate-recognized Epitope I peptide, the N-terminal R1 may be a free hydrogen on the unmodified N terminal amino acid, or a lower alkyl (i.e., C1-C10 alkyl), or a lower C1-C10 alkanoyl, such as an acetyl group. R1 may also include a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl. Preferably, R1 represents 2 amino acids. In one embodiment, R1 is Val, resulting in the sequence Val-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub> [SEQ ID NO: 37], wherein Y<sub>7</sub>, X<sub>9</sub> and Z<sub>12</sub> are defined as above. In another embodiment, R1 is -X<sub>2</sub>-Pro-Val-, resulting in the sequence X<sub>2</sub>-Pro-Val-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub> [SEQ ID NO: 38], wherein X<sub>2</sub> is Glu or Asp and wherein Y<sub>7</sub>, X<sub>9</sub> and Z<sub>12</sub> are defined as above. Preferably, R1 represents 3 amino acids.

Additional amino acids on the C-terminus of the primate-recognized Epitope I minimum sequence can enhance antibody titer. While the C-terminal R2 can be a simple free hydroxyl group on the C terminal amino acid, it can also be a C terminal amide. However, to enhance titer, R2 is preferably a sequence of between 1 to about 14, preferably about 4 additional amino acids amidated at the carboxyl terminus. In a preferred embodiment, R2 is -His-Pro-Gly-Ser-amide, resulting in the sequence Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-His-Pro-Gly-Ser [SEQ ID NO: 16], wherein Y<sub>7</sub>, X<sub>9</sub> and Z<sub>12</sub> are defined as above.

Preferably a composition of this invention includes in addition to the two required peptides identified above, at least five or six different amino acid

WO 01/82944

PCT/US01/13031

sequences of the primate-recognized Epitope I formula. Most preferably, the composition comprises seven or eight variant amino acid sequences, identified immediately below. The composition may also contain other peptide or polypeptide sequences, each containing a different X<sub>n</sub>, Y, and Z<sub>12</sub> combination. As demonstrated in the examples below, with three sites of antigenic variability in the primate-recognized Epitope I, a preferred composition of this invention may contain sufficient peptides of primate-recognized Epitope I to comprise 95% of all known B clade and non-B clade HIV-I Tat variants by including the two "required" peptides:

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO:17]; and  
10 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO:18], as well as one to five of the following additional Epitope I peptides:

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO:19];  
R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO:20];  
R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO:21];  
15 R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO:22]; and  
R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO:23]; as well as still optionally, the rare variant R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 24].

The primate-recognized Epitope I composition of the invention may contain a number of additional peptides or polypeptides that contain other sequences which correspond to amino acid residues between AA 5 to AA 12 of SEQ ID NO:15, but are derived from other Tat variants which do not cross-react well with antibodies to the primate-recognized Epitope I compositions. The Epitope I compositions of this invention may contain multiple copies of five or more different Epitope I peptides, in any order. In one embodiment, at least one copy of seven or all eight of the amino acid sequences described above [SEQ ID NOs: 17-24] are present.

These peptides or polypeptides of the invention are produced synthetically or recombinantly. Optional amino acids (e.g., -Gly-Ser-) or other amino acid or chemical compound spacers may be included at the termini of the peptides for the purpose of linking the peptides together or to a carrier. This composition may

WO 01/82944

PCT/US01/13031

take the form of one or more of the above-described peptides expressed as a synthetic peptide coupled to a carrier protein. Alternatively, a composition may contain multiple Epitope I peptides, each expressed as a multiple antigenic peptide, optionally coupled to carrier protein. Alternatively, the selected peptides may be linked sequentially and expressed within a recombinantly produced protein. As one embodiment, the eight specifically identified sequences above are linked sequentially, with and without spacer amino acids therebetween, to form a larger recombinant protein. Alternatively, the recombinant protein may be fused in frame with a carrier protein. These primate Epitope I compositions are designed to induce antibodies reactive with greater than 95% of the known variants of the HIV-1 Tat protein including Tat proteins of the HIV-1 B and non-B clades.

Primate-recognized Epitope I compositions demonstrate a biological activity of inducing in an immunized, immune competent primate, i.e., a non-infected human, or an asymptomatic infected human, an active humoral immune response (i.e., antibodies) that is directed against greater than 95%, and preferably greater than 99%, of the known variants of Tat proteins of HIV-1. The end result of such treatment is an impairment of the multiplication of HIV-1 following an acute infection. This impairment prevents high post-seroconversion plasma levels of HIV-1 associated with progression to AIDS. Active induction of antibodies in the asymptomatic phase of HIV infection may reduce viral multiplication, lower the plasma viral load and reduce the likelihood of progression to AIDS. The composition which contains at least the two required primate-recognized Epitope I immunogens, and preferably seven or eight of those Epitope I sequences [e.g., SEQ ID NO:17-24], can elicit an immune response to about 95% of 294 known Tat sequences of the common B subtypes of HIV-1 and with Tat proteins of all 56 non-B HIV-1 subtypes that have been sequenced [courtesy of Dr. Esther Guzman, Los Alamos NIAID HIV database; GenBank database].

*B. Immunogenic Compositions Containing Additional Epitopes*

In another embodiment, the present invention provides other compositions which employ two or more primate-recognized Epitope I sequences

WO 01/82944

PCT/US01/13031

combined with at least one Epitope II sequence and, optionally with one or more Epitope III or IV peptides. These HIV-1 Tat Epitopes II, III and IV, as recognized by the rabbit immune system, are described in detail in International Patent Application No. WO99/02185, incorporated herein by reference.

5 Briefly described, the Epitope II sequence elicits a specific humoral immune response in a primate exposed to the Epitope II sequence *in vivo*. Epitope II, as recognized by primates, defines peptides of the formula R3-Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R4 [SEQ ID NO: 5], wherein X<sub>42</sub> is Gly or Ala. The minimum epitope recognized by the primate immune system is that of the  
10 specifically-identified amino acids of that formula, i.e., -Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- (amino acids 41-50 of SEQ ID NO: 15). This is also the sequence of the presently preferred immunogen for Epitope II. This immunogen in which X<sub>42</sub> is Gly induces antibodies cross-reactive with the sequence in which X<sub>42</sub> is Ala. This would react/cross-react with greater than 95% of known HIV-1 Tat proteins. This  
15 Epitope II sequence has no antigenic variability in a large number of known HIV-1 Tat variants. The N terminal R3 may represent the hydrogen on the unmodified N terminal amino acid Lys, or R3 may be a lower alkyl, or a lower alkanoyl, such as an acetyl group, substituent on the Lys. R3 may also include a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl. The  
20 C terminal R4 may represent the free hydroxyl of the C terminal amino acid, or R4 may be an amide on that C terminal amino acid. R4 may include additional non-polar amino acids, such as a spacer. An exemplary spacer, gly-ser-gly-ser can be used, resulting in the sequence Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Gly-Ser-Gly-Ser [SEQ ID NO:25], wherein X<sub>42</sub> is Gly or Ala. However, R4 cannot be the basic amino  
25 acids -Lys-Arg-Arg- which naturally occur in the Tat sequence after the last amino acid in the Epitope II formula. This Epitope II sequence found in 294 B clade Tat variants is recognized by primates (As reported in WO99/02185, the rabbit immune system recognizes the epitope from AA43-50 of SEQ ID NO: 15).

30 Epitope II is poorly immunogenic when presented within other sequences. Thus, for optimal immunogenicity, this sequence is prepared as a synthetic

WO 01/82944

PCT/US01/13031

peptide fused to, or coupled to, a carrier protein or as a multiple antigenic peptide, optionally coupled to carrier protein. Alternatively, Epitope II may be expressed as the C terminal sequence of a recombinant protein, which is optionally fused in frame to a carrier protein at its amino terminal sequence. In a composition of this invention, an Epitope II peptide is preferably presented alone or in combination with one or more primate-recognized Epitope I peptides.

Briefly described and as identified in WO99/02185, Epitope III defines peptides of the formula: R5-Arg-Arg-X<sub>38</sub>-Z<sub>59</sub>-A<sub>60</sub>-Y<sub>61</sub>-Ser-R6 [SEQ ID NO: 6], wherein X<sub>38</sub> may be Ala, Pro, Ser or Gln; Y<sub>61</sub> may be Asp, Asn, Gly or Ser; Z<sub>59</sub> may be Pro or His; and A<sub>60</sub> may be Gln or Pro. Epitope IV defines peptides of the formula: R7-Ser-Gln-X<sub>64</sub>-His-Gln-Y<sub>67</sub>-Ser-Leu-Ser-Lys-Gln-Pro-R8 [SEQ ID NO: 7], wherein X<sub>64</sub> may be Asn or Thr; and Y<sub>67</sub> may be Ala or Val.

Thus, the compositions of this invention, i.e., the peptide/polypeptides containing the above-identified amino acid sequences, when provided to a human subject, are useful in the immunologic interdiction of extracellular Tat proteins of most HIV-1 strains. These compositions function to critically reduce chronic multiplication of the virus and permit effective immune control of the virus.

The immunogens for each Epitope are preferably designed to induce antibodies reactive with the highest proportion of naturally occurring variants of each epitope. For an epitope such as primate-recognized Epitope I, multiple copies of an immunogen could be incorporated in a synthetic or recombinant immunogen to enhance the immunogenicity and produce higher titer antibodies. Furthermore, immunogens for two or more epitopes could be combined to extend coverage, since variations in sequence of each epitope occur independently. Thus, as one example, a composition of this invention contains the two required primate-recognized Epitope I peptides, as well as four or five of the other Epitope I peptides specifically identified above with a Cys on the terminus, which is coupled to carrier protein. Alternatively, multiple antigenic peptides may be prepared, optionally coupled to carrier protein, and combined to form a composition of this invention. Alternatively, mixtures of two or more immunogens could be used.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

The primate-recognized Epitope I immunogens of this invention, with or without any Epitope II, III or IV or other optional immunogens, may be prepared and used in immunogenic compositions in a variety of forms, for example, chemically synthesized or as recombinant peptides, polypeptides, proteins, fusion proteins or fused peptides.

1. Recombinant or Synthetic Peptide/Proteins Coupled to a Carrier

As one embodiment, a composition of the present invention may be a synthetic or recombinantly-produced peptide, containing at least the two required primate-recognized Epitope I immunogenic amino acid sequences (as well as additional other Epitope I sequences) and also containing one or more Epitope II/III/IV immunogenic amino acid sequences, coupled to a selected carrier protein. In this embodiment of a composition of this invention, multiple above-described primate-recognized Epitope I amino acid sequences with or without flanking sequences, may be combined sequentially in a polypeptide and coupled to the same carrier.

Alternatively, the Epitope I, II, III, or IV immunogens, may be coupled individually as peptides to the same or a different carrier proteins, and the resulting immunogen-carrier constructs mixed together to form a single composition. Such sequences may be made synthetically by conventional methods of chemical synthesis or recombinantly by expression in a selected host cell, also by now-conventional means.

For this embodiment, the carrier protein is desirably a protein or other molecule which can enhance the immunogenicity of the selected immunogen. Such a carrier may be a larger molecule which has an adjuvanting effect. Exemplary conventional protein carriers include, without limitation, *E. coli* DnaK protein, galactokinase (galK, which catalyzes the first step of galactose metabolism in bacteria), ubiquitin,  $\alpha$ -mating factor,  $\beta$ -galactosidase, and influenza NS-1 protein. Toxoids (i.e., the sequence which encodes the naturally occurring toxin, with sufficient modifications to eliminate its toxic activity) such as diphtheria toxoid and tetanus toxoid may also be employed as carriers. Similarly a variety of bacterial heat shock proteins, e.g., mycobacterial hsp-70 may be used. Glutathione reductase (GST)

WO 01/82944

PCT/US01/13031

is another useful carrier. One of skill in the art can readily select an appropriate carrier.

In a particularly desirable immunogen-carrier protein construct, the two required Epitope I immunogens and three to six additional primate-recognized Epitope I immunogens and optional immunogenic peptides/polypeptides may be covalently linked to a mycobacterial *E. coli* heat shock protein 70 (hsp70) [K. Suzue *et al.*, *J. Immunol.*, **156**:873 (1996)]. In another desirable embodiment, the composition is formed by covalently linking the immunogen-containing peptide or polypeptide sequences to diphtheria toxoid.

10                   2.     **Multiple Antigenic Peptide**

In yet another embodiment, the peptides or polypeptide epitope immunogens and any selected optional immunogens may be in the form of a multiple antigenic peptide ("MAP", also referred to as an octameric lysine core peptide) construct. Such a construct may be designed employing the MAP system described by Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:5409-5413 (1988). This system makes use of a core matrix of lysine residues onto which multiple copies of the same primate-recognized Epitope I of the invention are synthesized as described [D. Posnett *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **263**(4):1719-1725 (1988); J. Tam, "Chemically Defined Synthetic Immunogens and Vaccines by the Multiple Antigen Peptide Approach", *Vaccine Research and Developments*, Vol. 1, ed. W. Koff and H. Six, pp. 51-87 (Marcel Deblau, Inc., New York 1992)]. Each MAP contains multiple copies of only one peptide. Therefore, a composition containing MAPs will contain at least two, and preferably about seven, MAPs. One MAP will have the first required peptide or polypeptide Epitope I immunogen attached to each lysine core; a second MAP will have the second required peptide or polypeptide Epitope I immunogen attached to each lysine core. Still other MAPs, each with a different primate-recognized Epitope I amino acid sequence identified above, may be included. Multiple different MAPs may be employed to obtain any desired combination of Epitope I, II, III or IV sequences. Preferably these MAP constructs are associated with other T cell stimulatory

WO 01/82944

PCT/US01/13031

sequences, or as pharmaceutical compositions, administered in conjunction with T cell stimulatory agents, such as known adjuvants.

### 3. Spacers

In either of the above compositions, e.g., as peptide/polypeptide-carrier constructs or MAPs, each peptide/polypeptide immunogen, or each amino acid sequence in the immunogen, may be optionally separated by an optional amino acid sequence called a "spacer". Spacers are sequences of between 1 to about 4 amino acids which are interposed between two sequences to permit linkage therebetween without adversely affecting the three dimensional structure of the immunogen. Spacers may also contain restriction endonuclease cleavage sites to enable separation of the sequences, where desired. Suitable spacers or linkers are known and may be readily designed and selected by one of skill in the art. Preferred spacers are sequences containing Gly and/or Ser amino acids.

### F. Nucleic Acid Compositions of the Invention, including a Synthetic or Recombinantly-Produced Gene

Other embodiments of this invention include nucleic acid sequences that encode the above-described primate-recognized Epitope I peptide/polypeptide compositions, including the peptide and polypeptide immunogens of the compositions described above, and including those peptides and polypeptides fused to carrier proteins. The nucleic acid sequences may also include sequences encoding the carrier proteins.

Thus, one preferred embodiment of the invention is a "synthetic gene" that encodes sequentially for at least the two required primate-recognized Epitope I immunogenic peptides/polypeptides. Note that while the gene is referred to as "synthetic", it may be designed by chemical synthesis or recombinant means, as desired. The synthetic gene preferably encodes seven or all eight of the specifically identified primate-recognized Epitope I amino acid sequences [SEQ ID NOS: 17-24]. The synthetic gene can also encode any selection of an Epitope II or III immunogen, provided that the Epitope II or III peptide is fused to the C terminus of the primate-

WO 01/82944

PCT/US01/13031

recognized Epitope I sequence and not further modified on its own C terminus. The synthetic gene may encode multiple copies of the two required Epitope I amino acid sequences, or copies of additional multiple different immunogens or amino acid sequences, or multiple copies of multiple different immunogens or amino acid sequences. The synthetic gene may encode the selected amino acid sequences in an open reading frame with, or fused to, a nucleic acid sequence encoding a carrier protein. A further characteristic of the synthetic gene may be that it encodes a spacer between each sequence encoding an immunogen and/or between the sequence encoding an immunogen and the sequence encoding the carrier protein.

The synthetic gene of the present invention may also be part of a synthetic or recombinant molecule. The synthetic molecule may be a nucleic acid construct, such as a vector or plasmid which contains the synthetic gene encoding the protein, peptide, polypeptide, fusion protein or fusion peptide under the operative control of nucleic acid sequences encoding regulatory elements such as promoters, termination signals, and the like. Such synthetic molecules may be used to produce the polypeptide/peptide immunogen compositions recombinantly. The synthetic gene or synthetic molecule can be prepared by the use of chemical synthetic methods or preferably, by recombinant techniques. For example, the synthetic gene or molecule may contain certain preference codons for the species of the indicated host cell.

The synthetic gene or molecule, preferably in the form of DNA, may be used in a variety of ways. For example, these synthetic nucleic acid sequences may be employed to express the peptide/polypeptides of the invention *in vitro* in a host cell culture. The expressed immunogens, after suitable purification, may then be incorporated into a pharmaceutical reagent or vaccine. Alternatively, the synthetic gene or synthetic molecule of this invention may be administered directly into a mammal, preferably a human, as so-called 'naked DNA' to express the protein/peptide immunogen *in vivo* in a patient. See, e.g., J. Cohen, *Science*, 252:1691-1692 (March 19, 1993); E. Fynan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:11478-11482 (Dec. 1993); and J. A. Wolff *et al.*, *Biotechniques*, 11:474-485 (1991), all incorporated by reference herein. The synthetic molecule, e.g., a vector or plasmid, may be used for

WO 01/82944

PCT/US01/13031

direct injection into the mammalian host. This results in expression of the protein by host cells and subsequent presentation to the immune system to induce antibody formation *in vivo*.

G. *Microorganisms That Express The Synthetic Gene*

5 In still another aspect of the present invention, the synthetic genes or molecules of this invention may be incorporated into a non-pathogenic microorganism. The resulting microorganism, when administered to a mammalian host, expresses and multiplies the expressed compositions of this invention *in vivo* to  
10 induce specific antibody formation. For example, non-pathogenic recombinant viruses or commensal bacterium which carry the compositions or synthetic genes of this invention and are useful for administration to a mammalian patient may be prepared by use of conventional methodology and selected from among known non-pathogenic microorganisms.

15 Among commensal bacterium which may be useful for exogenous delivery of the synthetic molecule to the patient, and/or for carrying the synthetic gene into the patient *in vivo*, include, without limitation, various strains of *Streptococcus*, e.g., *S. gordonii*, or *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, and *Saccharomyces*.

20 Suitable non-pathogenic viruses which may be engineered to carry the synthetic gene into the cells of the host include poxviruses, such as vaccinia, adenovirus, adeno-associated viruses, canarypox viruses, retroviruses and the like. A number of such non-pathogenic viruses are commonly used for human gene therapy, and as carriers for other vaccine agents, and are known and selectable by one of skill in the art.

25 H. *Preparation or Manufacture of Compositions of the Invention*

The compositions of the invention, and the individual polypeptides/peptides containing the primate-recognized Epitope I immunogens of this invention and optionally one or more Epitope II, III or IV, the synthetic genes, and synthetic molecules of the invention, may be prepared conventionally by resort to  
30 known chemical synthesis techniques, such as described by Merrifield, J. Amer. Chem.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

5 Seq., 85:2149-2154 (1963). Alternatively, the compositions of this invention may be prepared by known recombinant DNA techniques by cloning and expressing within a host microorganism or cell a DNA fragment carrying a sequence encoding a peptide/polypeptide containing at least the two required primate-recognized Epitope I sequences with optional other immunogens and optional carrier proteins. Coding sequences for the Epitope I and optional immunogens can be prepared synthetically [W. P. C. Stemmer *et al.*, Gene, 164:49 (1995)] or can be derived from viral RNA by known techniques, or from available cDNA-containing plasmids.

10 Combinations of these techniques may be used. For example, assembly of sequential immunogens by conventional molecular biology techniques may be used for production of the synthetic gene, and site-directed mutagenesis used to provide desired sequences of immunogens. The product of the synthetic gene is then produced recombinantly. All of these manipulations may be performed by conventional methodology.

15 Systems for cloning and expressing the peptide/polypeptide compositions of this invention using the synthetic genes or molecules include the use of various microorganisms and cells which are well known in recombinant technology. These include, for example, various strains of *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, and *Saccharomyces*, as well as mammalian, yeast and insect cells. Suitable vectors  
20 therefor are known and available from private and public laboratories and depositories and from commercial vendors. Currently, the most preferred hosts are mammalian cells, such as Chinese Hamster ovary cells (CHO) or COS-1 cells. These hosts may be used in connection with poxvirus vectors, such as vaccinia or swinepox. The selection of other suitable host cells and methods for transformation, culture,  
25 amplification, screening and product production and purification can be performed by one of skill in the art by reference to known techniques. See, e.g., Gething and Sambrook, Nature, 293:620-625 (1981), among others. Another preferred system includes the baculovirus expression system and vectors.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

When produced by conventional recombinant means, the compositions of this invention, i.e., the polypeptide/peptides containing the indicated copies of the primate-recognized Epitope I immunogens and optional immunogens may be isolated either from the cellular contents by conventional lysis techniques or from cell medium by conventional methods, such as chromatography. See, e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Edit., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989). Suitable plasmid and viral vectors used either for production of the peptide/polypeptide components as DNA vaccines are well known to those of skill in the art and are not a limitation of the present invention. See, Sambrook *et al.*, cited above and the references above to production of the protein. See, also International Patent Application PCT WO94/01139, published January 20, 1994. Briefly, the DNA encoding the selected peptide/polypeptide is inserted into a vector or plasmid which contains other optional flanking sequences, a promoter, an mRNA leader sequence, an initiation site and other regulatory sequences capable of directing the multiplication and expression of that sequence *in vivo* or *in vitro*. These vectors permit infection of the patient's cells and expression of the synthetic gene sequence *in vivo* or expression of it as a protein/peptide or fusion protein/peptide *in vitro*.

The resulting composition may be formulated into a primate-recognized Epitope I composition with any number of optional immunogens and screened for efficacy by *in vivo* assays. Such assays employ immunization of an animal, e.g., a simian, with the composition, and evaluation of titers of antibody to the Tat proteins of HIV-1 or to synthetic detector peptides corresponding to variant Tat sequences (as shown in the examples below).

#### I. *Antibody Compositions of the Invention*

An antibody composition or ligand-binding composition of this invention encompasses at least one antibody which specifically binds to an Epitope I of the formula -Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>- [SEQ ID NO: 9], wherein Y<sub>7</sub> is selected from the group consisting of Arg, Lys, Ser and Asn; wherein X<sub>9</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp; and wherein Z<sub>12</sub> is selected from the group

WO 01/82944

PCT/US01/13031

consisting of Lys and Asn. Preferably, such an antibody composition includes at least two or more different antibodies or ligands which specifically bind to at least the two required Epitope I sequences, as defined herein. Antibodies (or other binding ligands) are generated to the two required sequences R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-  
5 R2 [SEQ ID NO: 17]; and R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 18] of Epitope I. The antibodies of the composition thus bind an HIV Tat protein present on multiple variants of HIV-1 Tat proteins. Additional antibodies or ligands are generated to other sequences falling within the Epitope I formula above.

In one embodiment, an isolated antibody directed which binds  
10 the Epitope I peptide or polypeptide of the invention, as described above, is also an aspect of this invention. Such polyclonal antibody compositions are typically produced by immunizing a mammal, preferably a primate, with a peptide/polypeptide composition containing the two required Epitope I immunogens, as well as an assortment of other primate-recognized Epitope I immunogens and optional  
15 immunogens, as described above. Particularly desirable as immunogens are a heptavalent primate-recognized Epitope I immunogen (i.e., without the rare variant) or an octavalent immunogen, such as the synthetic gene or fusion protein described in Example 3 below, and/or a univalent Epitope II immunogen (i.e., a single Epitope II peptide, optionally bound to a carrier). In addition to being generated in primates,  
20 such antibodies may also be produced in transgenic animals, including so-called "humanized" transgenic mice. However, a desirable host for raising polyclonal antibodies to a composition of this invention includes humans. The titer of such polyclonal antibodies raised in the mammal exposed to the Epitope I compositions can be monitored by standard techniques, such as with an enzyme-linked immunosorbent  
25 assay. If desired, the antibody molecules can be isolated from the mammal, e.g., from the whole blood, plasma or serum, and further purified from the plasma or serum of the immunized mammal by conventional techniques. Conventional harvesting techniques can include plasmapheresis, protein A chromatography, among others. Such polyclonal antibody compositions may themselves be employed as  
30 pharmaceutical compositions of this invention.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Alternatively, antibody producing cells may be obtained from the mammals and used to prepare other forms of antibodies and ligands, e.g., monoclonal antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, human antibodies, ligands produced by screening phage displays, antibody fragments and mixtures thereof, and synthetic antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies and fully human antibodies. Preparative techniques for generation of these types of ligands are known and the ligands themselves may be generated using the disclosed amino acid sequences of the primate-recognized Epitope I and optional immunogens. See, e.g., Kohler and Milstein (1975) *Nature*, 256:495-497; Kozbor *et al.*, (1983) *Immunol. Today*, 4:72; Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96; Harlow *et al.*, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10032 (1989); Hodgson *et al.*, *Bio/Technology*, 2:421 (1991); International PCT Application PCT/GB91/01554, Publication No. WO92/04381 and International PCT Application PCT/GB93/00725, Publication No. WO93/20210].

For example, in another embodiment, a monoclonal antibody specifically binds to the minimum Epitope I sequence defined by -Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>- [SEQ ID NO: 9] of an HIV Tat protein comprising any larger immunogen defined by the Epitope I formula, with the variable amino acids and R groups as defined above. As one embodiment, a monoclonal antibody binds specifically to the amino acid sequence -Asp-Pro-Asn-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Asn- [SEQ ID NO:26], wherein X<sub>9</sub> is Glu or Asp. Still other monoclonal antibodies which bind specifically to the minimum Epitope I sequences defined by the formula above are part of this invention.

In another embodiment of this invention, a monoclonal antibody specifically binds to a minimum Epitope II sequence comprising the amino acid sequence -Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [SEQ ID NO: 10], where X<sub>42</sub> is Gly or Ala, as a distinct epitope from the epitope of -Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- [SEQ ID NO: 11], recognized by previously described antibodies.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Preferably, an antibody composition comprises one antibody which is cross-reactive with both the peptide in which  $X_{42}$  is Gly and the peptide in which  $X_{42}$  is Ala. These antibodies are preferably generated in primates. Still other monoclonal antibodies which bind specifically to the minimum Epitope II sequences defined by the formula above are part of this invention.

5 Other anti-Tat antibodies may be developed by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (e.g., antibody phage displays) with primate-recognized HIV-1 Tat epitopes of this invention to isolate immunoglobulin library members that bind to the HIV-1 Tat [W. D. Huse *et al.*,  
10 *Science*, **246**:1275-1281 (1988)]. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available, e.g., Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01; Strategene Phage Display kits, etc. See, e.g., US Patent No., 5,223,409, International Publication No. WO92/09690, WO90/02809, etc. Chimeric antibodies may similarly be developed using known techniques  
15 [Morrison *et al.*, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**:6851; Takeda *et al.*, *Nature*, **313**:452 (1984), among others]. Chimeric antibodies are molecules in which different portions are derived from different animal species. Single chain antibodies may also be prepared by conventional methods [see, e.g., US Patent Nos. 4,946,778 and 4,704,692] using the variable portions of the polyclonal or monoclonal antibodies  
20 produced according to this invention. Antibody fragments, such as the Fab, F(ab')<sub>2</sub>, and Fv fragments and libraries thereof may also be employed in various aspects of this invention.

These antibody/ligand compositions desirably bind to most known HIV-1 Tat protein variants (e.g., greater than 95%, and preferably greater than  
25 99% of known Tat protein variants), and prevent the Tat proteins from supporting further HIV-1 multiplication. Such compositions can include a mixture of multiple different antibodies which bind HIV-1 Tat protein epitope sequences from multiple strains of HIV-1. Thus, these antibodies are useful in pharmaceutical methods and formulations described below.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

*J. Pharmaceutical Compositions of the Invention*

As another aspect of this invention, a pharmaceutical composition useful for inducing antibodies that react with most (e.g., greater than 95%, preferably greater than 99%) known HIV-1 Tat proteins and impair the multiplication of HIV-1 can comprise as its active agents, at least the two required primate-recognized Epitope I peptides or polypeptides of this invention, and preferably additional Epitope I peptides. Several desirable compositions include the following above-described components:

- (a) a peptide/polypeptide immunogen which contains at least the two required, and more preferably at least seven, of the primate-recognized Epitope I amino acid sequences [SEQ ID NOS:17-24];
- (b) a peptide/polypeptide immunogen of (a) which further contains any of the Epitope II, III or IV amino acid sequences, preferably a univalent Epitope II immunogen;
- (c) a synthetic or recombinantly-produced gene encoding the two required primate-recognized Epitope I sequences and preferably seven of the Epitope I sequences [SEQ ID NO: 17-24], and optional sequences as described above;
- (f) a synthetic molecule containing the synthetic gene of (c);
- (g) a recombinant virus carrying the synthetic gene or molecule described above; and
- (h) a commensal bacterial carrying the synthetic gene or molecule described above.

The selected active component(s) is present in a pharmaceutically acceptable carrier, and the composition may contain additional ingredients. Pharmaceutical formulations containing the compositions of this invention may contain other active agents, such as T cell stimulatory agents for the MAPs, adjuvants and immunostimulatory cytokines, such as IL-12, and other well-known cytokines, for the protein/peptide compositions. All of these pharmaceutical compositions can operate to lower the viral levels of a mammal.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

As pharmaceutical compositions, the compositions comprising primate-recognized Epitope I peptide or nucleic acid sequences and the optional immunogen sequences are admixed with a pharmaceutically acceptable vehicle suitable for administration to mammals for prophylaxis or treatment of virus infections. The proteins/peptides may be combined in a single pharmaceutical preparation for administration. Suitable pharmaceutically acceptable carriers for use in an immunogenic proteinaceous composition of the invention are well known to those of skill in the art. Such carriers include, for example, saline, buffered saline, a selected adjuvant, such as aqueous suspensions of aluminum and magnesium hydroxides, liposomes, oil in water emulsions and others. Suitable adjuvants may also be employed in the protein-containing compositions of this invention. Suitable vehicles for direct DNA, plasmid nucleic acid, or recombinant vector administration include, without limitation, saline, or sucrose, protamine, polybrene, polylysine, polycations, proteins, CaPO<sub>4</sub>, or spermidine. See e.g., PCT application WO94/01139 and the references cited above. The peptide/polypeptide compositions and synthetic genes or molecules *in vivo* are capable of eliciting in an immunized host mammal, e.g., a human, an immune response capable of interdicting multiple (e.g., greater than about 95 to about 99 %) known extracellular Tat protein variants from HIV-1 and thereby lowering the viral levels.

Yet another pharmaceutical composition useful for impairing the multiplication of HIV-1 comprises an antibody composition containing one or more of the antibodies described in detail above. In a pharmaceutical composition, the antibodies may be carried in a saline solution or other suitable carrier. The antibody compositions are capable of providing an immediate, exogenously provided, interdiction of Tat.

The present invention is not limited by the selection of the conventional, physiologically acceptable, carriers, adjuvants, or other ingredients useful in pharmaceutical preparations of the types described above. The preparation of these pharmaceutically acceptable compositions, from the above-described

WO 01/82944

PCT/US01/13631

components, having appropriate pH isotonicity, stability and other conventional characteristics is within the skill of the art.

*K. Method of the Invention - Impairing Multiplication of HIV-1*

According to the present invention, a method for reducing the viral levels of HIV-1 involves exposing a human to the Tat antibody-inducing pharmaceutical compositions described above, actively inducing antibodies that react with multiple (e.g., greater than 95%, preferably greater than 99% of the known) HIV-1 Tat proteins, and impairing the multiplication of the virus *in vivo*. This method is appropriate for an HIV-1 infected subject with a competent immune system, or for active immunization of an uninfected subject. The method induces antibodies which react with HIV-1 Tat proteins, reduce viral multiplication during an initial acute infection with HIV-1 and minimize chronic viremia leading to AIDS. This method also lowers chronic viral multiplication in infected subjects, again minimizing progression to AIDS. Use of these methods can control chronic HIV-1 infection, providing a novel mechanism of treatment not subject to the development of resistance. The antibodies to Tat inhibit replication of HIV-1 quasispecies independently of the Tat that they are producing, since the extracellular Tat protein is not associated with the replicating moiety of the virus. Hence, there is no obvious mechanism by which Tat antibodies could generate selective pressure for non-reactive, escape Tat variants.

According to this method, the pharmaceutical compositions preferably contain the peptide/polypeptide compositions, the synthetic genes or molecules, the recombinant virus or the commensal recombinant bacterium. Preferably the compositions contain a heptavalent synthetic gene or fusion protein (without the rare variant of Epitope I) or the octavalent synthetic gene or fusion protein of Example 3 and optionally a univalent Epitope II peptide. Each of these active components of the pharmaceutical composition actively induces in the exposed human the formation of anti-Tat antibodies which block the transfer of Tat from infected cells to other infected or uninfected cells. This action reduces the multiplicity of infection and blocks the burst of HIV-1 viral expansion, and thus lowers viral

WO 01/82944

PCT/US01/13031

levels. In already infected patients, this method of reduction of viral levels can reduce chronic viremia and progression to AIDS. In uninfected humans, this administration of the compositions of the invention can reduce acute infection and thus minimize chronic viremia leading to progression to AIDS.

5                    Yet another aspect of the invention is a method for reducing the viral levels of HIV-1 by administering to a human incapable of mounting an effective or rapid immune response to infection with HIV-1, a pharmaceutical composition containing the antibody compositions described above. The method can involve chronically administering the composition. Among such patients suitable for  
10 treatment with this method are HIV-1 infected patients who are immunocompromised by disease and unable to mount a strong immune response. In later stages of HIV infection, the likelihood of generating effective titers of antibodies is less, due to the immune impairment associated with the disease. Also among such patients are HIV-1  
15 infected pregnant women, neonates of infected mothers, and unimmunized patients with putative exposure (e.g., a human who has been inadvertently "stuck" with a needle used by an HIV-1 infected human).

For such patients, the method of the invention preferably employs as the pharmaceutical composition an antibody composition of the invention. The antibody composition includes a polyclonal antibody composition prepared in  
20 other mammals, preferably normal humans or alternatively, the other forms of antibody described above, e.g., monoclonal, etc. These antibody compositions are administered as passive immunotherapy to inhibit viral multiplication and lower the viral load. The exogenous antibodies which react with multiple known Tat proteins from HIV-1 provide in the patient an immediate interdiction of the transfer of Tat  
25 from virally infected cells to other infected or uninfected cells. According to this method, the patient may be chronically treated with the antibody composition for a long treatment regimen.

In each of the above-described methods, the compositions of the present invention are administered by an appropriate route, e.g., by the  
30 subcutaneous, oral, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, nasal, or inhalation

WO 01/82944

PCT/US01/13031

routes. The presently preferred route of administration is intramuscular for the immunizing (active induction) compositions and intravenous (i.v.), subcutaneous (s.c.), or intramuscular (i.m.) for the antibody (passive therapy) compositions. A recombinant viral vector or naked DNA is preferably administered intramuscularly; however, other certain recombinant viral vectors and/or live commensal bacteria may be delivered orally.

The amount of the protein, peptide or nucleic acid sequences of the invention present in each vaccine dose is selected with regard to consideration of the patient's age, weight, sex, general physical condition and the like. The amount of active component required to induce an immune response, preferably a protective response, or produce an exogenous effect in the patient without significant adverse side effects varies depending upon the pharmaceutical composition employed and the optional presence of an adjuvant (for the protein-containing compositions).

Generally, for the compositions containing protein/peptide, fusion protein, MAP or coupled protein, or antibody composition, each dose will comprise between about 50  $\mu$ g to about 20 mg of the peptide/polypeptide immunogens per mL of a sterile solution. A more preferred dosage may be about 500  $\mu$ g of immunogen. Other dosage ranges may also be contemplated by one of skill in the art. Initial doses may be optionally followed by repeated boosts, where desirable.

The antibody compositions of the present invention can be employed in chronic treatments for subjects at risk of acute infection due to needle sticks or maternal infection. A dosage frequency for such "acute" infections may range from daily dosages to once or twice a week i.v., s.c., or i.m., for a duration of about 6 weeks. The antibody compositions of the present invention can also be employed in chronic treatments for infected patients, or patients with advanced HIV. In infected patients, the frequency of chronic administration may range from daily dosages to once or twice per month i.v., s.c., or i.m., and may depend upon the half-life of the immunogen (e.g., about 7-21 days). However, the duration of chronic treatment for such infected patients is anticipated to be an indefinite, but prolonged period.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Alternatively, compositions of this invention may be designed for direct administration of synthetic genes or molecules of this invention as "naked DNA". As with the protein immunogenic compositions, the amounts of components in the DNA and vector compositions and the mode of administration, e.g., injection or intranasal, may be selected and adjusted by one of skill in the art. Generally, each dose will comprise between about 50  $\mu\text{g}$  to about 1 mg of immunogen-encoding DNA per mL of a sterile solution.

For recombinant viruses containing the synthetic genes or molecules, the doses may range from about 20 to about 50 ml of saline solution containing concentrations of from about  $1 \times 10^7$  to  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml recombinant virus of the present invention. A preferred human dosage is about 20 ml saline solution at the above concentrations. However, it is understood that one of skill in the art may alter such dosages depending upon the identity of the recombinant virus and the make-up of the immunogen that it is delivering to the host.

The amounts of the commensal bacteria carrying the synthetic gene or molecules to be delivered to the patient will generally range between about  $10^3$  to about  $10^{12}$  cells/kg. These dosages may be altered by one of skill in the art depending upon the bacterium being used and the particular composition containing Epitope I and optional immunogens being delivered by the live bacterium.

Thus, the compositions of this invention are designed to retard or minimize infection by the selected virus of an uninfected mammal, e.g., human. Such compositions thus have utility as vaccines. Anti-Tat protein antibodies are not reactive with the HIV-1 proteins used in diagnostic assays to detect seroconversion after infection. Thus, subjects treated with the compositions of this invention would not be stigmatized with false-positive tests for HIV-1 infection, and it would remain possible to detect seroconversion if treated subjects did become infected with HIV-1.

Providing a mammal with the compositions of this invention, whether as a protein/peptide-containing composition or by administration of a novel nucleic acid sequence encoding the immunogen, affords a radically different strategy for AIDS vaccination because it permits the lowering of viral levels by biological

WO 01/82944

PCT/US01/13031

interdiction of desirably, greater than about 95%, and preferably greater than about 99%, of known Tat protein variants of HIV-1, lowering multiplication of HIV-1.

The use of the Tat immunogen-containing compositions has a particularly desirable advantage in contrast to other treatments and prophylactic methods employed against such viruses. Because interdiction of the Tat protein extracellularly inhibits the multiplication of all HIV quasi-species or strains indiscriminately, it does not create a selective pressure on the parent virus itself for selection of mutant virus variants. Thus, blocking the uptake of Tat protein by the patient's cells not only reduces the level of viremia, but does so in a manner that precludes the selection of "escape variants".

Additionally, the invention comprises a method of actively treating asymptomatic HIV-1 infected subjects with viremia, since during the course of the disease, extracellular Tat protein likely contributes to the persistent infection and immune abnormalities that are present at this stage of HIV-1 infection.

Interdiction of extracellular Tat protein by antibodies induced by immunization according to this invention can reduce viremia with more effective immune control, and result in delay or prevention of progression to AIDS.

The mechanism of the present invention as described above is useful in impeding the course of viral infection and producing desirable clinical results.

More specifically, the compositions of this invention are capable of reducing viremia in patients already infected with the virus by blocking further uptake of the Tat protein by uninfected cells. The compositions of the present invention, used either alone or in conjunction with other therapeutic regimens for HIV infected patients, are anticipated to assist in the reduction of viremia and prevention of clinical deterioration.

For such therapeutic uses, the formulations and modes of administration are substantially identical to those described specifically above and may be administered concurrently or simultaneously with other conventional therapeutics for the specific viral infection. For therapeutic use or prophylactic use, repeated dosages of the immunizing compositions may be desirable, such as a yearly booster or a booster at other intervals.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

*L. Diagnostic Kits of this Invention*

The peptides and polypeptides described above can also be employed as reagents of a kit useful for the measurement and detection of titers and specificities of antibodies induced by vaccination with the compositions described above. The kit of the invention can include at least the two required Epitope I peptides identified above, and preferably two or more of the primate-recognized Epitope I and optional immunogens. In one embodiment, each peptide has on its N terminus the protein biotin and a spacer, e.g., -Ser-Gly-Ser-Gly- [SEQ ID NO: 27]. Alternatively, the peptide may have on its C terminus a spacer, e.g., -Gly-Ser-Gly-Ser- [SEQ ID NO: 39], and the protein biocytin. These embodiments enable the peptides to be bound to an avidin-coated solid support, e.g., a plate or beads. Other binding agents known to those of skill in the diagnostic assay art may also be employed for the same purposes. Also provided in the kit are labeled reagents which detect the binding of antibody to the immobilized Epitope peptides, such as a goat anti-human immunoglobulin or the like. The label on the reagent may be selected from the many known diagnostic labels, such as radioactive compounds, fluorescent compounds and proteins, colorimetric enzymes, etc. The kit thus also contains miscellaneous reagents and apparatus for reading labels, e.g., certain substrates that interact with an enzymatic label to produce a color signal, etc., apparatus for taking blood samples, as well as appropriate vials and other diagnostic assay components. One of skill in the art may also readily select other conventional diagnostic components for this kit.

Such kits and reagents may be employed in a method for detecting the titers and reactivity patterns of antibodies in subjects vaccinated with the compositions of this invention. A method for determining the presence and or titer of antibodies induced by immunization to a Tat immunogen includes the steps of contacting a biological sample from an immunized subject, e.g., a body fluid, preferably blood, serum or plasma, but also possibly urine, saliva and other fluids or tissue, with one or more of the binding sequences of primate-recognized Epitope I and optional immunogens, preferably immobilized on a solid support, such as a plate or

WO 01/82944

PCT/US01/13031

beads. The primate-recognized Epitope I and optional binding sequences employed in this method may be the unmodified minimal epitope binding regions.

Once the biological sample is exposed to the immobilized peptides for a sufficient time, the support is washed to eliminate any material from the biological sample which is not bound to the peptides. Such washing steps are conventional in diagnostic assays, and performed with saline. If antibodies to Epitopes I and optional immunogens or a combination thereof, were induced in the subject by the above-described treatment, the immobilized peptides have been bound with antibody from the biological sample. Thereafter, a labeled reagent is added to the material on the support to detect the binding between the peptides on the solid support and antibody in said biological sample. Preferably, such a reagent is an anti-human immunoglobulin, such as goat anti-human immunoglobulin. The label is selected from among a wide array of conventionally employed diagnostic labels, as discussed above. In one embodiment, the label can be a colorimetric enzyme, which upon contact with a substrate produces a detectable color signal. The presence and/or intensity of the color provides evidence of the induction of antibody in the treated subject. This assay may be employed to determine the efficacy of the immunization, as well as to monitor immune status of a patient.

The selection of particular assay steps, as well as a variety of detectable label systems, is well within the skill of the art. Such selection is routine and does not limit the present invention.

*M. Advantages of the Invention*

One of the advantages of the compositions of this invention is the small number of immunogens required for inclusion into a composition of this invention to cross-react with greater than 95 to greater than 99% of known Tat protein variants of HIV-1 of the common B subtype. As illustrated in the examples below, the primate-recognized Epitope I immunogenic composition containing the two required primate-recognized Epitope I amino acid sequences as well as the six additional Epitope I sequences cross-reacts with 95% Tat proteins of HIV-1 of the common B subtype, as well as with all 56 Tat protein sequences from less frequent

WO 01/82944

PCT/US01/13031

non-B subtypes of HIV-1. Thus, a single composition may be usefully employed in protecting against or treating infection, caused by the vast majority of HIV-1 strains that can be encountered.

Further, having identified the precise epitopes of Tat against  
5 which binding is desired (i.e., AA5-12 of SEQ ID NO: 15) new desirable Tat peptide immunogens from newly occurring HIV-1 strains or newly discovered strains may be easily identified using the methods described herein, and included in the compositions. This flexibility enables the compositions of this invention to be useful prophylactically  
10 against any new strain or strains of HIV-1 identified in the future. In view of the teachings herein, one of skill in the art is expected to be readily able to incorporate new combinations of Tat immunogens (and the nucleic acid constructs encoding them) into the compositions.

For example, the use of conventional techniques such as PCR  
and high density oligonucleotide arrays [M. J. Kozal *et al*, *Nature Med.*, 2:753  
15 (1996)] enables one of skill in the art to obtain the amino acid sequences of a large array of HIV-1 Tat proteins representing variants of clinical isolates of HIV-1 strains and subtypes. Using such techniques permits determination of other variants of the HIV-1 B subtype as well as other subtypes in underdeveloped countries, which have not been so intensively studied to date. The determination of new Tat sequences will  
20 enable ready inclusion of the corresponding peptides as immunogens into compositions of this invention, allowing the induction of an antibody response against other rare Tat proteins of HIV-1.

Cross-reactivity studies with antibodies raised to synthetic  
peptides corresponding to each Tat variant can be utilized to eliminate the need for  
25 immunizing with Tat variants in which the sequence changes are immunologically silent, in that these peptides are strongly bound by antibodies to the consensus sequence or other variants.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

The following examples illustrate preferred methods for preparing the compositions of the invention and utilizing these compositions to induce antibodies to Tat proteins of the virus in an immunized host. These examples are illustrative only and do not limit the scope of the invention.

5 EXAMPLE 1 - IMMUNOLOGICAL STUDIES ON MINIMAL TAT PROTEIN AMINO ACID SEQUENCES NECESSARY FOR BINDING TO ANTIBODY FOR PRIMATE-RECOGNIZED EPITOPE 1 IN HIV-1 TAT PROTEIN. SEQUENCE VARIATIONS, AND IMMUNOLOGICAL CROSS-REACTIVITIES OF ANTISERUMS TO THESE SEQUENCES

10 A. *Synthetic Peptide and Conjugates*

The synthetic peptides were synthesized by solid phase synthesis on derivatized polyethylene supports [R. M. Valerio *et al*, Int. J. Peptide Res., 44:158-165 (1994)]. Immunizing peptides were synthesized with an amino terminal Cys being incorporated to facilitate coupling to a carrier protein and an amidated C-terminus. Detector peptides were synthesized with an amino terminal biotin-Ser-Gly-Ser-Gly- sequence [SEQ ID NO: 27] and a free acid function at the C-terminus for use in ELISA assays for detection of reactivity and cross-reactivity. Immunizing peptides, covalently conjugated to diphtheria toxoid (DT) carrier protein via the cysteinyl side chain, with a peptide-carrier ratio of 5-8 [A. C. J. Lee *et al.*, 20 Molec. Immunol., 17:749 (1980)], were purified by high pressure liquid chromatography (HPLC) to greater than 95% purity by analytical HPLC and mass spectrometry, with detector peptides being used at greater than 50% purity.

B. *Immunizations*

The peptide conjugates were taken up in purified water and 25 emulsified 1:1 with complete Freund's adjuvant (CFA) or incomplete Freund's adjuvant (IFA) [ANTIBODIES - A LABORATORY MANUAL, Eds. E. Harlow and P. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1998)]. Total volume per primate was 1 ml, and this contained 100 µg of peptide coupled to DT.

WO 01/82944

PCT/US01/13631

Rhesus monkeys that were part of a viral challenge study were immunized with antigen in IFA/CFA as follows. Several primates were used for the immunizing peptide, with the initial intramuscular (IM) injection with conjugate in CFA and a subsequent IM boost at 2 weeks with conjugate in IFA. A pre-bleed was drawn before the first injection and larger bleeds were taken 3 and 5 weeks after the booster injection.

C. *ELISA Titers*

ELISA assays were performed as described by H.M. Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3998 (1983). Antibody titer was the reciprocal of the serum dilution that resulted in an absorbance 1.0 OD units above background. The geometric mean titer (GMT) for 2-3 serums was calculated for each response, or single serums only were available for some monkey immunizations.

ELISA results for this assay in rabbits vs. monkeys are shown in Figs. 1A and 1B, respectively. The ELISA results demonstrated that the primate antibodies to the immunogen incorporating Epitope I were reacting with the sequence -Asp-Pro-Arg,-Leu-Glu,-Pro-Trp-Lys<sub>12</sub>- [AA5-12 of SEQ ID NO:15]. As discussed below, the positions 7, 9 and 12 represent common variants of this Epitope I peptide recognized by primates.

D. *Analysis of amino acid sequence diversity within the epitopes*

HIV-1 Tat first exon sequences were retrieved from GenBank and the Los Alamos Human Retroviruses and AIDS databases [HUMAN RETROVIRUSES and AIDS 1996, published by the Theoretical Biology and Biophysics Group of the Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, and additional sequences kindly obtained from GenBank by Esther Guzman of the Los Alamos Laboratory]. Incomplete sequences and sequences with stop codons or base deletions leading to a frameshift were deleted, as were obviously identical repeat sequences from the same isolation. Variations of amino acids at the positions within the epitopes were recorded and tabulated.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

*E. Antigenic Cross-Reactivities Between Variants*

Antisera to the epitope consensus sequence were titered by ELISA on the consensus sequence and on sequences with common amino acid variants to determine the effects of amino acid polymorphisms on antigenicity.

5 *F. Variations in sequences*

The primate-recognized Epitope I consensus sequences were evaluated for maximal frequency and recognition by primate antibodies. The antigenic and sequence conservation in HIV-1 Tat proteins from 294 HIV-1 Tat proteins from 294 B clade (I) viruses and 56 non-B clade (II) viruses were evaluated for the  
10 epitopes and the results tabulated in Tables II through VI below.

The top row of Tables II and III indicates the consensus sequence for maximal frequency. The middle rows contain the percent incidence of amino acids found in greater than 5% of sequences at each position, if multiple. The bottom row of each table is the total incidence including amino acids occurring in  
15 greater than 5% of sequences, if multiple. All of these selections in Table II create antigenically distinct epitopes (<25% cross-reactivity); and all of the selections in Table III, except for the entries under amino acid 4.

Table II  
Epitope I - 294 B clades

20

Val <sub>4</sub>	Asp <sub>5</sub>	Pro <sub>6</sub>	Arg <sub>7</sub>	Leu <sub>8</sub>	Glu <sub>9</sub>	Pro <sub>10</sub>	Trp <sub>11</sub>	Lys <sub>12</sub>
			Arg (73)					Lys (96)
			Lys (12)					Asn (2)
			Ser (11)					
			Asn (4)					
100%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Table III  
Epitope I - 56 Non B clades

	Val <sub>4</sub>	Asp <sub>5</sub>	Pro <sub>6</sub>	Asn <sub>7</sub>	Leu <sub>8</sub>	Glu <sub>9</sub>	Pro <sub>10</sub>	Trp <sub>11</sub>	Asn <sub>12</sub>
5	Val (89)			Asn (79)		Glu (86)			Asn (87)
	Ile (11)			Lys (14)		Asp (14)			Lys (13)
				Ser (5)					
	100%	100%	100%	98%	96%	100%	98%	100%	100%

10 As shown in Tables II and III, primate-recognized Epitope I has a potential 16-fold antigenic polymorphism, but one major antigen exists for the B clades and another major antigen exists for the non-B clades. Five other variants account for greater than 95% of known Tat variants. See Tables IV and V; sequences indicated with an asterisk are represented in both B and non-B clades.

Table VI - B Clades (294 sequences)

	Primate epitope sequence	SEQ ID NOs	Incidence	Percent Incidence
15	ValAspProArgLeuGluProTrpLys	AA4-12 of SEQ ID NO: 15	220	75
	ValAspProLysLeuGluProTrpLys*	AA185-193 of SEQ ID NO: 12	35	12
	ValAspProSerLeuGluProTrpLys	AA120-127 of SEQ ID NO: 12	20	7
	ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*	AA55-63 of SEQ ID NO: 12	7	2
			Total: 282	Total: 96
20	ValAspProArgLeuGluProTrpAsn	28	1	<1

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Table V - Non-B Clades (56 sequences)

	Primate epitope sequence	SEQ ID NOs.	Incidence	Percent Incidence
	ValAspProAsnLeuGluProTrpAsn	AA227-235 of SEQ ID NO: 13	36	64
	ValAspProLysLeuGluProTrpAsn	AA344-352 of SEQ ID NO: 13	8	14
5	ValAspProAsnLeuAspProTrpAsn	29	6	11
	ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*	AA55-63 of SEQ ID NO:13	3	5
	ValAspProLysLeuGluProTrpLys*	AA185-193 of SEQ ID NO: 12	1	2
			Total: 53	Total: 95
	ValAspProSerLeuGluProTrpAsn	AA279-287 of SEQ ID NO: 13	1	2
	ValAspProSerLeuAspProTrpAsn	30	1	2
10	ValAspProAsnLeuAspProTrpLys	31	1	2

Table VI shows the poor antigenic cross-reactivity of the position 7 variants of Epitope I, the antigenic distinction of the position 9 variants and the extreme lack of cross-reactivity of antisera to GluProValAspProAsn<sub>7</sub>LeuGlu<sub>9</sub>ProTrpAsn<sub>12</sub> [AA225-235 of SEQ ID NO: 13] with GluProValAspProArg<sub>7</sub>LeuGlu<sub>9</sub>ProTrpLys<sub>12</sub> [AA 2-12 of SEQ ID NO: 15] containing variants at both positions 7 and 12. It further shows antigenic distinction of Glu9 and Asp9 variants.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Table VI - ELISA Reactivity of monkey antisera to Epitope I Immunogens on  
Detector peptides with Tat amino acid positions 7, 9 and 12 Variations

	Immunogen epitope sequence	Detector peptide epitope sequence Titer (% of titer of self peptide)			
5	GluProVal AspProAsn <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>	GluProVal AspProAsn <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>	GluProVal AspProArg <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>	GluProVal AspProLys <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>	GluProVal AspProSer <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>
10	[AA53-63 of SEQ ID NO: 12]	[AA53-63 of SEQ ID NO: 12] 119,000 (100)	[AA2-12 of SEQ ID NO: 15] 25,000 (21)	[AA183-193 of SEQ ID NO: 12] 24,000 (20)	[AA105-115 of SEQ ID NO: 12] 24,000 (20)
15	GluProVal AspProAsn <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpAsn <sub>12</sub>	GluProVal AspProAsn <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpAsn <sub>12</sub>	GluProVal AspProAsn <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>	GluProVal AspProArg <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>	
	[AA225-235 of SEQ ID NO: 13]	[AA225-235 of SEQ ID NO: 13] 157,000 (100)	[AA53-63 of SEQ ID NO: 12] 23,000 (15)	[AA2-12 of SEQ ID NO: 15] 2000 (1)	
20	GluProVal AspProAsn <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>	GluProVal AspProAsn <sub>7</sub> LeuGlu <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>	GluProVal AspProAsn <sub>7</sub> LeuAsp <sub>9</sub> Pro TrpLys <sub>12</sub>		
25	[AA53-63 of SEQ ID NO: 12]	[AA53-63 of SEQ ID NO: 12] 163,000 (100)	[SEQ ID NO: 32] 6000 (4)		

WO 01/82944

PCT/US01/13031

**EXAMPLE 2 - IMMUNOLOGICAL STUDIES ON MINIMAL TAT PROTEIN AMINO ACID SEQUENCES NECESSARY FOR BINDING TO ANTIBODY FOR PRIMATE-RECOGNIZED EPITOPE II IN HIV-1 TAT PROTEIN. SEQUENCE VARIATIONS, AND IMMUNOLOGICAL CROSS-REACTIVITIES OF ANTISERUMS TO THESE SEQUENCES**

5 Using the same procedures outlined in Example 1, the incidence of amino acid sequence variation for 294 B clade and 56 non-B clade HIV-1 Tat sequences was determined within the Epitope II boundaries of antibody binding in monkeys. The results are reported in Tables VII and VIII. The top lines of the tables  
10 contain the consensus sequence. The middle lines contain the percent incidence of amino acids found in greater than 5% of sequences at each position, if multiple. The bottom line shows the total incidence including amino acids occurring in greater than 5% of sequences, if multiple. The amino acid variants at Tat position 42 were antigenically cross-reactive.

15

Table VII  
Epitope II- 294 B clades

Lys <sub>41</sub>	Gly <sub>42</sub>	Leu <sub>43</sub>	Gly <sub>44</sub>	Ile <sub>45</sub>	Ser <sub>46</sub>	Tyr <sub>47</sub>	Gly <sub>48</sub>	Arg <sub>49</sub>	Lys <sub>50</sub>
	Gly (72)								
	Ala (28)								
100%	100%	99%	99%	100%	98%	99%	100%	99%	100%

20

Table VIII  
Epitope II- 56 Non- B clades

Lys <sub>41</sub>	Gly <sub>42</sub>	Leu <sub>43</sub>	Gly <sub>44</sub>	Ile <sub>45</sub>	Ser <sub>46</sub>	Tyr <sub>47</sub>	Gly <sub>48</sub>	Arg <sub>49</sub>	Lys <sub>50</sub>
100%	100%	100%	99%	100%	95%	100%	100%	98%	100%

As revealed in Tables VII and VIII, Epitope II shows almost complete antigenic conservation.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

ELISA reactivity of monkey antisera to Epitope II immunogen on detector peptides with Tat Gly<sub>12</sub> or Ala<sub>12</sub> (variant) within the detector sequences were measured and reported in Table IX below. See Figs. 2A and 2B for a graphical comparison of results in rabbits vs. monkeys, respectively.

5

Table IX

Immunogen epitope sequence	Detector peptide epitope sequence Titer (% of titer on self peptide)	
LysGlyLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys	LysGlyLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys	LysAlaLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys
10 [AA41-50 of SEQ ID NO: 15]	[AA41-50 of SEQ ID NO: 15]	[SEQ ID NO:33]
	25,000 (100%)	19,000 (76%)

**EXAMPLE 3: DEVELOPMENT OF HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY  
TREATMENT FOR ASYMPTOMATIC HIV-1 INFECTIONS**

Commercially available antibody humanized mice are immunized with a suitable amount of the Epitope II immunogen: Cys-Gly-Ser-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-amide [SEQ ID NO:34] coupled to diphtheria toxoid carrier protein. Hybridomas are screened on biotin- Ser-Gly-Ser-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-OH [SEQ ID NO: 35] on streptavidin-coated plates, and an IgG monoclonal antibody with subnanomolar binding affinity and no binding to complement receptors is selected. Specificity is confirmed on recombinant HIV-1 Tat protein.

Since the monoclonal antibody is directed to a non-self antigen, a conventional pre-clinical production, purification and safety testing is anticipated. Human monoclonal antibodies have a half-life of 20 days in man vs. the 18 hours half-life of OKT3, a mouse monoclonal antibody which is extensively consumed on internal CD3. Daily doses of 5 mg OKT3 maintain trough levels around 1

WO 01/82944

PCT/US01/13031

microgram/ml in man. Thus, a biweekly dose of 5 mg anti-Tat monoclonal antibody is anticipated to be sufficient to maintain similar trough levels, a greater than fifty-fold molar excess over the estimated maximal circulating levels of up to 1 ng/ml for HIV-1 Tat protein in infected subjects.

5 Control of plasma viral loads is now an accepted criterion of efficacy for HIV-1 treatment. The efficacy of an anti-Tat monoclonal antibody can be rapidly determined in asymptomatic HIV-1 infected subjects, initially with a four week course of treatment. This protocol is useful in untreated patients, in patients that have failed in HAART protocols for various reasons, or in patients controlled by HAART  
10 therapy, with withdrawal of this therapy for 4 weeks (viral loads rebound rapidly if HAART is stopped). A 2 to 3 log reduction in plasma viral loads to below the LOD (50 viral RNA copies/mL) supports monotherapy with the monoclonal antibody, which is evaluated over a longer time-span. Reduction over one log (90%), but not below the LOD suggests the use of the monoclonal antibody as a component in  
15 therapy.

#### EXAMPLE 4 - DEVELOPMENT OF A UNIVERSAL VACCINE TO PREVENT PROGRESSION TO AIDS IN SUBJECTS

##### *A. Construction of a Synthetic Gene*

Fig 3A illustrates a synthetic gene encoding four copies each of  
20 the four polymorphs of Epitope I detected for the rabbit antibody response, plus four copies of Epitope II, expressed in *E. coli* as a linear fusion protein with *E. coli* DnaK (HSP70). This expressed protein contained all the antigenic epitopes when tested in ELISA with epitope specific rabbit antisera. However, when used to immunize in rabbit or monkey, all Epitope I variants were immunogenic, but Epitope II was not.  
25 Thus, Epitope II is best used as a synthetic peptide conjugate coupled to an appropriate carrier protein.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Fig. 3B illustrates a novel octavalent synthetic gene constructed to incorporate in frame eight primate-recognized Epitope I polymorphs, based on the polymorphism within the Epitope I boundaries recognized in primates:

- 5 R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO: 17]  
 R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO: 19]  
 R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 22]  
 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO: 20]  
 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 24]  
 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO: 21]  
 10 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 18] and  
 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 23]

The Epitope I sequences are separated by dipeptide spacers containing Gly and/or Ser residues. The gene is assembled as described in W.P.C. Stemmer *et al.*, *Gene*, 164:49 (1995). Briefly, top strand 60-mer oligonucleotides (oligos) and bottom strand oligos with 20 nucleotide (nt) overlaps are synthesized along with two end 50-mers. The 60-mers are incubated together under hybridizing conditions and polymerase chain reaction (PCR) is used to fill in the sequence and amplify it. The end 50-mers are then added and the assembly completed by PCR, with isolation of the full length gene on agarose gel. The gene is sequenced and found to have the correct sequence within the actual epitopes. A similar heptavalent gene may be constructed by eliminating the rare variant R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 24].

*B. Expression of the Fusion Protein*

This gene described above is then excised with restriction enzymes and inserted into a suitable expression vector containing, in frame, the sequence for diphtheria toxoid (HSP70). *E. coli* are transfected and colonies expressing the protein are isolated. The isolated colonies are grown and expression is induced. Protein from colonies expressing the fusion protein are identified. The resulting protein is purified utilizing conventional methods.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Fig. 3C illustrates a monovalent Epitope II immunogen optionally prepared as a conjugate of synthetic peptide with a carrier protein such as diphtheria toxoid, using similar techniques.

5 C. *Assays for Assessing the Expression of the Epitopes Correctly in the Fusion Protein and Efficacy in Inducing Anti-Tat Antibodies*

10 Four variants of Epitopes I, in which Y<sub>7</sub> is either Arg, Asn, Lys or Ser, and X<sub>9</sub> is Glu and Z<sub>12</sub> is Lys, and both variants of Epitope II are constructed in a synthetic gene and expressed as a fusion protein, as described in paragraphs A and B above. To determine if each epitope is expressed in the fusion protein in a form that can be recognized by primate antisera, primate antisera generated to synthetic peptides corresponding to the Epitope I sequences are tested by ELISA, using conventional methodology. Plates are initially directly coated with the fusion protein and then exposed to 100 µg/ml solution of antisera (e.g., rabbit antisera) which are known to be reactive for Epitopes I and II. The variant epitope sequences are expressed in a conformation recognizable by antibodies to the corresponding synthetic peptides, as shown by a titer of greater than 32,000 for each epitope.

15 To evaluate the immunogenicity of the multivalent immunogen, monkeys were immunized with the fusion protein in IFA. The monkey antisera was then assessed on synthetic peptides of the Epitopes I and II. Significant titers developed to the Epitope I variants, i.e., titer of 28,000 to Epitope I, when Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys; titer of 16,000 to Epitope I when Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Lys; titer of 37,000 to Epitope I, when Y<sub>7</sub> is Lys and Z<sub>12</sub> is Lys; and titer of 4,000 to Epitope I, when Y<sub>7</sub> is Ser and Z<sub>12</sub> is Lys. Titer to Epitope II was 700, indicating that this epitope is best presented for immunization as a synthetic peptide coupled to a carrier.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

**EXAMPLE 5: METHOD AND KITS FOR DETECTING TITERS AND SPECIFICITIES OF ANTIBODIES INDUCED BY VACCINATION**

To follow the titer and specificities of antibodies induced following immunization with the vaccines of this invention, an assay method may be employed.

- 5 In one embodiment of such as assay, peptides containing the primate-recognized Epitope I sequences reported in Example 1 (depending on the composition of the immunizing vaccine) are used to develop kits measuring titers and reactivity patterns of antibodies in vaccinated subjects.

- 10 These peptides are synthesized with Biotin-Ser-Gly-Ser-Gly- [SEQ ID NO:36] at the N-terminus. Each peptide is coated onto separate avidin coated plates, with a sequence -Ser-Gly-Ser-Gly- [SEQ ID NO:27] serving as a spacer to ensure that the relevant peptide sequence is external to the biotin binding pocket of avidin. The plates are then incubated with dilutions of test serum, washed, and the antibody binding determined with reagent to human immunoglobulin, e.g., goat anti-human  
15 immunoglobulin, directly labeled with enzyme. A reagent is employed to react with the enzyme and produce a colorimetric signal (R&D kit inserts).

- Numerous modifications and variations of the present invention are included in the above-identified specification and are expected to be obvious to one of skill in the art. Such modifications and alterations to the compositions and processes  
20 of the present invention are believed to be encompassed in the scope of the claims appended hereto.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition comprising at least two variants of a peptide or polypeptide of the formula  
R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 SEQ ID NO: 8,  
wherein Y<sub>7</sub> is selected from the group consisting of Arg, Lys, Ser and Asn;  
wherein X<sub>9</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp;  
wherein Z<sub>12</sub> is selected from the group consisting of Lys and Asn;  
wherein R1 is selected from the group consisting of hydrogen, a lower alkyl, a lower alkanoyl, and a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl;  
wherein R2 is selected from the group consisting of a free hydroxyl, an amide, and a sequence of one or up to about 5 additional amino acids, optionally substituted with an amide, and  
wherein in at least one of said two variants Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys, and in at least a second of said two variants Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn.
2. The composition according to claim 1 wherein R1 is Val, resulting in the sequence Val-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub> SEQ ID NO: 37.
3. The composition according to claim 1 wherein R1 is X<sub>2</sub>-Pro-Val, wherein X<sub>2</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp, resulting in the sequence X<sub>2</sub>-Pro-Val-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub> [SEQ ID NO: 38], optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl.
4. The composition according to claim 1 wherein R2 is -His-Pro-Gly-Ser- SEQ ID NO:16 optionally substituted with an amide.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

5. The composition according to claim 1 comprising at least three or more amino acid sequences, said sequences comprising

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 SEQ ID NO:17

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 SEQ ID NO:18

and one or more sequences selected from the group consisting of:

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 SEQ ID NO:19

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 SEQ ID NO:22

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 SEQ ID NO:20

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 SEQ ID NO:24

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 SEQ ID NO:21

and

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2 SEQ ID NO:23

6. The composition according to claim 5, further comprising at least seven of said amino acid sequences.

7. The composition according to claim 5, comprising all eight of said sequences.

8. The composition according to claim 1 wherein said peptides or polypeptides are produced synthetically.

9. The composition according to claim 1 wherein said peptides or polypeptides are produced recombinantly.

10. The composition according to claim 1 wherein one or more of said peptides is expressed as a synthetic peptide coupled to a carrier protein.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

11. The composition according to claim 1 wherein one or more of said peptides is expressed as a multiple antigenic peptide, optionally coupled to a carrier protein.
12. The composition according to claim 1 wherein one or more of the selected peptides is expressed within a recombinantly produced protein, optionally fused in frame with a carrier protein.
13. The composition according to any of claims 10-12, wherein said carrier protein is selected from the group consisting of an *E. coli* DnaK protein, a GST protein, a mycobacterial heat shock protein 70, a diphtheria toxoid, a tetanus toxoid, a galactokinase, an ubiquitin, an  $\alpha$ -mating factor, a  $\beta$ -galactosidase, and an influenza NS-1 protein.
14. A composition comprising:
- (a) at least two variants of a peptide or polypeptide of the formula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 SEQ ID NO: 8, wherein Y<sub>7</sub> is selected from the group consisting of Arg, Lys, Ser and Asn; wherein X<sub>9</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp; wherein Z<sub>12</sub> is selected from the group consisting of Lys and Asn; wherein R1 is selected from the group consisting of hydrogen, a lower alkyl, a lower alkanoyl, and a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl; wherein R2 is selected from the group consisting of a free hydroxyl, an amide, and a sequence of one or up to about 5 additional amino acids, optionally substituted with an amide, and wherein in at least one of said two variants Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys, and in at least a second of said two variants Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn; and
- (b) at least one peptide or polypeptide of the formula R3-Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R4 SEQ ID NO: 5, wherein X<sub>42</sub> is selected from the group consisting of Gly or Ala; wherein R3 is selected from the group consisting of hydrogen, a lower alkyl, a lower alkanoyl, and a sequence of

WO 01/82944

PCT/US01/13031

between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl; wherein R4 is selected from the group consisting of a free hydroxyl, an amide, and a sequence of one or up to about 5 additional amino acids excluding the basic amino acids -Lys-Arg-Arg-, optionally substituted with an amide.

15. The composition according to claim 14 wherein said peptides or polypeptides are produced synthetically.

16. The composition according to claim 14 wherein said peptides or polypeptides are produced recombinantly.

17. The composition according to claim 14 wherein one or more of said peptides is expressed as a synthetic peptide coupled to a carrier protein.

18. The composition according to claim 14 wherein one or more of said peptides is expressed as a multiple antigenic peptide, optionally coupled to a carrier protein.

19. The composition according to claim 14 wherein one or more of the selected peptides is expressed within a recombinantly produced protein, optionally fused in frame with a carrier protein.

20. The composition according to claim 17, 18 or 19, wherein said carrier protein is selected from the group consisting of an *E. coli* DnaK protein, a GST protein, a mycobacterial heat shock protein 70, a diphtheria toxoid, a tetanus toxoid, a galactokinase, an ubiquitin, an  $\alpha$ -mating factor, a  $\beta$ -galactosidase, and an influenza NS-1 protein.

21. A pharmaceutical composition comprising a composition of claim 1, a pharmaceutically acceptable carrier and an optional adjuvant.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

22. A method for inducing anti-HIV-1 Tat antibodies, said method comprising the steps of:

exposing a subject to an effective amount of composition of claim 1, which actively induces antibodies that react with HIV-1 Tat proteins from different strains or subtypes of HIV-1.

23. A method for producing a composition useful for impairing HIV-1 multiplication in an immune incompetent human, said method comprising:

(a) immunizing a primate with a composition of claim 1; and  
(b) isolating and purifying antibody from said immunized mammal in sterile form, wherein said antibody forms a component of said composition.

24. The method according to claim 23, wherein said isolated antibody is selected from the group consisting of an isolated polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, an antibody produced by screening phage displays, and an antibody fragment.

25. A method for determining the presence and or titer of antibodies induced by immunization to a Tat immunogen comprising:

(A) contacting a biological sample from an immunized subject with a peptide or polypeptide composition of claim 1 bound to a solid support;  
(B) washing said support to eliminate any from said biological sample which is not bound to said sequences;  
(C) contacting said support with a reagent associated with a detectable label, wherein said reagent detects binding between said sequences on said solid support and antibody in said biological sample, and wherein said label produces a detectable signal.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

26. An antibody which specifically binds to an epitope of the formula -Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>- SEQ ID NO: 9, wherein Y<sub>7</sub> is selected from the group consisting of Arg, Lys, Ser and Asn; wherein X<sub>9</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp; wherein Z<sub>12</sub> is selected from the group consisting of Lys and Asn.

27. The antibody according to claim 26 which is selected from the group consisting of an isolated polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, an antibody produced by screening phage displays, and an antibody fragment.

28. An antibody composition comprising at least one antibody according to claim 26.

29. An antibody composition comprising at least two different antibodies which specifically bind to at least two variants of a peptide or polypeptide of the formula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 SEQ ID NO: 8,

wherein Y<sub>7</sub> is selected from the group consisting of Arg, Lys, Ser and Asn; wherein X<sub>9</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp; wherein Z<sub>12</sub> is selected from the group consisting of Lys and Asn; wherein R1 is selected from the group consisting of hydrogen, a lower alkyl, a lower alkanoyl, and a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl; wherein R2 is selected from the group consisting of a free hydroxyl, an amide, and a sequence of one or up to about 5 additional amino acids, optionally substituted with an amide, and wherein in at least one of said two variants Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys, and in at least a second of said two variants Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn.

30. The composition according to claim 29, comprising a mixture of more than two different said antibodies, said antibodies which bind HIV-1 Tat protein epitope sequences from multiple strains of HIV-1.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

31. The composition according to claim 29 wherein said antibodies are selected from the group consisting of an isolated polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, an antibody produced by screening phage displays, an antibody fragment and mixtures thereof.

32. An antibody which specifically binds to an epitope having the amino acid sequence Lys-X<sub>42</sub>-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- SEQ ID NO: 10, wherein X<sub>42</sub> is selected from the group consisting of Gly and Ala, said antibody distinct from an antibody which recognizes an epitope having the amino acid sequence -Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys- SEQ ID NO:11.

33. The antibody according to claim 32 which is selected from the group consisting of an isolated polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, an antibody produced by screening phage displays, and an antibody fragment.

34. An antibody composition comprising at least one antibody according to claim 32.

35. A pharmaceutical composition comprising an antibody or antibody composition of any of claims 26 to 34, and a pharmaceutically acceptable carrier and an optional adjuvant.

36. A method for reducing the viral levels of HIV-1, said method comprising the steps of administering to a human an antibody or antibody composition of any of claims 26 to 34.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

37. A synthetic gene comprising nucleic acid sequence encoding sequentially at least two variants of a peptide or polypeptide of the formula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 SEQ ID NO:8, wherein Y<sub>7</sub> is selected from the group consisting of Arg, Lys, Ser and Asn; wherein X<sub>9</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp; wherein Z<sub>12</sub> is selected from the group consisting of Lys and Asn; wherein R1 is selected from the group consisting of hydrogen, a lower alkyl, a lower alkanoyl, and a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl; wherein R2 is selected from the group consisting of a free hydroxyl, an amide, and a sequence of one or up to about 5 additional amino acids, optionally substituted with an amide, and wherein in at least one of said two variants Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys, and in at least a second of said two variants Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn.

38. The synthetic gene of claim 37, wherein said peptides or polypeptides are fused to a carrier protein.

39. The synthetic gene according to claim 37 wherein each nucleic acid sequence encoding an amino acid sequence is separated by a spacer sequence.

40. A pharmaceutical composition comprising a synthetic gene of claim 37, a pharmaceutically acceptable carrier and an optional adjuvant.

41. A method for inducing anti-HIV-1 Tat antibodies, said method comprising the steps of:  
exposing a subject to an effective amount of a synthetic gene of claim 37, which actively induces antibodies that react with HIV-1 Tat proteins from different strains or subtypes of HIV-1.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

42. A method for producing a composition useful for impairing HIV-1 multiplication in an immune incompetent human, said method comprising:

(a) immunizing a primate with a synthetic gene of claim 37;  
and

(b) isolating and purifying antibody from said immunized primate in sterile form, wherein said antibody forms a component of said composition.

43. The method according to claim 42, wherein said isolated antibody is selected from the group consisting of an isolated polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, an antibody produced by screening phage displays, and an antibody fragment.

44. A synthetic molecule comprising the synthetic gene of claim 37, operatively linked to regulatory nucleic acid sequences, which direct and control expression of the product of said synthetic gene in a host cell.

45. The molecule according to claim 44 which is a plasmid.

46. A pharmaceutical composition comprising a synthetic molecule of claim 44, a pharmaceutically acceptable carrier and an optional adjuvant.

47. A method for inducing anti-HIV-1 Tat antibodies, said method comprising the steps of:

exposing a subject to an effective amount of a synthetic molecule of claim 44, which actively induces antibodies that react with HIV-1 Tat proteins from different strains or subtypes of HIV-1.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

48. A method for producing a composition useful for impairing HIV-1 multiplication in an immune incompetent human, said method comprising:

- (a) immunizing a primate with a molecule of claim 44;
- (b) isolating and purifying antibody from said immunized primate in sterile form, wherein said antibody forms a component of said composition.

49. The method according to claim 48, wherein said isolated antibody is selected from the group consisting of an isolated polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, an antibody produced by screening phage displays, and an antibody fragment.

50. A microorganism comprising:

- (a) a first synthetic gene comprising a nucleic acid sequence encoding at least two peptides or polypeptides of claim 1, said gene optionally fused to a carrier protein; or
- (b) a synthetic molecule comprising the synthetic gene of (a), operatively linked to regulatory nucleic acid sequences, which direct and control expression of the product of said synthetic gene in a host cell.

51. The microorganism according to claim 50 selected from the group consisting of a recombinant virus capable of expressing multiple copies of the product of said gene in a host cell, wherein said virus is non-pathogenic to humans, and a commensal bacterium capable of expressing multiple copies of the product of said gene in a host.

52. A pharmaceutical composition comprising a microorganism of claim 51, a pharmaceutically acceptable carrier and an optional adjuvant.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

53. A method for inducing anti-HIV-1 Tat antibodies, said method comprising the steps of:

exposing a subject to an effective amount of a microorganism of claim 50, which actively induces antibodies that react with HIV-1 Tat proteins from different strains or subtypes of HIV-1.

54. A method for producing a composition useful for impairing HIV-1 multiplication in an immune incompetent human, said method comprising:

(a) immunizing a mammal with a microorganism of claim 50;  
(b) isolating and purifying antibody from said immunized mammal in sterile form, wherein said antibody forms a component of said composition.

55. The method according to claim 54, wherein said isolated antibody is selected from the group consisting of an isolated polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, an antibody produced by screening phage displays, and an antibody fragment.

56. A mammalian host cell containing a nucleic acid sequence encoding at least two variants of a peptide or polypeptide of the formula R1-Asp-Pro-Y<sub>7</sub>-Leu-X<sub>9</sub>-Pro-Trp-Z<sub>12</sub>-R2 SEQ ID NO: 8, wherein Y<sub>7</sub> is selected from the group consisting of Arg, Lys, Ser and Asn; wherein X<sub>9</sub> is selected from the group consisting of Glu and Asp; wherein Z<sub>12</sub> is selected from the group consisting of Lys and Asn; wherein R1 is selected from the group consisting of hydrogen, a lower alkyl, a lower alkanoyl, and a sequence of between 1 to about 5 amino acids, optionally substituted with a lower alkyl or lower alkanoyl; wherein R2 is selected from the group consisting of a free hydroxyl, an amide, and a sequence of one or up to about 5 additional amino acids, optionally substituted with an amide, and wherein in at least one of said two variants Y<sub>7</sub> is Arg and Z<sub>12</sub> is Lys, and in at least a second of said two variants Y<sub>7</sub> is Asn and Z<sub>12</sub> is Asn.

WO 01/82944

PCT/US01/13031

1/3

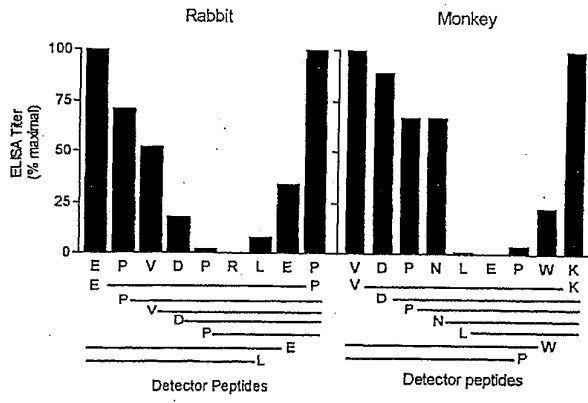


Fig. 1A

Fig. 1B

WO 01/82944

PCT/US01/13031

2/3

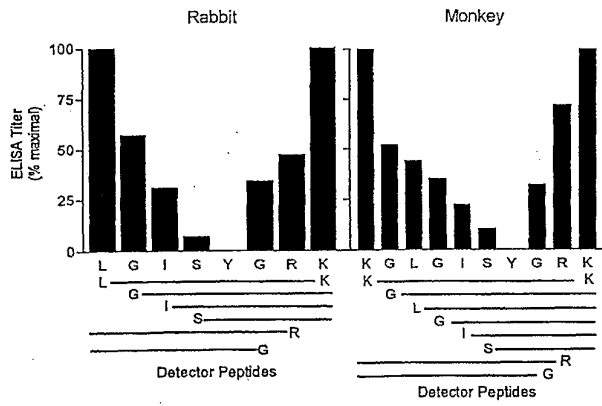


Fig. 2A

Fig. 2B

WO 01/82944

PCT/US01/13031

3/3

**FIG. 3A** [SEQ ID NO: 12]

DnaK (HSP70)- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Arg -Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub>- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Ser-Gly-Ser)<sub>4</sub>

**FIG. 3B** [SEQ ID NO: 13]

DnaK (HSP70) - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Arg -Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub>- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Asn -Leu-Ala-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>4</sub>- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>4</sub> - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)<sub>4</sub>

**Fig. 3C** [SEQ ID NO: 14]

Diphtheria toxoid conjugated with -Cys-Gly-Ser-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-amide

WO 01/82944

PCT/US01/13031

## SEQUENCE LISTING

<110> Thymon L.L.C.  
Goldstein, Gideon

<120> Methods and Compositions for Impairing Multiplication of HIV-1

<130> GGF3APCT

<150> US 09/561,366  
<151> 2000-04-28

<160> 39

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 1  
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5

<210> 2  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 2  
Gly Arg Gly Asp Ser Pro  
1 5

<210> 3  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

<400> 3  
Asp Pro Xaa Leu Glu Pro  
1 5

WO 01/82944

PCT/US01/13031

<210> 4  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Val can be optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> Pro is optionally amidated

<400> 4  
Val Asp Pro Xaa Leu Glu Pro  
1 5

<210> 5  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Lys is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa can be Gly or Ala

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> Lys is optionally amidated

<400> 5

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; Arg is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (3)..(3)

&lt;223&gt; Xaa can be Ala, Pro, Ser or Gln

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; Xaa can be Pro or His

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (5)..(5)

&lt;223&gt; Xaa can be Gln or Pro

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (6)..(6)

&lt;223&gt; Xaa can be Asp, Asn, Gly or Ser

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (7)..(7)

&lt;223&gt; Ser can be optionally amidated

&lt;400&gt; 6

Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ser  
1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 12

WO 01/82944

PCT/US01/13031

<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Ser is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa can be Asn or Thr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa can be Ala or Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)..(12)  
<223> Pro is optionally amidated

<400> 7

Ser	Gln	Xaa	His	Gln	Xaa	Ser	Leu	Ser	Lys	Gln	Pro
1			5						10		

<210> 8  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)

WO 01/82944

PCT/US01/13031

&lt;223&gt; Xaa can be Glu or Asp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (8)..(8)

&lt;223&gt; Xaa can be Lys or Asn and can be optionally amidated

&lt;400&gt; 8

Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa

1 5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (3)..(3)

&lt;223&gt; Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (5)..(5)

&lt;223&gt; Xaa can be Glu or Asp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (8)..(8)

&lt;223&gt; Xaa can be Lys or Asn

&lt;400&gt; 9

Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa

1 5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (2)..(2)

&lt;223&gt; Xaa can be Gly or Ala

WO 01/82944

PCT/US01/13031

&lt;400&gt; 10

Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;400&gt; 11

Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys  
 1 5

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 260

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; Glu is attached to DnaK (HSP70)

&lt;400&gt; 12

Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val  
 1 5 10 15

Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg  
 20 25 30

Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro  
 35 40 45

Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly  
 50 55 60

Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro  
 65 70 75 80

Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro  
 85 90 95

Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu  
 100 105 110

Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys  
 115 120 125

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu  
 130 135 140

Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp  
 145 150 155 160

Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu  
 165 170 175

Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp  
 180 185 190

Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser  
 195 200 205

Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu  
 210 215 220

Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser  
 225 230 235 240

Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg  
 245 250 255

Lys Ser Gly Ser  
 260

<210> 13  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Glu is attached to DnaK (HSP70)

<400> 13

Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val  
 1 5 10 15

Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg  
 20 25 30

Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro  
 35 40 45

Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly  
 50 55 60

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro  
65 70 75 80

Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro  
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Trp Lys Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro  
100 105 110

Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu  
115 120 125

Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys  
130 135 140

Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu  
145 150 155 160

Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp  
165 170 175

Pro Asn Leu Ala Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu  
180 185 190

Ala Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Ala Pro Trp  
195 200 205

Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Ala Pro Trp Asn Gly Ser  
210 215 220

Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val  
225 230 235 240

Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn  
245 250 255

Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro  
260 265 270

Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly  
275 280 285

Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro  
290 295 300

Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro  
305 310 315 320

Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu  
325 330 335

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn  
 340 345 350

Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu  
 355 360 365

Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser  
 370 375 380

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; Cys is conjugated with Diphtheria toxoid

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (13)..(13)

&lt;223&gt; Lys is attached to an amide.

&lt;400&gt; 14

Cys Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;400&gt; 15

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Ala Pro Gln Asp Ser Gln Thr  
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln  
 65 70

WO 01/82944

PCT/US01/13031

<210> 16  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa can be Glu or Asp

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa can be Lys or Asn

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)..(12)  
<223> Ser is attached to an amide

<400> 16

Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa His Pro Gly Ser  
1                    5                    10

<210> 17  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Lys is optionally amidated

WO 01/82944

PCT/US01/13031

&lt;400&gt; 17

Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys  
1 5

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (8)..(8)

&lt;223&gt; Asn is optionally amidated

&lt;400&gt; 18

Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn  
1 5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (8)..(8)

&lt;223&gt; Lys is optionally amidated

&lt;400&gt; 19

Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys  
1 5

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

WO 01/82944

PCT/US01/13031

```
<213> Human immunodeficiency virus type 1
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys is optionally amidated

<400> 20
Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys
1           5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys is optionally amidated

<400> 21
Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys
1           5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl
```

WO 01/82944

PCT/US01/13031

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Asn is optionally amidated

&lt;400&gt; 22

Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn  
1 5

<210> 23  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Asn is optionally amidated

&lt;400&gt; 23

Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Asn  
1 5

<210> 24  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Asp is optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Asn is optionally amidated

&lt;400&gt; 24

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn  
1 5

<210> 25  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Lys can be optionally modified with a lower alkyl or alkanoyl

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa can be Gly or Ala

<400> 25

Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Gly Ser Gly Ser  
1 5 10

<210> 26  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa can be Glu or Asp

<400> 26

Asp Pro Asn Leu Xaa Pro Trp Asn  
1 5

<210> 27  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 27

Ser Gly Ser Gly  
1

<210> 28

WO 01/82944

PCT/US01/13031

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1  
<400> 28  
Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Asn  
1 5  
<210> 29  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1  
<400> 29  
Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Asn  
1 5  
<210> 30  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1  
<400> 30  
Val Asp Pro Ser Leu Asp Pro Trp Asn  
1 5  
<210> 31  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1  
<400> 31  
Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Lys  
1 5  
<210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1  
<400> 32  
Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Lys  
1 5 10  
<210> 33  
<211> 10  
<212> PRT

WO 01/82944

PCT/US01/13031

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;400&gt; 33

Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (13)..(13)

&lt;223&gt; C terminal Lys is amidated

&lt;400&gt; 34

Cys Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; biotin is attached to N-terminal Ser

&lt;400&gt; 35

Ser Gly Ser Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; Biotin is attached to Ser

&lt;400&gt; 36

WO 01/82944

PCT/US01/13031

Ser Gly Ser Gly

1

<210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa can be Glu or Asp

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa can be Lys or Asn and can be optionally amidated

&lt;400&gt; 37

Val Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa

1

5

<210> 38  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa can be Glu or Asp

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa can be Arg, Lys, Ser or Asn

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa can be Glu or Asp

WO 01/82944

PCT/US01/13031

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
<223> Xaa can be Lys or Asn and can be optionally amidated

<400> 38

Xaa Pro Val Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa  
1 5 10

<210> 39  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 39

Gly Ser Gly Ser  
1

## 【手続補正書】

【提出日】平成14年5月24日(2002.5.24)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

式

R 1 - A s p - P r o - A s n - L e u - A s p - P r o - T r p - A s n - R 2

配列番号23

式中、R 1は、水素、低級アルキル、低級アルカノイル、および低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1～約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され；そして

式中、R 2は、遊離ヒドロキシル、アミド、およびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択される、のペプチドまたはポリペプチドを含んで成る組成物。

【請求項2】

R 1がValであり、配列番号23の配列 Val - A s p - P r o - A s n - L e u - A s p - P r o - T r p - A s n を生じる請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

R 1がX<sub>2</sub> - P r o - V a lであり、ここでX<sub>2</sub>がGluおよびAspから成る群から選択され、低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された配列 X<sub>2</sub> - P r o - V a l - A s p - P r o - A s n - L e u - A s p - P r o - T r p - A s n 配列番号38を生じる請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

R<sub>2</sub>が - H i s - P r o - G l y - S e r - であり、配列 Val - A s p - P r o - A s n - L e u - A s p - P r o - T r p - A s n - H i s - P r o - G l y - S e r 配列番号16(ここで該カルボキシ末端のSerがアミドで場合により置換されている)を生じる請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

R 1 - A s p - P r o - Y<sub>7</sub> - L e u - G l u - P r o - T r p - Z<sub>1,2</sub> - R 2 配列番号8

式中、Y<sub>7</sub>は、Arg、Lys、SerおよびAsnから成る群から選択され；

式中、Z<sub>1,2</sub>は、LysおよびAsnから成る群から選択され；

式中、R 1は、水素、低級アルキル、低級アルカノイル、および低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1～約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され；

式中、R 2は、遊離ヒドロキシル、アミド、およびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択される、から成る群から選択される式のペプチドまたはポリペプチドの少なくとも2つの変異体をさらに含んで成り、そして

ここで、上記2つの変異体の少なくとも1つは、

R 1 - A s p - P r o - A r g - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - R 2 配列

番号17であり、そしてもう1つの変異体は、

R 1 - A s p - P r o - A s n - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R 2 配列

番号18である、

請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

R<sub>1</sub>がValであるペプチドをさらに含んで成る、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

R<sub>1</sub>がX<sub>2</sub>-Pro-Valであり、ここでX<sub>2</sub>は低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換されたGluおよびAspから成る群から選択されるペプチドをさらに含んで成る、請求項5に記載の組成物。

【請求項8】

R<sub>2</sub>が-His-Pro-Gly-Ser-であり、ここで該カルボキシ末端Serはアミドで場合により置換されたペプチドをさらに含んで成る、請求項5に記載の組成物。

【請求項9】

R<sub>1</sub>-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R<sub>2</sub> 配列  
番号19

R<sub>1</sub>-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R<sub>2</sub> 配列  
番号22

R<sub>1</sub>-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R<sub>2</sub> 配列  
番号20

R<sub>1</sub>-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R<sub>2</sub> 配列  
番号24および

R<sub>1</sub>-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R<sub>2</sub> 配列  
番号21

ここで、R<sub>1</sub>は、水素、低級アルキル、低級アルカノイル、および低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1~約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され；

ここで、R<sub>2</sub>は、遊離ヒドロキシル、アミド、およびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択される、

から成る群から選択される1以上のさらなる配列を含んで成る、請求項5に記載の組成物。

【請求項10】

上記アミノ酸配列の少なくとも7個をさらに含んで成る、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

上記ペプチドまたはポリペプチドが合成的に生成される、請求項1に記載の組成物。

【請求項12】

上記ペプチドまたはポリペプチドが組換え的に生成される、請求項1に記載の組成物。

【請求項13】

上記ペプチドの1以上が、キャリアータンパク質に結合した合成ペプチドとして発現する、請求項1に記載の組成物。

【請求項14】

上記ペプチドの1以上が、場合によりキャリアータンパク質に結合した多抗原性ペプチドとして発現する、請求項1に記載の組成物。

【請求項15】

1以上の選択したペプチドが場合によりキャリアータンパク質と枠内で融合した組換え的に生産されたタンパク質内で発現する、請求項1に記載の組成物。

【請求項16】

上記キャリアータンパク質が、大腸菌(*E. coli*) DnaKタンパク質、GSTタンパク質、マイコバクテリア熱ショックタンパク質70、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、ガラクトキナーゼ、ユビキチン、 $\beta$ -接合因子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびインフルエンザNS-1タンパク質から成る群から選択される、請求項13ないし15のいずれかに記載の組成物。

【請求項17】

(a)式 R<sub>1</sub>-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R<sub>2</sub> 配列番号23 (式中、R<sub>1</sub>は、水素、低級アルキル、低級アルカノイル、および低

級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1～約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され；そして式中、R2は、遊離ヒドロキシル、アミド、およびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列から成る群から選択される)のペプチドまたはポリペプチド；および

(b)式 R3 - Lys - X<sub>4,2</sub> - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys - R4 配列番号5(式中、X<sub>4,2</sub>は、GlyまたはAlaから成る群から選択され；式中、R3は、水素、低級アルキル、低級アルカノイル、および低級アルキルまたは低級アルカノイルで場合により置換された1～約5個の間のアミノ酸配列から成る群から選択され；式中、R4は、遊離ヒドロキシル、アミド、およびアミドで場合により置換された1または最高約5個のさらなるアミノ酸の配列(塩基性アミノ酸 - Lys - Arg - Arg - を除く)から成る群から選択される)の少なくとも1つのペプチドまたはポリペプチド、  
を含んで成る組成物。

【請求項18】

上記ペプチドまたはポリペプチドが合成的に生成される、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

上記ペプチドまたはポリペプチドが組換え的に生成される、請求項17に記載の組成物。

【請求項20】

上記ペプチドの1以上が、キャリアータンパク質に結合した合成ペプチドとして発現する、請求項17に記載の組成物。

【請求項21】

上記ペプチドの1以上が、場合によりキャリアータンパク質に結合した多抗原性ペプチドとして発現する、請求項17に記載の組成物。

【請求項22】

1以上の選択したペプチドがキャリアータンパク質と場合により枠内で融合した組換え的に生産されたタンパク質内で発現する、請求項17に記載の組成物。

【請求項23】

上記キャリアータンパク質が、大腸菌(*E. coli*) DnaKタンパク質、GSTタンパク質、マイコプラズマ熱ショックタンパク質70、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、ガラクトキナーゼ、ユビキチン、  
- 接合因子、  
- ガラクトシダーゼおよびインフルエンザNS-1タンパク質から成る群から選択される、請求項20、21または22に記載の組成物。

【請求項24】

請求項1ないし23のいずれかに記載の組成物、製薬学的に許容されるキャリアーおよび任意のアジュバントを含んで成る医薬組成物。

【請求項25】

個体を、種々のHIV-1株またはサブタイプに由来するHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を活発に誘導する請求項1ないし23のいずれかに記載の組成物の有効量に暴露する工程を含んで成る、抗-HIV-1 Tat抗体の誘導法。

【請求項26】

免疫不全のヒトにおいてHIV-1増殖を減じるために有用な組成物の調製法であって：

(a) 霊長類を請求項1ないし23のいずれかに記載の組成物で免疫感作し；そして

(b) 該免疫感作した哺乳動物から滅菌状態で抗体を単離し、そして精製する、ことを含んで成り、ここで該抗体は該組成物の成分を形成する上記方法。

【請求項27】

Tat免疫原に対する免疫感作により誘導される抗体の存在かつまたは力価を測定する方法であって：

(A) 免疫感作した個体に由来する生物サンプルを、固体支持体に結合した請求項1ないし23のいずれかに記載のペプチドまたはポリペプチド組成物と接触させ；

(B) 支持体を洗浄して、該生物サンプルから該配列に結合していないものすべてを排除

し；

(C) 該支持体と、検出可能な標識を結合した試薬とを接触させ、ここで該試薬は該固体支持体上の該配列と生物サンプル中の抗体との間の結合を検出し、そして該標識は検出可能なシグナルを生成する、  
ことを含んで成る上記方法。

【請求項28】

配列番号23のアミノ酸配列

- A s p - P r o - A s n - L e u - A s p - P r o - T r p - A s n - 内に位置するエピトープに特異的に結合するH I V - 1 T a tタンパク質に対する単離抗体。

【請求項29】

上記配列のアミノ末端A s pの前にV a lを有する、請求項28に記載の抗体。

【請求項30】

上記抗体が、単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、抗体フラグメントおよびそれらの混合物から成る群から選択される、請求項28または29に記載の方法。

【請求項31】

a) 配列番号23のアミノ酸配列

A s p - P r o - A s n - L e u - A s p - P r o - T r p - A s n 内に位置するエピトープに特異的に結合するH I V - 1 T a tタンパク質に対する抗体、および

b) H I V - 1 T a tタンパク質に対する少なくとも1つのさらなる抗体

を含んで成る抗体組成物であり、該抗体組成物は異なるH I V - 1株およびサブタイプに由来するH I V - 1 T a tタンパク質と反応する、上記組成物。

【請求項32】

(a)の上記アミノ酸配列が該配列のアミノ末端A s pの前にV a lを有する、請求項31に記載の組成物。

【請求項33】

上記のさらなる抗体が、H I V - 1 T a tタンパク質のエピトープの少なくとも2つの変異体に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含んで成り、該エピトープが配列番号8のアミノ酸配列 - A s p - P r o - Y<sub>7</sub> - L e u - G l u - P r o - T r p - Z<sub>12</sub> - (ここで、Y<sub>7</sub>は、A r g、L y s、S e rおよびA s nから成る群から選択され；そしてここでZ<sub>12</sub>は、L y sおよびA s nから成る群から選択される)内に位置する、請求項31に記載の組成物。

【請求項34】

配列番号8のアミノ末端A s pの前にV a lを有する、請求項33に記載の組成物。

【請求項35】

1から4種の異なる上記さらなる抗体の混合物を含んで成り、該混合物は上記配列番号8により定められるエピトープの3つの異なるY変異体に結合することができる、請求項33に記載の組成物。

【請求項36】

1から4種の異なる上記さらなる抗体の混合物を含んで成り、該混合物は上記配列番号8により定められるエピトープの4種すべての異なるY変異体に結合することができる、請求項33に記載の組成物。

【請求項37】

上記さらなる抗体が、エピトープ配列

- A s p - P r o - A r g - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - 配列番号17

に特異的に結合する抗体、およびエピトープ配列 - A s p - P r o - A s n - L e u -

G l u - P r o - T r p - A s n - 配列番号18に特異的に結合する抗体を含んで成る

、請求項33に記載の組成物。

【請求項38】

配列番号 17 または 18 のアミノ末端 Asp の前に Val を有する、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

上記さらなる抗体が

- Asp - Pro - Lys - Leu - Glu - Pro - Trp - Lys - 配列番号 19
- Asp - Pro - Lys - Leu - Glu - Pro - Trp - Asn - 配列番号 22
- Asp - Pro - Ser - Leu - Glu - Pro - Trp - Lys - 配列番号 20
- Asp - Pro - Ser - Leu - Glu - Pro - Trp - Asn - 配列番号 24

および

- Asp - Pro - Asn - Leu - Glu - Pro - Trp - Lys - 配列番号 21
- から成る群から選択される少なくとも 1 つのエピトープ配列に特異的に結合する 1 以上の抗体を含んで成る、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 40】

配列番号 19、20、21、22 および 24 のいずれかのアミノ末端 Asp の前に Val を有する、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 41】

上記さらなる抗体が、上記エピトープ配列番号 17 ~ 22 および 24 の少なくとも 7 つに結合する、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 42】

上記さらなる抗体が、配列番号 10 のアミノ酸配列

- Lys - X<sub>1</sub> - Leu - Gly - Ile - Ser - Tyr - Gly - Arg - Lys -
- (ここで該アミノ酸 X<sub>1</sub> は Gly または Ala である) 内に位置するエピトープに特異的に結合する HIV Tat - 1 タンパク質に対する抗体である、請求項 31 ないし 41 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 43】

上記組成物中の上記各抗体が、単離されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ファージディスプレイをスクリーニングすることにより生成した抗体、抗体フラグメントおよびそれらの混合物から成る群から選択される、請求項 31 ないし 42 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 44】

請求項 28 ないし 43 のいずれかに記載の抗体または抗体組成物、および製薬学的に許容されるキャリアーを含んで成る医薬組成物。

【請求項 45】

ヒトに請求項 28 ないし 43 のいずれかに記載の抗体または抗体組成物を投与する工程を含んで成る、HIV - 1 のウイルスレベルを下げる方法。

【請求項 46】

式

R1 - Asp - Pro - Asn - Leu - Asp - Pro - Trp - Asn - R2

配列番号 23

式中、R1 は、1 ~ 約 5 個の間のアミノ酸の任意の配列であり；そして

式中、R2 は、1 または最高約 5 個のさらなるアミノ酸の任意の配列である、のペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る合成遺伝子。

【請求項 47】

R1 - Asp - Pro - Y<sub>7</sub> - Leu - Glu - Pro - Trp - Z<sub>12</sub> - R2 配列番号 8

式中、Y<sub>7</sub> は、Arg、Lys、Ser および Asn から成る群から選択され；

式中、Z<sub>12</sub> は、Lys および Asn から成る群から選択され；

式中、R1 は、1 ~ 約 5 個の間のアミノ酸の任意の配列であり；

式中、R2 は、1 または最高約 5 個のさらなるアミノ酸の任意の配列である、から成る群から選択される少なくとも 1 つペプチドまたはポリペプチド；そして ここで、少なくと

も1つの上記変異体は、

R 1 - A s p - P r o - A r g - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - R 2 配列

番号17であり、そしてもう1つの上記変異体は、

R 1 - A s p - P r o - A s n - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R 2 配列

番号18である、

をコードする核酸配列をさらに含んで成る請求項46に記載の合成遺伝子。

【請求項48】

R 1 - A s p - P r o - L y s - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - R 2 配列

番号19

R 1 - A s p - P r o - L y s - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R 2 配列

番号22

R 1 - A s p - P r o - S e r - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - R 2 配列

番号20

R 1 - A s p - P r o - S e r - L e u - G l u - P r o - T r p - A s n - R 2 配列

番号24および

R 1 - A s p - P r o - A s n - L e u - G l u - P r o - T r p - L y s - R 2 配列

番号21

ここでR1は、1～約5個の間のアミノ酸の任意の配列であり；

ここでR2は、1または最高約5個のさらなるアミノ酸の任意の配列である、から成る群から選択される少なくとも1つのさらなるペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸配列をさらに含んで成る、請求項46に記載の合成遺伝子。

【請求項49】

上記アミノ酸配列の少なくとも7つをさらに含んで成る、請求項48に記載の合成遺伝子。

【請求項50】

上記ペプチドまたはポリペプチドが、キャリアタンパク質に融合されている請求項46に記載の合成遺伝子。

【請求項51】

アミノ酸配列をコードする各核酸配列がスペーサー配列により分けられている、請求項47ないし50のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項52】

請求項46ないし51のいずれか1項に記載の合成遺伝子および製薬学的に許容されるキャリアーを含んで成る医薬組成物。

【請求項53】

個体を、種々のHIV-1株またはサブタイプに由来するHIV-1 Tatタンパク質と反応する抗体を活発に誘導する請求項46ないし51のいずれかに記載の合成遺伝子の有効量に暴露する工程を含んで成る、抗-HIV-1 Tat抗体の誘導法。

【請求項54】

免疫不全のヒトにおいてHIV-1増殖を減じるために有用な組成物の調製法であって：  
(a) 霊長類を請求項46ないし51に記載の合成遺伝子で免疫感作し；そして(b) 該免疫感作した霊長類から滅菌状態で抗体を単離し、そして精製する、  
ことを含んで成り、ここで該抗体は該組成物の成分を形成する上記方法。

【請求項55】

宿主細胞中で上記合成遺伝子産物の発現を支配し、そして制御する調節核酸配列に操作可能に連結された、請求項46ないし51のいずれかに記載の合成遺伝子を含んで成る合成分子。

【請求項56】

プラスミドである請求項55に記載の分子。

【請求項57】

請求項55に記載の合成分子および製薬学的に許容されるキャリアーを含んで成る、医薬

組成物。

【請求項 58】

個体を、種々の HIV - 1 株またはサブタイプに由来する HIV - 1 Tat タンパク質と反応する抗体を活発に誘導する請求項 55 に記載の合成分子の有効量に暴露する工程を含んで成る、抗 - HIV - 1 Tat 抗体の誘導法。

【請求項 59】

免疫不全のヒトにおいて HIV - 1 増殖を減じるために有用な組成物の調製法であって：

( a ) 霊長類を請求項 55 に記載の分子で免疫感作し；そして

( b ) 該免疫感作した霊長類から滅菌状態で抗体を単離し、そして精製する、ことを含んで成り、ここで該抗体は該組成物の成分を形成する上記方法。

【請求項 60】

( a ) 請求項 1 ないし 23 のいずれかに記載のペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る第 1 合成遺伝子、該遺伝子はキャリアータンパク質に場合により融合しており；または

( b ) 宿主細胞中で上記合成遺伝子産物の発現を支配し、そして制御する調節核酸配列に操作可能に連結された ( a ) の合成遺伝子を含んで成る合成分子、を含んで成る微生物。

【請求項 61】

宿主細胞中で上記遺伝子産物の複数のコピーを発現することができる組換えウイルス ( 該ウイルスはヒトに対して非病原性である )、および宿主中で該遺伝子産物の複数のコピーを発現することができる片利共生細菌から成る群から選択される、請求項 60 に記載の微生物。

【請求項 62】

請求項 60 または 61 に記載の微生物および製薬学的に許容されるキャリアーを含んで成る医薬組成物。

【請求項 63】

個体を、種々の HIV - 1 株またはサブタイプに由来する HIV - 1 Tat タンパク質と反応する抗体を活発に誘導する請求項 60 または 61 に記載の微生物の有効量に暴露する工程を含んで成る、抗 - HIV - 1 Tat 抗体の誘導法。

【請求項 64】

免疫不全のヒトにおいて HIV - 1 増殖を減じるために有用な組成物の調製法であって：

( a ) 哺乳動物を請求項 60 または 61 に記載の微生物で免疫感作し；

( b ) 該免疫感作した哺乳動物から滅菌状態で抗体を単離し、そして精製する、ことを含んで成り、ここで該抗体は該組成物の成分を形成する上記方法。

【請求項 65】

請求項 46 ないし 51 のいずれかに記載の合成遺伝子を含む哺乳動物宿主細胞。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

【表 1】

表IV-Bクレート(294配列)

霊長類のヒト-7配列	配列番号	発生	発生率
ValAspProArgLeuGluProTrpLys	配列番号15の AA4-12	220	75
ValAspProLysLeuGluProTrpLys*	配列番号12の AA185-193	35	12
ValAspProSerLeuGluProTrpLys	配列番号12の AA120-127	20	7
ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*	配列番号12の AA55-63	7	2
		合計:282	合計:96
ValAspProArgLeuGluProTrpAsn	28	1	<1

【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. ( PCT/US01/13031
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : A61K 38/00, 38/04, 39/00, 39/12, 39/21; C07K 16/00, 17/00, 5/00, 7/00 US CL : 424/184.1, 188.1, 204.1, 208.1; 530/388.3, 324, 325, 326, 327, 328, 329 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/184.1, 188.1, 204.1, 208.1; 530/388.3, 324, 325, 326, 327, 328, 329		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/02185 A1 (THYMON L.L.C.) 21 January 1999 (21.01.1999), see claims 1-59.	1-56
Y	US 5,891,994 A (GOLDSTEIN) 06 April 1999 (06.04.1999), abstract and claims 1-35.	1-20
Y,P	US 6,193,981 B1 (GOLDSTEIN) 27 February 2001 (27.02.2001), see abstract and claims 1-55.	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 May 2001 (23.05.2001)		Date of mailing of the international search report 02 AUG 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Stacy Brown</i> Stacy Brown Telephone No. 703-308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US01/13031

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3: WEST, CAS ONLINE, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, GENESEQ, ISSUED PATENTS, PIR, SWISSPROT, SPTREMBL  
search terms: human immunodeficiency virus, hiv, tat, transcription, transactivating, gene, protein, fragment, variant, peptide, polypeptide, synthetic, recombinant, carrier protein, coupled, multiple antigenic peptide, multivalent, pharmaceutical, composition, antibodies, polyclonal, monoclonal, chimeric, humanized, human, phage, epitope, antigenic site, reduce viral load, synthetic gene, plasmid, DNA, microorganism, vector, mammalian, host cell, SEQ ID NO: 8 and variants of SEQ ID NO: 8

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/18	A 6 1 K 39/395	K 4 C 0 8 5
C 0 7 K 7/06	A 6 1 K 39/395	S 4 C 0 8 7
C 0 7 K 7/08	A 6 1 K 39/395	X 4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/00	A 6 1 K 48/00	
C 0 7 K 14/16	A 6 1 P 31/18	
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 7/08	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 14/00	
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 14/16	
C 1 2 N 1/21	C 0 7 K 16/08	
C 1 2 N 5/10	C 0 7 K 19/00	
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 1/15	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 1/19	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 1/21	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/15	Z
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA35 BA51 BA61 CA02 CA05 CA07 DA02 DA06  
EA04 FA01 GA11 HA15 HA17  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA90X AA97Y AB01 AC14 BA02 CA24  
CA45 CA46  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA08 BA18 BA23 CA53 CA56  
CA59 DA41 MA02 NA14 ZC551 ZC552  
4C085 AA13 AA14 BB11 CC03 CC23 DD61 EE01  
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 MA02 NA13 NA14 ZC55  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 BA41 BA42 BA50 CA01  
CA11 DA75 DA76 DA83 DA86 EA20 EA22 EA29 EA50 EA53  
FA20 FA50 FA71 FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004514406A5</a>	公开(公告)日	2008-06-05
申请号	JP2001579818	申请日	2001-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	西蒙有限公司		
申请(专利权)人(译)	Teimon LLC		
[标]发明人	ゴールドスタインギデオ		
发明人	ゴールドスタイン,ギデオ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K35/76 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/18 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/16 C07K16/08 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 A61K38/00 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/005 A61K38/08 A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/6037 A61K2039/6043 C07K7/06 C07K16/1045 C07K16/1072 C07K2317/21 C07K2317/34 C12N2740/16322 G01N33/56988 G01N2333/163 G01N2469/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/76 A61K39/395.B A61K39/395.D A61K39/395.J A61K39/395.K A61K39/395.S A61K39/395.X A61K48/00 A61P31/18 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/16 C07K16/08 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA35 4B024/BA51 4B024/BA61 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/GA11 4B024/HA15 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA97Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/DA41 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZC551 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC23 4C085/DD61 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BC83 4C087/MA02 4C087/NA13 4C087/NA14 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/BA41 4H045/BA42 4H045/BA50 4H045/CA01 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/EA53 4H045/FA20 4H045/FA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	09/561366 2000-04-28 US		
其他公开文献	JP2004514406A JP4282934B2		

#### 摘要(译)

在B和非B进化枝中均诱导针对大多数(例如,大于95%) HIV-1 Tat蛋白变异体的抗体的分子式为: R1-Asp-Pro-Y7- 它包含Leu-X9-Pro-Trp-Z12-R2的肽或多肽的至少两个变体[SEQ ID NO: 8]。根据此公式, Y7为Arg, Lys, Ser或Asn; X9为Glu或Asp; Z12为Lys或Asn; R1为氢, 氢, 低级烷基, 在1至约5个氨基酸之间, 任选地被低级烷酰基或低级烷基或低级烷酰基取代; 并且R2是1或至多约5个, 任选地被游离羟基, 酰胺或酰胺取代。一系列其他氨基酸。在该组成中, 两个变体中的至少一个在Y7处含有Arg, 在Z12处的Lys, 并且两个变体Y7中的至少第二个是Asn。是的, 并且Z12是Asn。疫苗和药物组合物可包含多种抗原肽或与载体蛋白相关的一种或多种这样的肽, 作为重组蛋白之一。向该组合中添加任何其他免疫原可用于诱导与HIV-1 Tat蛋白的许多菌株和变体交叉反应的灵长类动物抗Tat抗体。疫苗和药物组合物可包括由肽组合物引发的灵长类动物抗体, 用于被动治疗。诊断组合物和用途描述了对接种个体的免疫状态的评估。

