

(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2012-502031

(P2012-502031A)

(43) 公表日 平成24年1月26日(2012.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-526056 (P2011-526056)	(71) 出願人	511043965 デューク ユニバーシティー DUKE UNIVERSITY アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7708-0083, ダーラム, ピー. オ ー. ボックス 90083
(86) (22) 出願日	平成21年9月8日 (2009.9.8)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月6日 (2011.5.6)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/005024	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開番号	W02010/027502	(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行
(87) 国際公開日	平成22年3月11日 (2010.3.11)		
(31) 優先権主張番号	61/136,448		
(32) 優先日	平成20年9月5日 (2008.9.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/136,734		
(32) 優先日	平成20年9月29日 (2008.9.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ウイルス免疫応答を誘導する方法

(57) 【要約】

本発明は、抗ウイルス免疫応答を誘導する方法に関する。該方法は、細胞表面ターゲットに結合した際に、ウイルス感染を阻害するケモカインの産生を生じる抗体の産生を誘導する抗原を、その必要がある患者に投与する工程を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H I V - 1 の C C R 5 向性株による、ヒト被験体の感受性細胞の感染を阻害する方法であって、前記被験体の細胞に結合する抗体の産生を誘導する免疫原を、前記被験体に投与する工程を含み、前記細胞が：

i) C C R 5 結合性ケモカインを産生し、そして

i i) その細胞表面上に該抗体によって認識される抗原を有し、

前記免疫原を、単独でまたは H I V - 1 の前記 C C R 5 向性株の存在下のいずれかで、産生される C C R 5 結合性ケモカインのレベルが前記感受性細胞感染の前記阻害を達成するのに十分であるような量および条件下で、投与する

10

前記方法。

【請求項 2】

前記被験体の前記感受性細胞が T 細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

C C R 5 結合性ケモカインを産生する前記被験体の前記細胞が、単球、マクロファージまたは樹状細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記抗原が細胞脂質二重層の表面脂質である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記抗原がホスファチジルセリン (P S) またはホスファチジルエタノールアミン (P E) である、請求項 4 記載の方法。

20

【請求項 6】

前記免疫原が陰イオン性脂質を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記陰イオン性脂質が、P S、P E、カルジオリピン (C L)、1, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン (D O P E)、または死菌梅毒トレポネーマ (T r e p o n e m a p a l l i d u m) である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫原が、P S、P E または C L を含むリボソームを含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】

モノホスホリル脂質 A、T o l l 様受容体 (T L R) - 7 または T L R - 9 を含むアジュバントを前記被験体に投与する工程をさらに含む、請求項 6 記載の方法。

30

【請求項 10】

前記免疫原が P S または P E の六方晶 I I 型である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

前記抗原が C D 4 0 である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記免疫原が遊離または誘導体化ヒトまたはアカゲザル (r h e s u s) C D 4 0 である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記 C D 4 0 が破傷風毒素またはキーホールリンペット (k e y h o l e l i m p e t) ・ヘモシアニンで誘導体化されている、請求項 12 記載の方法。

40

【請求項 14】

前記免疫原が、アカゲザル、モルモット (g u i n e a p i g) もしくはマウス C D 4 0 またはその突然変異型、あるいはアカゲザル、モルモットもしくはマウス C D 4 0 またはその突然変異型をコードする核酸配列を含み、そして C D 4 0 に結合するが、C D 4 0 上の C D 4 0 リガンド結合部位には結合しない、抗 C D 4 0 抗体の誘導を生じる、請求項 11 記載の方法。

【請求項 15】

前記免疫原が、アカゲザル、モルモットもしくはマウス C D 4 0 またはその突然変異型

50

をコードする核酸配列を含む、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記核酸配列が、機能可能であるようにプロモーターに連結されて、ベクター中に存在する、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】

前記抗体が非病原性である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 8】

H I V - 1 によるヒト被験体感受性細胞の感染を阻害する方法であって、前記被験体に、m 4 3 型または m 9 型抗体の産生を誘導する免疫原を投与する工程を含み、前記免疫原を、抗 H I V ケモカインが産生され、そしてそれによって感染の前記阻害が達成されるような量および条件下で投与する、前記方法。

10

【請求項 1 9】

H I V - 1 の C X C R 4 を利用する株によるヒト被験体感受性細胞の感染を阻害する方法であって、前記被験体に、ターゲット細胞から S D F - 1 の放出を生じる抗体の産生を誘導する免疫原を投与する工程を含み、前記免疫原を、前記阻害が達成されるような量および条件下で投与する、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、その全内容が本明細書に援用される、2 0 0 8 年 9 月 5 日出願の米国仮出願第 6 1 / 1 3 6 , 4 4 8 号、および 2 0 0 8 年 9 月 2 9 日出願の米国仮出願第 6 1 / 1 3 6 , 7 3 4 号の優先権を請求する。

20

【0 0 0 2】

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号第 U O 1 A I 0 6 7 8 5 4 号のもとに米国政府の援助を受けて作成された。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0 0 0 3】

技術分野

本発明は、抗ウイルス免疫応答を誘導する方法に関する。該方法は、細胞表面ターゲットに結合した際に、ウイルス感染を阻害するサイトカイン（例えばケモカイン）の産生を生じる抗体の産生を誘導する免疫原を、その必要がある患者に投与する工程を含む。

30

【背景技術】

【0 0 0 4】

H I V および他のウイルスワクチン開発（例えば C 型肝炎ワクチン開発）の大きな課題は、迅速な抗ウイルス免疫応答を誘導する必要があることである（Gasper - Smithら, J. Virol. 82: 7700 - 7710 (2008)）。自然免疫応答は、その特質の 1 つとして、病原体感染後の迅速な免疫応答誘導を有する。感染病原体に対する自然免疫応答は、数時間から数日で生じうる。しかし、自然免疫は、免疫記憶を欠き、そしてしたがって、応答の加速または増進のため、病原体またはワクチンによってプライミングされえない（Haynesら, Introduction to the Immune System "Harrisons Principles of Internal Medicine" 中, 第 308 章: 第 17 版, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo (監修), McGraw Hill, ニューヨーク (2008)）。対照的に、適応または獲得免疫系は、B 細胞受容体 (BCR) および T 細胞受容体 (TCR) 再編成遺伝子による免疫記憶能を有する（Haynesら, Introduction to the Immune System "Harrisons Principles of Internal Medicine" 中, 第 308 章: 第 17 版, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo (監修), McGraw Hill, ニューヨーク (2008)）。しかし、適

40

50

応免疫応答は、生じるのに数日から数週間かかりうる。免疫系の適応TおよびB細胞アームは、特定の病原体に対して抗原特異的応答を作製しうる。自然免疫系は、抗原受容体再編成遺伝子を持たないため、所定の病原体に非常に特異的な応答を生じえない。

【0005】

伝統的なワクチン（はしか、流行性耳下腺炎および風疹ワクチンなど）は、予防的ワクチンとしての成功のため、記憶適応TおよびB細胞応答の誘導に頼る（Plotkin, Clin. Infect. Dis. 47:401-409 (2008)）。これらの成功したワクチンが防御する病原体に関しては、こうした生物が比較的緩慢に発生し、そしてその遺伝物質を宿主ゲノム内に挿入して、免疫系から防御される病原体リザーバーを形成することがないため、迅速な記憶応答（例えば数時間以内）の必要がない。

10

【0006】

HIV-1は、「暗黒」期、すなわち伝染から、血漿中にウイルスが出現するまでの期間が非常に短い（Gasper-Smithら, J. Virol. 82:7700-7710 (2008)）。さらに、HIV-1は、おそらく感染の最初の週以内に、感染CD4 T細胞の潜在性プールを確立し、こうした潜在性ウイルスプールは、免疫系には不可視である（Shenら, Allerg. & Clin. Immunol. 122:22-28 (2008)）。

【0007】

HIV-1は、共受容体としてケモカイン受容体を、最も一般的には、伝染したウイルスによってCCR5（Keeleら, Proc. Natl. Acad. Sci. 105:7552-7557 (2008)）を、または慢性ウイルスによってCXCR4（Kinterら, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:14076-14081 (1996)、Rubbertら, AIDS Res. Hum. Retrovirology 13:63-69 (1997)、Kinterら, Immunol. Rev. 177:88-98 (2000)）を利用する。CCR5のリガンドは、ケモカインであるマクロファージ炎症タンパク質-1（MIP-1）、MIP-1およびRANTESである（Kinterら, Immunol. Rev. 177:88-98 (2000)）。これらのケモカインは、存在し、そしてCD8+ T細胞または単球（あるいは組織マクロファージ、樹状細胞などの骨髄系譜の他の細胞、または限定されるわけではないが上皮細胞などの非骨髄系譜の細胞）によって産生された際、CCR5を利用するHIV株の感染性に顕著な遮断効果を有しうる（Kinterら, Immunol. Rev. 177:88-98 (2000)）。同様に、SDF-1は、CXCR4のリガンドであり、そしてCXCR4を利用するHIV株を阻害可能である（Kinterら, Immunol. Rev. 177:88-98 (2000)）。

20

30

【0008】

CD40とCD40リガンドが連結されると、IL-8、MIP-1、MIP-1およびRANTESなどのケモカインの産生、ならびにTNF- α 、インターロイキン（IL）-12、IL-1、IL-10、およびIL-15などのサイトカインの産生が誘導される（Banchemereauら, Annu. Rev. Immunol. 12:881-922 (1994)、Chessら, Therapeutic Immunology 第2版, 441-456ページ (2001)、Brodeurら, Immunity 18:837-848 (2003)、di Marzioら, Cytokine 12:1489-1495 (2000)、Chougnetら, J. Immunol. 163:1666-1673 (1999)）。CD40およびその同族（cognate）リガンド、CD40L（CD154）の間の相互作用は、生産的免疫応答に非常に重要である（Ellmarkら, AIDS Res. Hum. Retrovirology 24:367-373 (2008)、Abaynehら, AIDS Res. Hum. Retrovirology 24:447-452 (2008)、Munchら, Cell 129:263-275 (2007)）。c4b結合性タンバ

40

50

ク質などの他の分子もまた、CD40に結合する(Schonbeckら, Cell Mol. Life Sci. 58:4-43(2001))。単球、マクロファージおよび樹状細胞上のCD40は、T細胞上のCD40リガンドに結合し、そしてこの相互作用は、T細胞抗原認識の仲介、T細胞ヘルプの誘導、およびB細胞免疫グロブリン・クラススイッチングの誘導において、中心的である。CD40分子またはCD40リガンド分子のいずれかに突然変異を有するヒトは、免疫グロブリンをクラススイッチ不能であり、これは高IgM症候群と呼ばれる(Kienerら, J. Immunol. 155:4917-4925(1995))。

【0009】

Elm arkおよび同僚らは、HIV非感染被験体由来のファージディスプレイライブラリーから、一連の抗CD40抗体を単離してきている(Elm arkら, AIDS Res. Hum. Retrovirol. 24:367-373(2008))。彼らは、これらのヒトCD40抗体の1つ、B44が、B細胞および単球を誘発してケモカインを作製させることも可能であり、そしてB細胞分裂を活性化可能であることを示してきている。B44モノクローナル抗体(mAb)は、正常T細胞-抗原提示細胞相互作用の仲介に向かう、同族CD40-CD40リガンド相互作用に干渉しない(Elm arkら, AIDS Res. Hum. Retrovirol. 24:367-373(2008))。Elm arkおよび同僚らはまた、CD40 mAb、B44が、MonoMac単球細胞株のHIV感染性を阻害することもまた示してきている。さらに、Abaynehらは、MonoMac細胞感染のCD40 mAb B44による阻害の機構が、CCR5向性ウイルスを阻害する細胞株からのケモカイン誘導によることを示してきている(Elm arkら, AIDS Res. Hum. Retrovirol. 24:367-373(2008)、Abaynehら, AIDS Res. Hum. Retrovirol. 24:447-452(2008))。したがって、この研究によって、限定されるわけではないが、単球、マクロファージ、樹状細胞およびB細胞を含む多様な細胞種上のCD40は、該分子に抗体が連結された際、CCR5結合性ケモカイン(MIP-1、MIP-1、およびRantes)の誘導を誘発可能であることが示される。Elm arkらは、B44 mAbが活性HIV-1感染を治療するのに適した療法抗体でありうると提唱してきている(Elm arkら, AIDS Res. Hum. Retrovirol. 24:367-373(2008))。

【0010】

本発明は、ウイルス伝染および曝露に対する応答が、ウイルス感染の数時間以内に起こるように、自然抗ウイルス免疫応答において、記憶を誘導しうるワクチンを提供する(Haynesら, J. Allerg. & Clin. Immunol. 122:3-9(2008)、Gasper-Smithら, J. Virol. 82:7700-7710(2008))。現在最も成功しているワクチンにおいて、アジュバントが自然免疫系を誘発して、適応免疫系を補充し、成熟まで数週間かかる抗ウイルス免疫応答を生じる；ワクチン接種された被験体が感染性病原体に曝露されると、生じるまで数日から数週間かかる、より迅速な適応(TおよびB細胞)応答が起こる。提唱されるHIV-1ワクチンは、大部分、この同じ戦略に基づいて設計されてきており、そしてしたがって有効性のために、自然免疫応答、そして次いで適応免疫応答の連続活性化を必要とする。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Gasper-Smithら, J. Virol. 82:7700-7710(2008)

【非特許文献2】Haynesら, Introduction to the Immune System "Harrisons Principles of Internal Medicine"中, 第308章:第17版, Fauci, Kasp

10

20

30

40

50

er, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo (監修)
 , McGraw Hill, ニューヨーク (2008)

【非特許文献3】Plotkin, Clin. Infect. Dis. 47:401-409 (2008)

【非特許文献4】Shenb, Aller. & Clin. Immunol. 122:22-28 (2008)

【非特許文献5】Keeleb, Proc. Natl. Acad. Sci. 105:7552-7557 (2008)

【非特許文献6】Kinterb, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:14076-14081 (1996)

【非特許文献7】Rubbertb, AIDS Res. Hum. Retrovirology 13:63-69 (1997)

【非特許文献8】Kinterb, Immunol. Rev. 177:88-98 (2000)

【非特許文献9】Banchemereau, Annu. Rev. Immunol. 12:881-922 (1994)

【非特許文献10】Chessb, Therapeutic Immunology 第2版, 441-456ページ (2001)

【非特許文献11】Brodeurb, Immunity 18:837-848 (2003)

【非特許文献12】di Marziob, Cytokine 12:1489-1495 (2000)

【非特許文献13】Chougnetb, J. Immunol. 163:1666-1673 (1999)

【非特許文献14】Ellmarkb, AIDS Res. Hum. Retrovirology 24:367-373 (2008)

【非特許文献15】Abaynehb, AIDS Res. Hum. Retrovirology 24:447-452 (2008)

【非特許文献16】Munchb, Cell 129:263-275 (2007)

【非特許文献17】Schonbeckb, Cell Mol. Life Sci. 58:4-43 (2001)

【非特許文献18】Kienerb, J. Immunol. 155:4917-4925 (1995)

【非特許文献19】Haynesb, J. Aller. & Clin. Immunol. 122:3-9 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、大規模な免疫系機能不全を迅速に誘導する、迅速作用感染（例えばHIV-1）のための新規ワクチン開発戦略が、あらかじめ存在する適応B応答の存在を有することであり、この応答を、HIV-1伝染ウイルスが、伝染ウイルスと宿主接触の際に直ちに拡大し、その後、抗体が直ちにそして頑強な自然免疫応答を補充するという認識に基づく。本発明は、抗体応答における免疫記憶を用いた、特定の自己分子（例えばCD40分子または細胞表面脂質）に対する抗体の誘導を利用し、そしてワクチンが誘導する免疫応答のエフェクターアームとして、自然抗ウイルスサイトカイン（例えばMIP-1、MIP-1 およびRANTESなどのケモカイン）の誘導を有し、すなわち現在のワクチンのちょうど逆である。緩慢な適応（免疫含有）B細胞応答（ウイルス感染前にワクチンによって誘導されるもの）と、ウイルス（例えばHIV-1）感染後にブーストされる迅速な自然サイトカイン応答の、このユニークな連結によって、非病原性宿主抗体応答は、自然抗ウイルス応答と相乗作用して、防御抗ウイルスサイトカイン応答を誘発可能である

10

20

30

40

50

。したがって、事実上、本明細書に開示するアプローチは、H I V - 1による感染の数時間以内に、ワクチンがプライミングする抗H I V - 1応答のための「自然記憶」誘導を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、一般的に、迅速な抗ウイルス免疫応答を誘導する方法を含む、新規抗ウイルス（例えば抗H I V - 1）ワクチン戦略に関する。より具体的には、本発明は、細胞表面ターゲットに結合した際に、ウイルス感染を阻害するのに十分な量のサイトカイン（例えばケモカイン）の産生および放出を生じる宿主抗体の産生を誘導する免疫原を、その必要がある患者に投与する工程を含む、抗ウイルス免疫応答を誘導する方法に関する。

10

【0014】

本発明の目的および利点は、以下の説明から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】H I V - 1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP B M Cにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果。

【図1 - 1】H I V - 1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP B M Cにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果。

【図1 - 2】H I V - 1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP B M Cにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果。

20

【図1 - 3】H I V - 1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP B M Cにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果。

【図1 - 4】H I V - 1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP B M Cにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果。

【図1 - 5】H I V - 1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP B M Cにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果。

【図2】アッセイしたH I V - 1阻害活性。ウイルスまたは細胞いずれかとm A bのプレインキュベーション。

【図3】P 1、I S 4およびC L 1のH I V - 1阻害活性は、カルジオリピンおよびD O P Eなどの脂質によって阻害される。

30

【図4】アカゲザル（r h e s u s）、マウスおよびヒトC D 4 0の配列比較。下線のアミノ酸は、C D 4 0 Lの塩基性アミノ酸と相互作用するヒトC D 4 0の酸性アミノ酸（C D 8 4、E 1 1 4およびE 1 1 7）である。

【図5】抗C D 4 0抗体を誘導するための免疫原設計。

【図6】抗ケモカイン抗体によるC L 1 H I V - 1阻害活性の遮断。

【図7】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 1】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 2】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

40

【図7 - 3】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 4】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 5】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 6】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 7】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5伝染ウイルスに対する

50

る自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 33】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5 伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 34】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5 伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 35】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5 伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【図7 - 36】H I V - 1感染性の抗脂質抗体阻害の作用機構：R 5 伝染ウイルスに対する自然記憶応答のH I V - 1ワクチン誘導のための新規戦略。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、少なくとも部分的に、特定のB細胞抗体が、ウイルス（例えばH I V - 1）の存在下で、高レベルのサイトカイン（例えばケモカイン）を作製する能力を自然免疫系に与えるという認識から生じる。本発明のワクチン接種法は、単独でそしてウイルス（例えばH I V - 1）の存在下の両方で、迅速な自然抗ウイルス免疫応答を誘導する抗体の産生を、特定の免疫原が誘導する能力を利用する。さらに、ウイルス（例えばH I V - 1）での感染は、この抗ウイルス効果を持つ抗脂質抗体を誘導し、したがって、自然ケモカイン誘発抗体応答のためのブースター効果を提供することも可能である。本発明は、適応B細胞免疫応答の記憶を用いて、迅速な抗ウイルス自然サイトカイン（例えばケモカイン）応答を誘発することも可能である。本発明にしたがって、特定の自己分子は、誘導された抗体が結合した際に、特に病原体の存在下で、抗ウイルス自然物質（例えばケモカイン）を誘発可能であり、そしてさらに、病原体はまた、抗脂質抗体のブーストを誘導可能である。

【0017】

本発明は、1つの態様において、H I V - 1のC C R 5 向性株による被験体の感受性細胞（例えばT細胞）の感染を阻害する方法に関する。該方法は被験体細胞に結合する抗体の産生を誘導する免疫原を、被験体に投与する工程を含み、該細胞は：i) C C R 5 結合性ケモカインを産生し、そしてii) その表面上に該抗体によって認識される抗原を有する。細胞表面抗原に抗体が結合すると、こうした細胞によるC C R 5 結合性ケモカインの産生が誘導される。H I V - 1のC C R 5 向性株の存在下または非存在下で、産生されるケモカインのレベルは、被験体のT細胞の感染を阻害するのに十分である。したがって、本発明にしたがって、C C R 5 結合性ケモカインの産生および放出を誘導する抗体を用いて、記憶（免疫原投与によってプライミングされる抗体応答由来）を伴う、抗H I V 自然（ケモカイン）応答を誘導することも可能である。

【0018】

適切な細胞表面ターゲット抗原には、抗体が結合した際に、C C R 5 結合性ケモカイン産生を誘発する能力を有する、単球、マクロファージまたは樹状細胞表面上の（あるいはC C R 5 結合性ケモカインを産生可能な、上皮細胞などの任意の他の細胞表面上の）任意の分子が含まれる。好ましいターゲットには、細胞脂質二重層の表面脂質、例えばホスファチジルセリン（P S）およびホスファチジルエタノールアミン（P E）が含まれる。

【0019】

望ましい抗脂質抗体を誘導可能な免疫原の適切な型には、モノホスホリル脂質A、T L R - 7またはT L R - 9含有アジュバント中でアジュバント化されたP SおよびP E含有リポソームが含まれる（例えば、P C T / U S 2 0 0 8 / 0 0 4 7 0 9を参照されたい）。P SまたはP Eの六方晶I I型などのさらなる多形型の脂質もまた用いてもよい（R a u c hら, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 8 7 : 4 1 1 2 - 4 1 1 4 (1 9 9 0)）。やはり、抗脂質抗体を誘導する際に使用するのに適しているのは、死菌梅毒スピロヘータである（W o n g r a , B . J . V e n e r . D i s . 5 9 : 2 2 0 - 2 2 4 (1 9 8 3)、J o n e s ら, B r . J . V e n e r . D i s . 5 2 : 9 - 1 7 (1 9 7 6)）。誘導される抗体が非病原性であることが好ましいこ

10

20

30

40

50

とが認識されるであろう。抗脂質抗体の病原性に関する基準には、脂質に結合するための補因子として - 2 糖タンパク質 1 分子に依存すること、およびマウスのピンチした (*p i n c h e d*) 耳垂において血栓症を引き起こす能力が含まれる (*Z h a o* ら, *A r t h . R h e u .* 42 : 2132 - 2138 (1999))。したがって、好ましい抗脂質抗体の特性には： - 2 糖タンパク質 1 に結合しないこと、および生理学的濃度で抗体を産生する宿主において血栓症を起こさないことが含まれる。 *A l v i n g* らは、多様な脂質を用いて、多様な抗脂質抗体を誘導してきており (*S c h u s t e r* ら, *J . I m m u n o l .* 122 : 900 - 905 (1979)) ; 梅毒および他の感染性疾患で作製される抗脂質抗体を含めて、大部分は非病原性である (*A l v i n g* , *J . L i p . R e s .* 16 : 157 - 166 (2006))。

10

【 0 0 2 0 】

本発明で使用するのに適した免疫原には、CL、PS、DOPE および PE などの非常に精製された陰イオン性脂質、ならびに例えば *A v a n t i P o l a r L i p i d s* 由来の他の脂質または VDR L 抗原 (例えば *L e e L a b o r a t o r i e s* 由来のもの) または死菌梅毒トレポネーマ (例えば *L e e L a b o r a t o r i e s* 由来のもの) が含まれる。

【 0 0 2 1 】

抗脂質抗体を誘導する免疫原を、筋内 (*I M*)、皮下または静脈内 (*I V*) 投与してもよい。ヒト被験体で使用するのに適した最適免疫原用量は、当業者によって容易に決定可能であり、そして例えば免疫原および被験体に依りて多様でありうる。免疫原用量は、例えば、約 100 μ g の精製脂質、約 10^5 ~ 約 10^6 の死菌梅毒トレポネーマ生物、約 100 μ g の VDR L 脂質、または約 200 μ g の CL および / または PS リポソームであってもよい。粘膜部位で抗脂質抗体を誘導するため、コレラ毒素 (*C T*) または *C T* の不活性化型または別の粘膜アジュバント、例えば *I L - 1* (*U S P* 7, 041, 294 および 6, 270, 758) を用いて、粘膜経路によって、免疫原を投与してもよい。再び、ヒトで使用するのに適した最適用量は、当業者によって容易に決定可能である。用量範囲の例には、鼻内 (*I N*) の 10 ~ 100 μ g *I L - 1*、および 5 ~ 25 μ g の不活性化 *C T I N* が含まれる。

20

【 0 0 2 2 】

さらなる好ましい細胞表面ターゲット抗原は、CD40 分子である。CD40 は、腫瘍壊死因子 (*T N F*) 受容体スーパーファミリーのメンバーである。該分子は、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞 (*D C*)、角化細胞、内皮細胞、胸腺上皮細胞、線維芽細胞、および腫瘍細胞などの非常に多様な細胞によって発現される。

30

【 0 0 2 3 】

抗 CD40 抗体を誘導可能な適切な免疫原には、遊離または誘導体化ヒト CD40 (破傷風毒素またはキーホールリンペット (*k e y h o l e l i m p e t*) ・ヘモシアニンなどのキャリアーによって誘導体化される) あるいはヒト CD40 に類似であるが同一でなく、そしてしたがって、ヒト患者において、抗 CD40 抗体を誘導するために最適に認識される、遊離または誘導体化アカゲザル CD40 または他の種の CD40 が含まれる。適切な免疫原には、ヒトに免疫された場合、CD40 上の CD40 リガンド結合部位でなく、CD40 上の他の部位に結合して、CD40 + 細胞から R5 ケモカイン放出を誘発する、抗 CD40 抗体を作製する、アカゲザル、モルモット (*g u i n e a p i g*) またはマウス CD40 由来の、組換えタンパク質または DNA が含まれる。ヒト、マウスおよびアカゲザル CD40 分子の配列整列を図 4 に示す。ヒト CD40 の D84 位、E114 位および E117 位の酸性アミノ酸は、CD40L の塩基性アミノ酸と相互作用することが決定されてきている (*S i n g h* ら, *P r o t e i n S c i e n c e* 7 : 1124 - 1135 (1998))。アカゲザルの CD40L 界面領域 (D84、E114 および E117) 中のアミノ酸は、ヒト CD40 中のものと同一であり (図 4)、一方、界面のスパン領域 (アミノ酸 81 位 ~ 114 位) 中の 2 つのアミノ酸のみ (109 位および 112 位のアミノ酸) が、アカゲザルおよびヒト CD40 タンパク質間で異なる (図 5)。

40

50

界面の対応するスパン領域中のアミノ酸は、マウスCD40およびヒトCD40間で実質的に異なる(図4および5)。CD40へのCD40Lの結合は、CD40の全体の生理学的機能に対して非常に重要であり、そしてCD40Lの結合部位領域に結合する抗体の誘導は好ましくないため、2つの突然変異体マウスCD40構築物および1つの突然変異体アカゲザルCD40構築物が、ヒトCD40により近いかまたは同一であるCD40L界面領域を反映するように設計されてきている(図5)。

【0024】

抗CD40抗体を誘導するために用いられる免疫原は、図5に記載するものなどのタンパク質であってもよい。あるいは、免疫原は、こうしたタンパク質をコードする核酸(例えばDNA)であってもよい。裸のDNAとして核酸を投与してもよいし、または核酸はベクター中に存在してもよい。本発明には、タンパク質およびコード配列、ならびにコード配列およびベクターを含む構築物、ならびにこうした配列および構築物を用いて、被験体(ヒト)において抗体を誘導する方法が含まれる。適切なベクターには、BCGまたは他の組換えマイコバクテリア、組換えボックスウイルスベクター、例えばNYVAC、組換えアデノウイルスベクター、またはフラビウイルスベクター、例えば黄熱病ワクチンが含まれる。機能可能であるように核酸をプロモーターに連結してもよい。タンパク質またはコード核酸を、例えばIMまたは皮下投与してもよい。ヒトで使用するのに適した最適用量は、当業者によって容易に決定可能である。用量範囲の例には、 $rAd = 約10^8 pfu \sim 約10^9 pfu$ 、タンパク質 = 約100 ~ 200 μg / 用量 IM、DNA = 約1 ~ 5 mgのDNAが含まれる。また、タンパク質またはコード配列を粘膜経路を介して投与してもよい。後者の場合、タンパク質またはコード核酸を、コレラ毒素またはCTの弱毒化型またはIL-1などの別の粘膜アジュバント(USP 6, 270, 758または7, 041, 294)とともに投与してもよい。再び、ヒトで使用するのに適した最適用量は、当業者によって容易に決定可能である。用量範囲の例には、10 ~ 100 μg IL-1鼻内(IN)、および5 ~ 25 μg の不活性化CT INが含まれる。

10

20

【0025】

本発明は、宿主細胞表面ターゲット(例えば脂質およびCD40)に特異的な抗体の産生に関して詳細に上述されている。しかし、本発明には、ターゲット分子への結合に際して、抗HIVケモカイン応答を誘発する抗体の産生を生じる、任意の免疫原の投与が含まれる。例えば、使用に適しているのは、ピリオン上の分子に結合する抗体の産生を誘導する免疫原、またはピリオン上の分子および宿主細胞表面上の分子に結合する抗体の産生を誘導する免疫原であり、この場合、ターゲット分子にこうした抗体が結合すると、伝染時間から数日以内に抗HIVケモカインが誘導される。こうした適切な免疫原の例には、m43型またはm9型抗体(すなわち、m43またはm9の特異性を有する抗体)の産生を生じるものが含まれる(Choudhryら, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 348: 1107 - 1115 (2006)、Zhangら, *Current Pharm. Design.* 13: 203 - 212 (2007))。(WO 2006/050219もまた参照されたい)。

30

【0026】

本方法にしたがって産生される抗体(例えば抗脂質抗体)は、療法レベルのケモカインを誘導可能である。HIV-1ピリオンの存在下で、抗体は、より多くのCCR5結合性ケモカイン(例えば*in vitro*で20,000 pg/ml を超える)を誘導可能である。これは、戦略の成功および安全性に関して重要である。HIV-1を加えた抗体の存在下で最高レベルのケモカインが生じることによって、自然免疫系には通常は存在しない、応答に対する抗原特異性が与えられる。

40

【0027】

本発明は、CCR5向性HIV-1感染に関して詳細に記載されてきているが、本開示を読むと、CXCR4を利用するHIV-1株に関する類似の戦略を採用可能であることが認識されるであろう。CXCR4株の場合、投与される免疫原は、ターゲット細胞からのSDF-1の放出を誘発する抗体の産生を誘導するように設計されたものであって

50

もよい。同様に、本戦略は、B型およびC型肝炎感染に関して採用可能である。ここで、投与される免疫原は、 α -インターフェロンまたは他の防御サイトカインの産生を誘導するものであってもよい。

【0028】

ケモカインは、抗体を設計して誘導可能な抗ウイルス分子の唯一の種類ではない。 α -1抗トリプシンのVIRIP断片(Zhuら, *British Journal of Haematology* 105:102-109(1999))、可溶性アミロイドA、および α -ディフェンシンなどの自然系小分子はすべて、抗ウイルス(例えば抗HIV)活性を有し、そしてCCR5結合性ケモカインの誘導と類似の方式でこれらの分子を誘導すると、HIV感染の防止または治療に対して、有益な効果があることが予想される。

10

【0029】

さらなる態様において、本発明は、上述のような免疫原およびキャリアーを含む組成物(例えば薬学的組成物)に関する。適切なキャリアーには、例えば、無菌生理食塩水または緩衝液が含まれる。組成物は、例えば粘膜表面への注射または局所適用に適した型であってもよい。

【0030】

本発明の特定の側面は、以下の限定されない実施例により詳細に記載されうる(Linら, *Arth. Rheu.* 56:1638-1647(2007)、Zhuら, *Br. J. Haem.* 105:102-109(1999)、Linら, *Arth. Rheu.* 56:1638-1647(2007)、2008年9月5日出願の米国仮出願61/136,448もまた参照されたい)。

20

【実施例】

【0031】

実施例1

以前、自己免疫疾患を有する被験体で、HIV-1感染の発症率がより低い理由は、自己免疫疾患被験体における寛容の欠陥に関連すると仮定されてきていた。さらに、これらの欠陥は、HIV-1によるヒト細胞感染を防止可能な、特定の種類の抗体の産生を導きうると仮定されてきていた(Haynesら, *Human Antibodies* 14:59-67(2005)、Haynesら, *Science* 308:1906(2005))。全身性エリテマトーデス(mAb CL1)および抗リン脂質症候群(P1およびIS4)などの自己免疫疾患を有するヒトに由来する抗脂質抗体の研究で、これらの抗体が、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)アッセイにおいて、HIV-1感染を防止する(Buresら, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:2019-2035(2000)、Montefioriら, *J. Virol.* 72:1886-1893(1998)、Montefioriら, *J. Infect. Dis.* 173:60-67(1996))(表1)が、CD4、CCR5およびCXCR4トランスフェクション上皮細胞TZMBL偽ウイルスアッセイにおいては防止しないことが見出されてきている(Weiら, *Nature* 422:307-312(2003)、Derdeynら, *J. Virol.* 74:8358-8367(2000)、Liら, *J. Virol.* 79:10108-10125(2005)、Montefiori, *DC pp.* 12.11.1-12.11.15, *Current Protocols in Immunology*中(2004))(表2)(PCT/US2008/004709を参照されたい)。

30

40

【0032】

PBMCアッセイにおいて、脂質抗体は、HIVのCCR5を利用する株のみを中和し、CXCR4を利用する株は中和しないことが見出されている(表3)。したがって、これらの抗脂質抗体を誘導可能であれば、これらは、HIV-1に対して防御性でありうる(PCT/US2008/004709を参照されたい)。

【0033】

50

現在、単離 C D 4 + T 細胞 (H I V - 1 で感染可能であるが) の H I V - 1 感染性は、 C L 1、 P 1 または I S 4 m A b によっては防止不能であり、むしろこれらの抗体は、末梢血単球が存在する場合にのみ、 H I V - 1 感染を防止可能であることが見出されてきている (表 4)。 C C R 5 を利用する H I V 株の感染を防止可能であるが、 C X C R 4 を利用する H I V 株の感染を防止不能な、ケモカイン産生に対する C L 1、 P 1 および I S 4 の効果の研究によって：

1 . P 1、 C L 1 および I S 4 m A b は、 C C R 5 リガンド、 R A N T E S (弱い)、 M I P - 1、 および M I P - 1 の産生を誘導するが、 C X C R 4 リガンド S D F - 1 の産生を誘導せず (図 1)；

2 . H I V - 1 は、単独で、ある被験体においては、これらの C C R 5 結合性ケモカインを最小限の量で、そして他の被験体においては、頑強な量で誘導し (図 1)；そして

3 . H I V - 1 および抗脂質抗体の 1 つ (P 1、 I S 4 および C L 1 のいずれか) の組み合わせは、 C C R 5 ケモカインの極端に多い産生を導く (図 1) ことが示されてきている。

【 0 0 3 4 】

これらの観察は、本 H I V - 1 ワクチンの設計のため、広範囲の暗示を有する。

ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子が付着するよう操作された C C R 5 伝染ウイルス (W I T O) および C X C R 4 を利用する伝染ウイルス (W E A U) を用いて、 P B M C を感染させた (表 5 を参照されたい)。抗脂質抗体はすべて、 P B M C の W I T O 感染を阻害するが、 P B M C の W E A U H I V - 1 感染性を阻害しないことが見出された。やはり用いたのは、 H I V 感染 1 3 2 日後の急性 H I V 感染を伴う被験体 (7 0 0 - 1 2 - 0 3 7) に由来する血液 B 細胞の E B V 形質転換であり、この被験体から、 I g A 二量体である m A b A C L 4 が単離された (この B 細胞クローンのヘテロハイブリドーマ安定細胞株が確立されてきている)。生じたヒト m A b は、伝染 R 5 ウイルス W I T O を強力に阻害し、したがって、被験体 0 3 7 における伝染ウイルスが、抗脂質抗体が産生されるのを誘導し、したがって、 H I V - 1 がこの種類の抗体をブーストまたは誘導可能であることが立証される。この症例では、患者を救うには誘導が遅すぎた。これにより、この種類の抗体をプライミングする方法が示される。患者 0 3 7 からの A C L 4 抗体単離によって、 H I V - 1 がこの種類の抗体を刺激可能であり、したがって、 H I V が、事実上、この抗脂質「自己自然抗体」を「 H I V 特異的」方式でブーストすることを可能にすることが示される。すなわち、 H I V - 1 感染前に、ワクチンを用いて、 A C L 4 型抗体に関してプライミングすることによって、 H I V - 1 が、伝染に際して直ちに同じ抗体をブーストすることが可能になる。このアプローチは、感染数時間以内 (例えば 4 8 時間以内) に H I V を阻害することを可能にし、そしてしたがって、 H I V - 1 を消滅させることを可能にする。

【 0 0 3 5 】

P 1、 C L 1 および I S 4 m A b が宿主 P B M C に結合し、そしてピリオンではなく、宿主細胞に結合することによって阻害することもまた、先に指摘された (図 2)。さらに、 P 1、 C L 1 および I S 4 m A b は、脂質ラフトを示唆するパターンで、 P B M C 細胞に結合する。 P 1、 I S 4 および C L 1 のウイルス阻害活性は、カルジオリピンなどの脂質によって阻害可能であることもまた先に示されてきており (図 3 および 7)、すなわち、これらの抗体は、 *in vitro* でカルジオリピンに、ならびに P S および P E に結合可能である (Z h u ら , *British Journal of Haematology* 105 : 102 - 109 (1999)、 L i n ら , *Arthritis & Rheumatism* 56 : 1638 - 1647 (2007))。しかし、カルジオリピンは、外細胞膜中でなく、ミトコンドリア膜中にあり、したがって、 P S および P E がターゲットである。さらに、 P S および P E は、アポトーシス細胞の細胞表面上で発現され、生存細胞表面上にはより少なくしか発現されない (最近、より少量の P S および P E が生存細胞表面上に存在すると認識されてきている (B a l a s u b r a m a n i a n ら , *J. Biol. Chem.* 282 : 18357 - 18364 (2007

10

20

30

40

50

)))。

【0036】

実施例2

ヒト (hCD40)、マウス (mCD40) およびアカゲザル (RhCD40) の野生型 CD40、ならびにアカゲザル CD40 ならびにマウス CD40 およびアカゲザル突然変異体 CD40 の配列整列を図5に示す。CD40リガンドと相互作用するヒト CD40 のアミノ酸を太字および下線で示す。CD40 および CD40 リガンドの相互作用に干渉しうる抗体を誘導することを回避するため、マウス CD40 の対応する界面のアミノ酸 (K114) をヒト CD40 と同じように E に突然変異させた、突然変異体 mCD40、mCD40mutEK を設計した。CD40 と CD40 リガンドの界面のスパン領域 (囲みで示す) (アミノ酸 83 位 ~ 117 位) において、アカゲザルおよびヒト CD40 タンパク質間で異なるアミノ酸が領域中に 2 つあり (109 位および 112 位のアミノ酸)、そしてマウスおよびヒト CD40 間の配列に実質的な相違がある。このスパン領域中のアミノ酸相違による、CD40 および CD40 リガンドの相互作用に干渉しうる抗体を誘導する可能性を最小限にするため、別のマウス CD40 突然変異体 (mCD40d81-114) およびアカゲザル CD40 突然変異体 (RhCD40d109/112) を、界面スパン領域中のそのアミノ酸配列が、野生型からヒト CD40 のような配列に突然変異されるように設計した。

10

【0037】

実施例3

CCR5ケモカインに対する抗体が、PBMCのHIV-1感染を阻害する抗脂質抗体の能力を阻害する能力を研究した。提示する疑問は、PBMC HIV-1感染性アッセイに添加された際、CCR5ケモカインの効果を中和する抗体が、HIV-1によるPBMC感染を阻害するmAb CL1の能力を阻害可能であるかどうかであった(図6)。CCR5ケモカインMIP-1 およびMIP-1 を中和する抗体は、HIV感染性を阻害する抗脂質抗体の能力の、最強の阻害剤であることが見出された。したがって、実際、抗脂質抗体によって、HIV-1の存在下で、CCR5ケモカインを誘導すると、PBMCのHIV-1感染を阻害可能である。

20

【0038】

上に引用するすべての文献および他の情報供給源は、その全体が本明細書に援用される。

30

表1. PBMCにおいてアッセイした抗脂質およびHIV-1 mAbのHIV-1阻害活性

【0039】

【表1】

mAb	初代単離体に対する IC80 (µg/mL)	
	B.6535	C.DU123
IS4	0.07	0.06
CL1	0.42	0.19
P1	30	<0.2
B1	>50	>50
B2	>50	>50
三重・Mab	2.4	>25

40

三重・Mab = 2F5, 2G12, IgG1b12

50

【 0 0 4 0 】

表 2 . T Z M - b 1 細胞においてアッセイした抗脂質および H I V - 1 m A b の H I V - 1 阻害活性

【 0 0 4 1 】

【 表 2 】

mAb	偽ウイルスアッセイにおける ID ₅₀ (μg/mL)		
	B.6535	B.PVO	C.DU123
IS4	>50	>50	>50
CL1	>50	>50	>50
P1	>50	>50	>50
B1	>50	>50	>50
B2	>50	>50	>50
4E10	2.2	<2	<2

10

【 0 0 4 2 】

表 3 . 抗脂質抗体は、2 F 5、2 G 1 2 および 1 b 1 2 m A b よりも広い幅で、R 20
5 H I V - 1 初代単離体を阻害する

【 0 0 4 3 】

【表 3】

HIV-1 単離体	μg/mLでのIC80					共受容体 使用
	IS4	CL1	P1	抗RSV	三重 Mab	
B.TORNO	0.6	0.7	17	>50	0.03	CCR5
B.PVO	0.4	0.2	4.5	>50	0.64	CCR5
B.6535	0.07	0.4	30	>50	>25	CCR5
C.DU123	0.06	0.2	1.7	>50	>25	CCR5
C.DU156	2.8	2.6	16	>50	>25	CCR5
C.DU151	1.8	4.1	0.1	>50	>25	CCR5
C.DU172	1.1	0.6	0.55	>50	>25	CCR5
SHIV 162P3	5.2	1.2	1.6	>50	1.5	CCR5
SHIV 89.6P	>50	>50	>50	>50	>25	CXCR4/ CCR5
A.92UG029	>50	>50	>50	>50	>50	CXCR4
B.MN	>50	>50	>50	>50	0.26	CXCR4
AE_01.NI1052	>50	>50	>50	>50	>50	CXCR4

三重 Mab = 2F5, 2G12, IgG1b12

【 0 0 4 4 】

表 4 . 多様な細胞種でアッセイした HIV - 1 阻害活性

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

【表 4】

		μg/mLでのIC80値			
mAb	単球	単球 枯濁 PBMC	CD4 T 細胞	CD4 T 細胞 枯濁 PBMC	PBMC
CL1	0.06	>50	>50	14	>50
2G12	0.17	1.46	12.3	0.4	0.2

10

20

30

【0046】

40

表5. LucR取り込みHIV-1を用いたPBMCに基づく中和アッセイにおける、抗脂質抗体によるHIV-1の阻害

【0047】

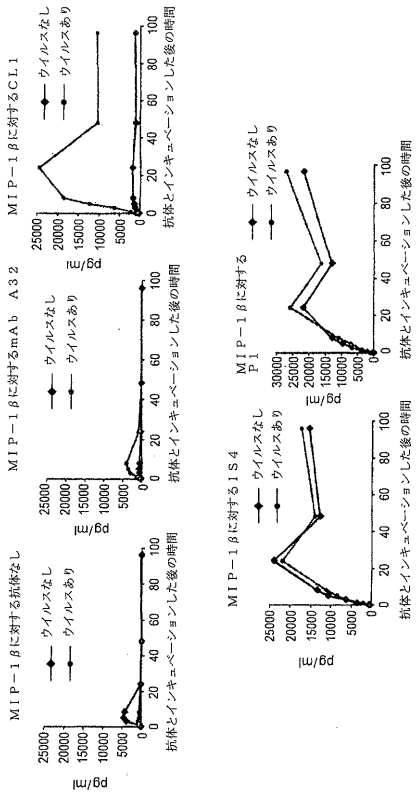
【表 5】

抗体	HIV-1 単離体		
	HIV-WITO.LucR. T2A.ecto/hPBMC*	HIV-WITO.LucR. T2A.ecto/hPBMC*	HIV-WEAU3-3.LucR. T2A.ecto/hPBMC#
IS4	0.08	< 0.02	> 50.00
P1	< 0.02	< 0.02	> 50.00
A32	> 50.00	> 50.00	> 50.00
4E10	0.09	0.16	22.24
ACL4	1.00	1.33	> 50.00
CL1	< 0.02	< 0.02	> 50.00
Synagis	> 50.00	> 50.00	> 50.00
2F5	0.97	4.22	6.44
4E10	0.05	0.33	4.52

* CCR5 HIV-1 単離体 ; # CXCR4 単離体

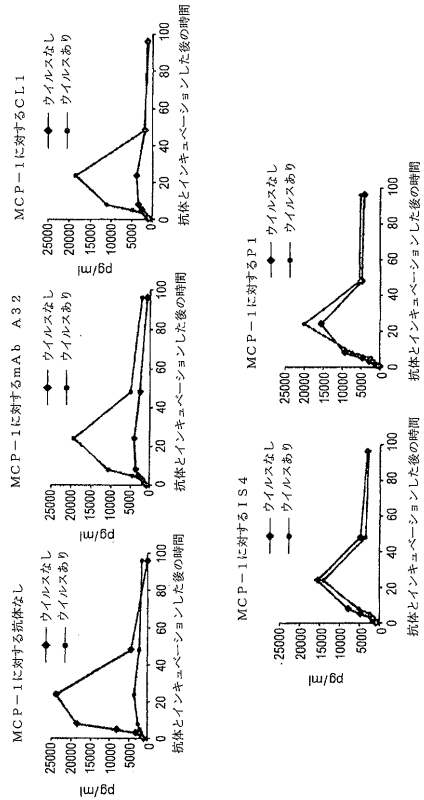
【図 1】

HIV-1 感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導された PBMC におけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果

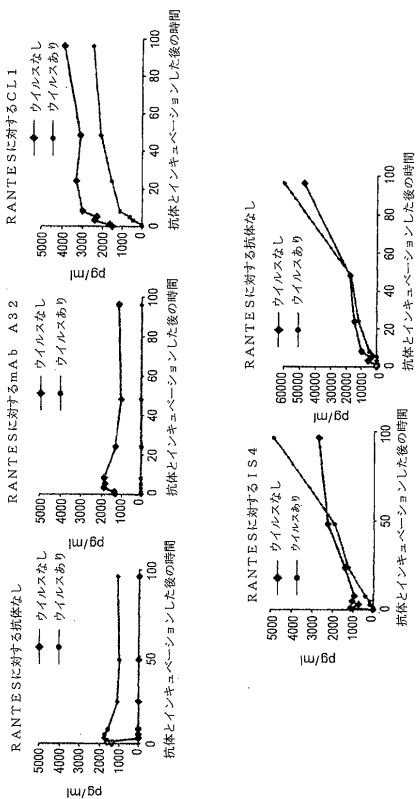


【図 1 - 1】

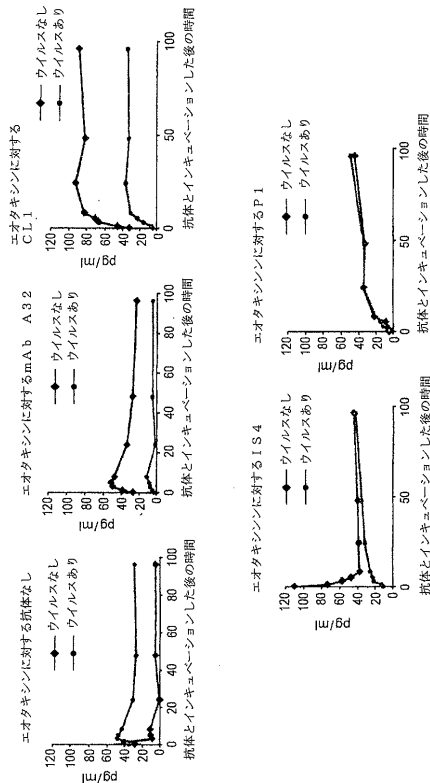
HIV-1 感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導された PBMC におけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果



HIV-1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP BMCにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果

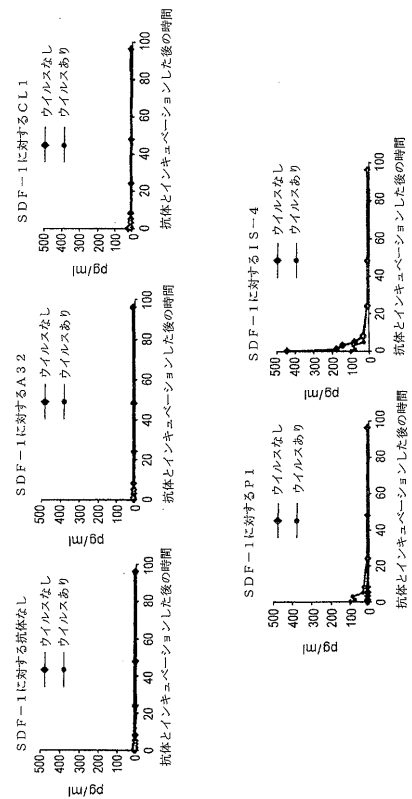


【図 1 - 2】

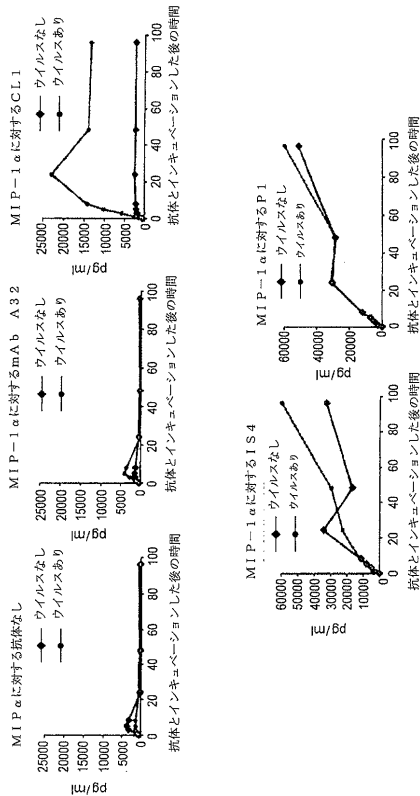


【図 1 - 4】

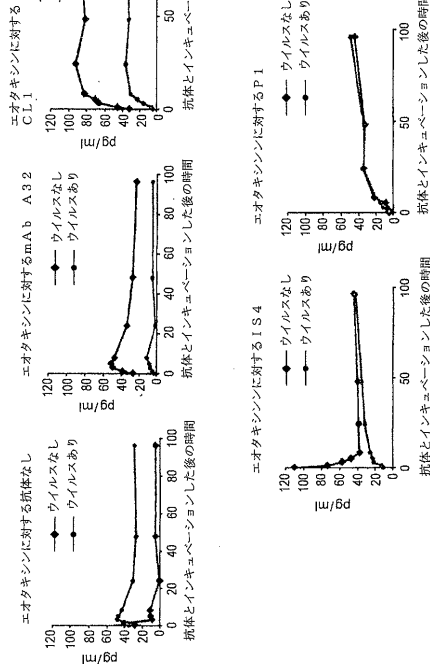
HIV-1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP BMCにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果



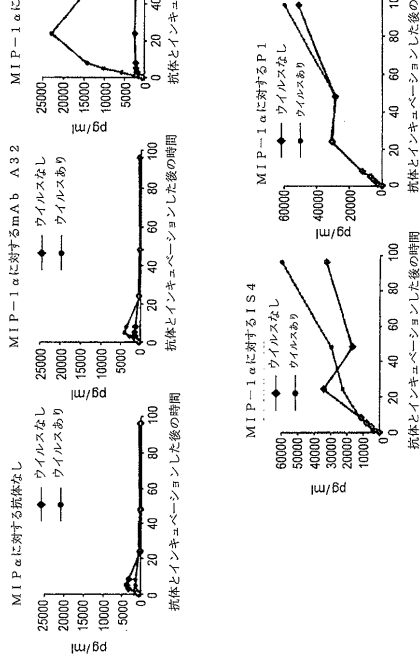
【図 1 - 3】



HIV-1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP BMCにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果

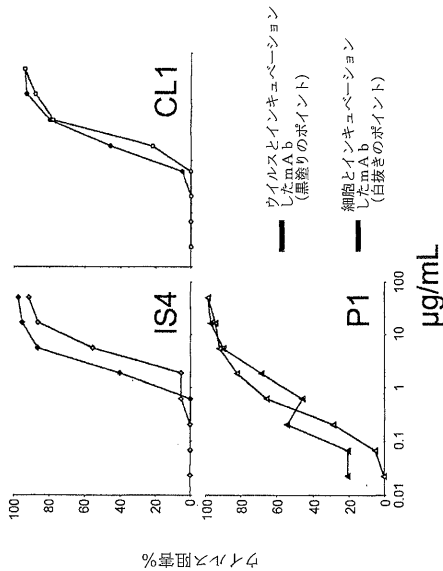


HIV-1感染の存在下および非存在下で、抗脂質抗体によって誘導されたP BMCにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果



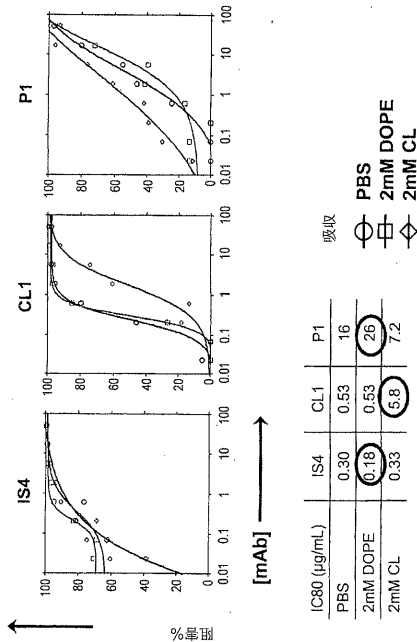
【 図 2 】

アッセイした HIV-1 阻害活性：ウイルスまたは細胞いすれか mAb のプレインキュベーション



【 図 3 】

カルズマリドンは、mAb CL1 が P1/BM2C において HIV-1 感染を遮断する能力を顕著的に阻害する



【 図 4 】

ヒト CD40, 寄託 NM_001250

MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCLPCGSEFLDTWNRRETRCHQK
 RKCDFNLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCVLRHSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEK
 CPWTSCTKDLVQAGTNRCDVCGQRRLALVFTIIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD
 DLFGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ*

マカカ・ムラッタ (Macaca mulatta) (アカゲザル) CD40, 寄託 XM_001104333

MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCLPCGSEFLDTWNRRETRCHQK
 RKCDFNLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCVLRHSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEK
 CPWTSCTKDLVQAGTNRCDVCGQRRLALVFTIIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD
 DLFGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ

マウス CD40, 寄託 NM_011611

MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCLPCGSEFLDTWNRRETRCHQK
 RKCDFNLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCVLRHSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEK
 CPWTSCTKDLVQAGTNRCDVCGQRRLALVFTIIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD
 DLFGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ

図 4 ヒト、マウスおよびアカゲザル CD40 の整合

	1	10	20	30	40	50	60
ヒト CD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCL						
マウス CD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCL						
アカゲザル CD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCL						
	61	70	80	90	100	110	120
ヒト CD40	PCGSEFLDTWNRRETRCHQKCYCDPMLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCV						
マウス CD40	PCGSEFLDTWNRRETRCHQKCYCDPMLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCV						
アカゲザル CD40	PCGSEFLDTWNRRETRCHQKCYCDPMLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCV						
	121	130	140	150	160	170	180
ヒト CD40	LHRSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEKCPWTSCTKDLVQAGTNR						
マウス CD40	LHRSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEKCPWTSCTKDLVQAGTNR						
アカゲザル CD40	LHRSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEKCPWTSCTKDLVQAGTNR						
	181	190	200	210	220	230	240
ヒト CD40	KTDVVCQPDQRALVLPVIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD						
マウス CD40	KTDVVCQPDQRALVLPVIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD						
アカゲザル CD40	KTDVVCQPDQRALVLPVIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD						
	241	250	260	270	280	290	
ヒト CD40	INFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ						
マウス CD40	INFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ						
アカゲザル CD40	INFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ						

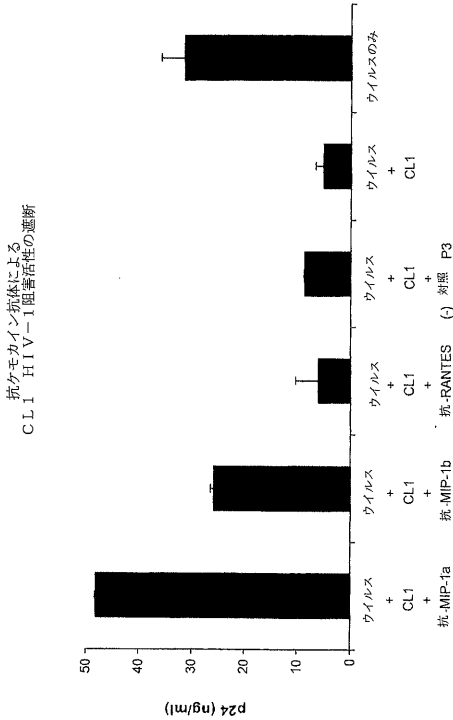
* 未および下線で強調したアミノ酸は、CD40L の塩基性アミノ酸と相互作用するヒト CD40 の酸性アミノ酸 (D84, E114 および E117) である。

【 図 5 】

抗 CD40 抗体を誘導するための免疫原設計

	1	10	20	30	40	50	60
hCD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCL						
mCD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCL						
mCD40Δ81_114	MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCL						
RhCD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAHVHPEPPTACREKQYLINSQCSSLCPGQKLVSDCTEFTETBCL						
	61	70	80	90	100	110	120
hCD40	PCGSEFLDTWNRRETRCHQKCYCDPMLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCV						
mCD40mutE8K	PCGSEFLDTWNRRETRCHQKCYCDPMLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCV						
mCD40Δ81-114	PCGSEFLDTWNRRETRCHQKCYCDPMLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCV						
RhCD40	PCGSEFLDTWNRRETRCHQKCYCDPMLGLRVQKGTSTEDTICCTCEBGMHCTEACBSCV						
	121	130	140	150	160	170	180
hCD40	LHRSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEKCPWTSCTKDLVQAGTNR						
mCD40mutE8K	LHRSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEKCPWTSCTKDLVQAGTNR						
mCD40Δ81-114	LHRSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEKCPWTSCTKDLVQAGTNR						
RhCD40	LHRSCSPGKQVQIATGVSDTICEPCVGFPSNVSAFAEKCPWTSCTKDLVQAGTNR						
	181	190	200	210	220	230	240
hCD40	KTDVVCQPDQRALVLPVIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD						
mCD40mutE8K	KTDVVCQPDQRALVLPVIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD						
mCD40Δ81-114	KTDVVCQPDQRALVLPVIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD						
RhCD40	KTDVVCQPDQRALVLPVIFGILFALLLVFLIKVAKKPNKAPHPKQSPQENPFD						
	241	250	260	270	280	290	
hCD40	INFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ						
mCD40mutE8K	INFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ						
mCD40Δ81-114	INFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ						
RhCD40	INFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTDGDKESRISVQERQ						

【 図 6 】



【 図 7 】

H I V - 1 感染性の抗脂質抗体による阻害の
作用機構：
R 5 伝染ウイルスに対する自然記憶応答の
H I V - 1 ワクチン誘導のための新規戦略

【 図 7 - 2 】

研究した抗脂質 mAb

mAb	CL1/PS1に結合	HIV-1 Envに結合	β 2DP1に結合	脂質結合が β 2DP1を必要とする	mAb 起源
IS4	+	-	+	しない	APAS 患者
CL1	+	-	++	しない	SLE 患者
P1	+	-	+++	しない	SLE 患者
B1	+	-	+++	する	SLE 患者
B2	+	-	+	する	SLE 患者
2F5	+	+	+	しない	HIV-1 陽性
4E10	+	+	+	しない	HIV-1 陽性

【 図 7 - 1 】

全身性エリテマトーデスにおける
A I D S 発症率

- 1993年、SLEにおける臨床的AIDS発症がまれであることが注目された (H.R. Barthelemy and D.J. Wallace, *Semin. Arthritis Rheum.*, 23:1, 1993)
- 2004年、続いてHIV-1に感染したSLEは15症例しか報告されなかった (Palacios R, Santos J., *Int. J. STD AIDS.* 15:277, 2004)
- NIH NIAMSグループ・レボジトリにおいて、5000人のSLE被験体のうち2人がHIV-1に感染している (Haynes, B.F. and Harley, J., 未公表).

【 図 7 - 3 】

抗脂質抗体の病原性

- 病原性脂質抗体—原発性抗リン脂質症候群 (APS)、続発性APS—
病原性抗体は、脂質への結合に β 2-糖タンパク質-1を必要とする
- 非病原性脂質抗体—「天然」、梅毒、AIDS、他の感染性疾患—
非病原性抗体は、脂質への結合に β 2-糖タンパク質-1を必要とせず、脂質に直接結合する

【 図 7 - 4 】

TZMBL偽ウイルス中和アッセイにおける
H I V - 1 感染性の阻害なし

mAb	偽ウイルスアッセイにおけるIC50 (μ g/mL)		
	B.6535	B.PVO	C.DU123
IS4	>50	>50	>50
CL1	>50	>50	>50
P1	>50	>50	>50
B1	>50	>50	>50
B2	>50	>50	>50
4E10	2.2	<2	<2

【 図 7 - 5 】

HIV-1 が誘導する Sup-T1 T細胞融合アッセイにおける、
HIV-1 が誘導する融合の阻害なし

Sup-T1 T細胞における AIDri thio™-2 不活化化ポリオンに対する IC90			
mAb	B.MN	B.ADA	B.AD8
IS4	>100	>100	>100
CL1	>100	>100	>100
P1	>100	>100	>100
B1	>100	>100	>100
B2	>100	>100	>100
2F5	<1.2	<1.2	3.4
4E10	<1.2	<1.2	10

【 図 7 - 6 】

抗脂質抗体は、PBMC 中和アッセイにおいて中和する

mAb	IC80 (µg/mL)	
	B.6535	
IS4	0.07	
CL1	0.42	
P1	30	
B1	>50	
B2	>50	
三重-Mab	2.4	

三重-Mab = 2F5, 2G12, IgG1b12

【 図 7 - 7 】

PBMCアッセイにおいて、
中和する抗脂質抗体は、非病原性であり、
そして脂質への結合に関してβ-2-糖タンパク質-1に依存しない

mAb	IC80 (µg/mL)		β2GP1 依存性
	B.6535		
IS4	0.07		なし
CL1	0.42		なし
P1	30		なし
B1	>50		あり
B2	>50		あり
三重-Mab	2.4		なし

三重-Mab = 2F5, 2G12, IgG1b12

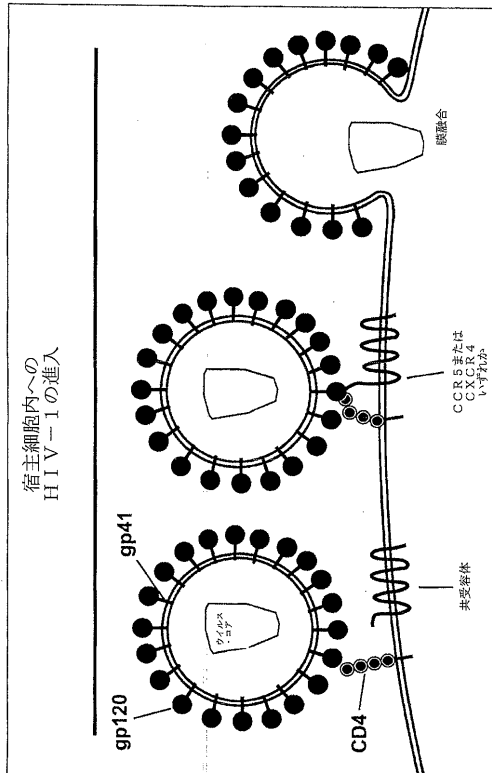
【 図 7 - 8 】

抗脂質抗体は、2F5、2G12および1b12 mAbよりも広い幅で、
RS HIV-1 初代毒株を阻害する

HIV-1 毒株	µg/mLでのIC80値					共有抗体 使用
	IS4	CL1	P1	抗RSV	三重-Mab	
B.TORNO	0.6	0.7	17	>50	0.03	CCR5
B.PVO	0.4	0.2	4.5	>50	0.64	CCR5
B.6535	0.07	0.4	30	>50	>25	CCR5
C.DU123	0.06	0.2	1.7	>50	>25	CCR5
C.DU156	2.8	2.6	16	>50	>25	CCR5
C.DU151	1.8	4.1	0.1	>50	>25	CCR5
C.DU172	1.1	0.6	0.55	>50	>25	CCR5
SHIV 162P3	5.2	1.2	1.6	>50	1.5	CCR5
SHIV 89.6P	>50	>50	>50	>50	>25	CXCR4/ CCR5
A.92UG029	>50	>50	>50	>50	>50	CXCR4
B.MN	>50	>50	>50	>50	0.26	CXCR4
AE_01.NIT052	>50	>50	>50	>50	>50	CXCR4

三重-Mab = 2F5, 2G12, IgG1b12

【 図 7 - 9 】



抗膜mAbの幅

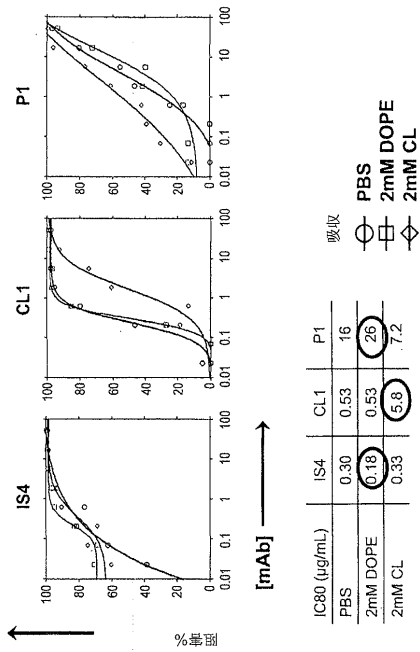
μg/mLでのIC80値

HIV-1 単離体	IS4	CL1	P1	抗RSV	三重Mab	非変容体 使用
B.TORNO	0.6	0.7	17	>50	0.03	CCR5
B.PVO	0.4	0.2	4.5	>50	0.64	CCR5
B.6635	0.07	0.4	30	>50	>25	CCR5
C.DU123	0.06	0.2	1.7	>50	>25	CCR5
C.DU156	2.8	2.6	16	>50	>25	CCR5
C.DU151	1.8	4.1	0.1	>50	>25	CCR5
C.DU172	1.1	0.6	0.55	>50	>25	CCR5
SHIV 162P3	5.2	1.2	1.6	>50	1.5	CCR5
SHIV 89.6P	>50	>50	>50	>50	>25	CXCR4 / CCR5
A.92UG029	>50	>50	>50	>50	>50	CXCR4
B.MN	>50	>50	>50	>50	0.26	CXCR4
AE_01.N11052	>50	>50	>50	>50	>50	CXCR4

三重Mab = 2F5, 2G12, IgG1b12

【図 7 - 1 2】

カルジオリピンは、mAb CL1がPBMCにおいて HIV-1感染を遮断する能力を競合的に阻害する



抗脂質抗体は、
HIV-1ピリオンを捕捉しない

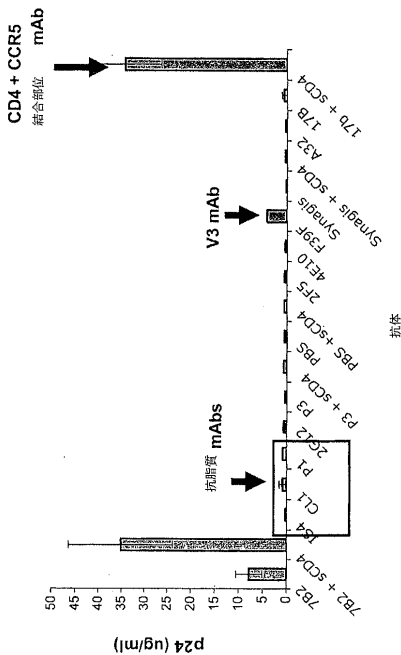
【図 7 - 1 1】

P.BMC中和アッセイに対する抗脂質抗体の
添加時間の影響

μg/mLでのIC80値

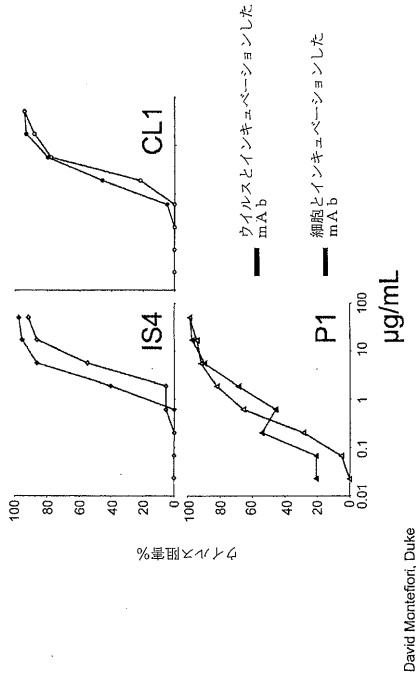
HIV-1感染後の mAb添加	IS4	CL1	P1	抗RSV 陰性対照
0 h	0.91	0.19	2.4	>50
24 h	>50	0.60	>50	>50
48 h	>50	0.22	>50	>50
72 h	>50	>50	>50	>50

【図 7 - 1 3】



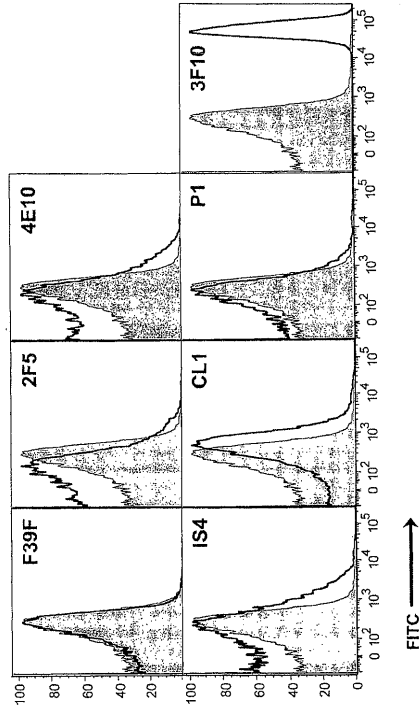
【 図 7 - 1 4 】

抗脂質抗体は、未感染ターゲットPBMCに結合することによって、HIV-1感染性を阻害する



【 図 7 - 1 5 】

非感染PBMCに対する抗脂質抗体の結合



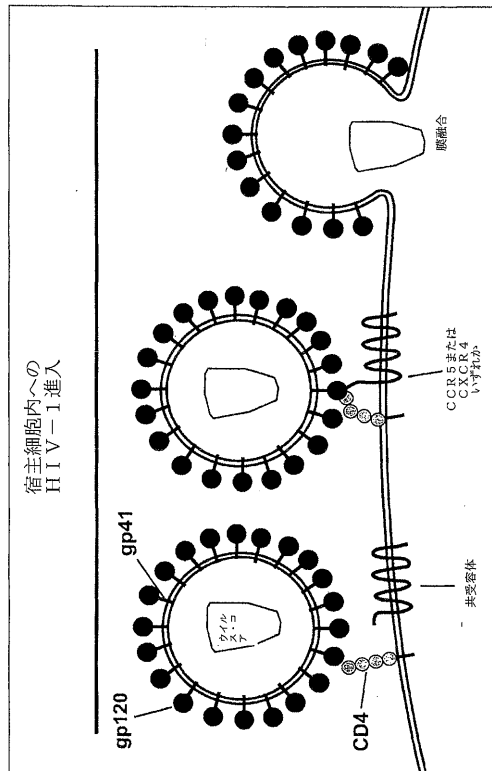
【 図 7 - 1 6 】

CD4+ T細胞において、抗脂質抗体がHIV-1 PVOを中和不能であること

細胞種	5.6 µg/mLでのmAb		
	CL1	2G12	IgG1 b12
単球	93	98	74
CD4+ T細胞	0	64	38

(対照に比較した中和%)

【 図 7 - 1 7 】



【 図 7 - 1 8 】

CCR5およびCXCR4に関するケモカインリガンド

• MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES –
CCR5に結合する単球産生ケモカイン

• SDF-1 –
CXCR4に結合するT細胞産生ケモカイン

【 図 7 - 1 9 】

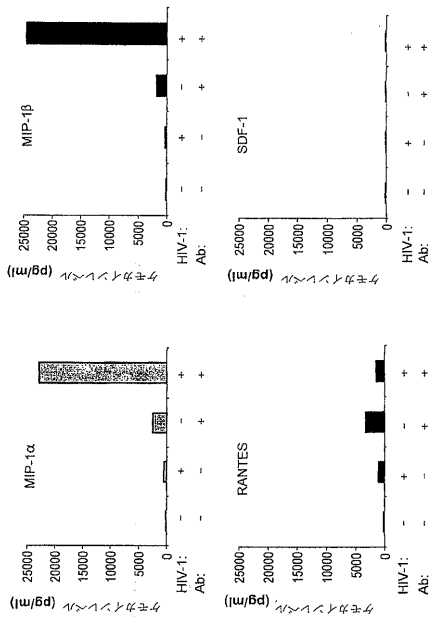
抗膜mAbの幅

HIV-1 単離体	IS4	CL1	P1	折RSV	三重 Mab	μg/mLでのIC50	
						CCR5	CXCR4 / CXCR4
B.TORNO	0.6	0.7	17	>50	0.03	CCR5	CCR5 / CXCR4
B.PVO	0.4	0.2	4.5	>50	0.64	CCR5	CXCR4
B.6535	0.07	0.4	30	>50	>25	CCR5	CXCR4
C.DU123	0.06	0.2	1.7	>50	>25	CCR5	CXCR4
C.DU156	2.8	2.6	16	>50	>25	CCR5	CXCR4
C.DU151	1.8	4.1	0.1	>50	>25	CCR5	CXCR4
C.DU172	1.1	0.6	0.55	>50	>25	CCR5	CXCR4
SHIV 162P3	5.2	1.2	1.6	>50	1.5	CCR5	CXCR4 / CXCR4
SHIV 89.6P	>50	>50	>50	>50	>25	CCR5	CXCR4
A.92UG029	>50	>50	>50	>50	>50	CCR5	CXCR4
B.MN	>50	>50	>50	>50	0.26	CCR5	CXCR4
AE_01.N11052	>50	>50	>50	>50	>50	CCR5	CXCR4

三重 Mab = 2F5, 2G12, IgG1b12

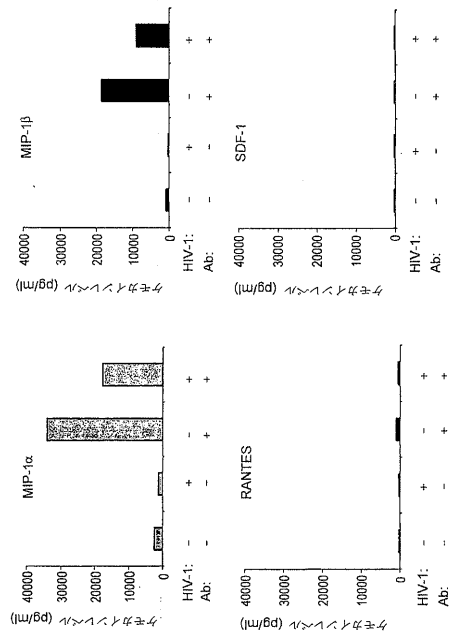
【 図 7 - 2 0 】

HIV-1感染の存在下および非存在下で、CL1によって誘導されたPBMCにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果 (実験1)

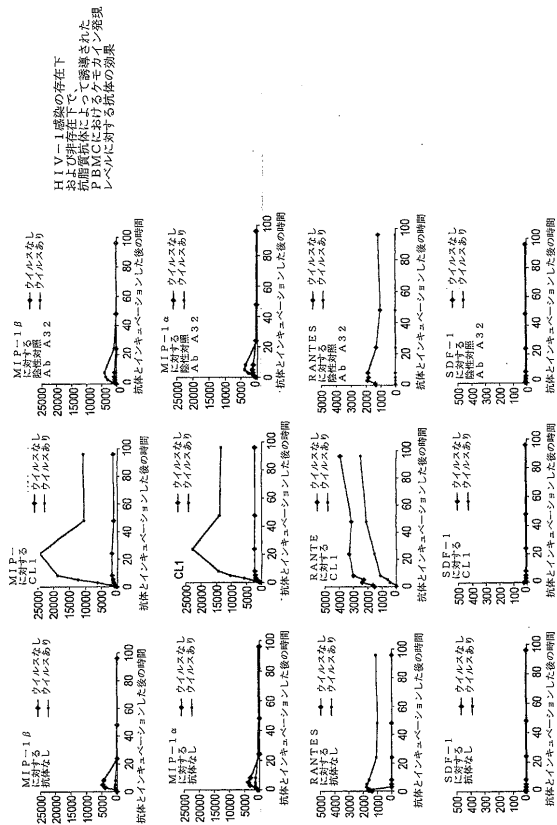


【 図 7 - 2 1 】

HIV-1感染の存在下および非存在下で、CL1によって誘導されたPBMCにおけるケモカイン発現レベルに対する抗体の効果 (実験2)

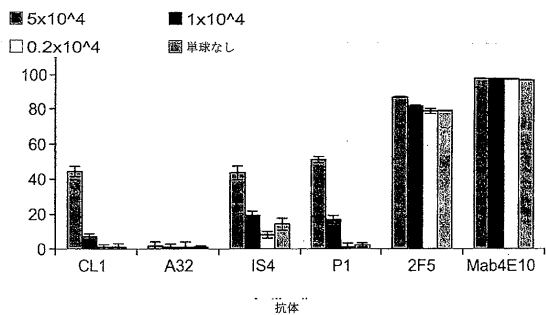


【 図 7 - 2 2 】



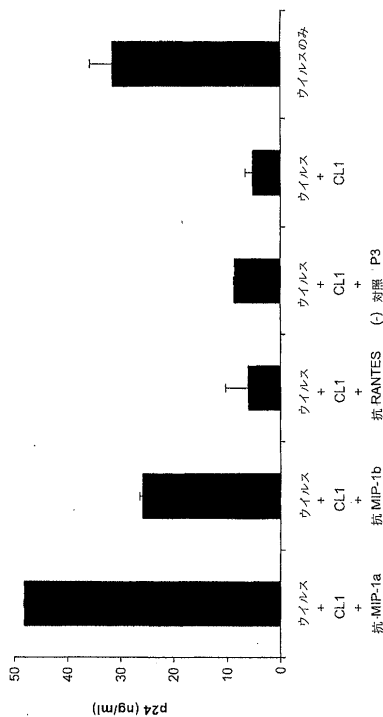
【 図 7 - 2 4 】

単球の存在下および非存在下での、
抗脂質抗体によるTZMBL細胞における
HIV-1 SS1196の阻害
(24時間インキュベーション)



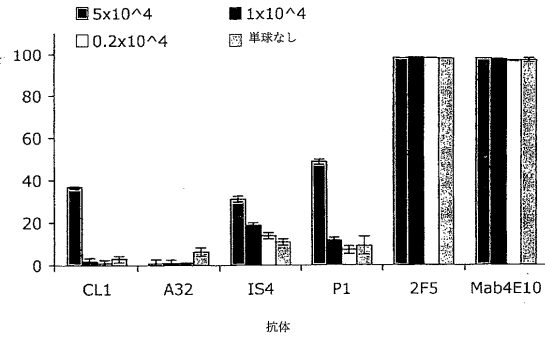
【 図 7 - 2 3 】

抗カモカイシ抗体による
CL1 HIV-1 阻害活性の遮断



【 図 7 - 2 5 】

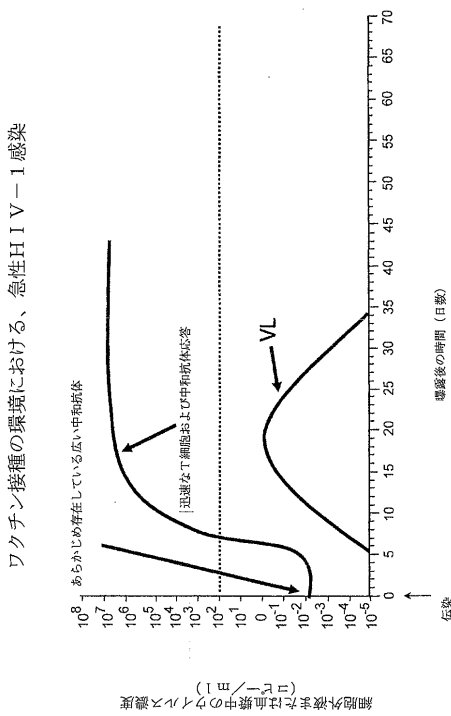
単球の存在下および非存在下での、
抗脂質抗体によるTZMBL細胞における
HIV-1 BG1168の阻害
(24時間インキュベーション)



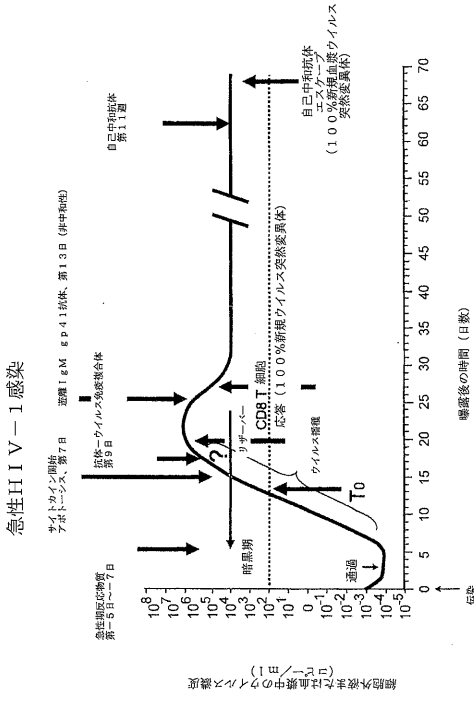
【 図 7 - 2 6 】

患者番号	診断	自己免疫疾患患者血清における HIV-1 阻害活性の存在		PBMCC における HIV-1 初代単離体の中和力価	
		APAS 型	HIV-1 偽ウイルスの中和	B.6535 型 P.V.O	B.6535 型 P.V.O
1	APAS	原発性	383	-	1:90
2	APAS	原発性	321	-	1:90
3	APAS	原発性	307	-	1:30
4	APAS	原発性	19	-	1:30
5	APAS	原発性	46	-	1:270
6	APAS	原発性	130	-	-
7	APAS	原発性	102	-	1:30
8	APAS	原発性	17	-	1:90
9	APAS	原発性	96	-	1:90
10	APAS	原発性	271	-	1:90
11	APAS	原発性	151	-	-
12	APAS	原発性	172	-	-
13	SLE	続発性	16	-	-
14	SLE	続発性	12	-	1:90
15	SLE	続発性	32	-	1:30
16	SLE	続発性	47	-	-
17	SLE	続発性	114	-	-
18	SLE	続発性	11	-	-
19	SLE	続発性	8	-	-
20	狼瘡症	対照	11	-	-
21	対照	対照	3	-	-
22	対照	対照	7	-	-
23	対照	対照	1	-	-
24	対照	対照	10	-	-
25	対照	対照	7	-	-
26	対照	対照	5	-	-
27	対照	対照	13	-	-
28	対照	対照	2	-	-
29	対照	対照	3	-	-
30	対照	対照	-	-	-

【 図 7 - 2 8 】

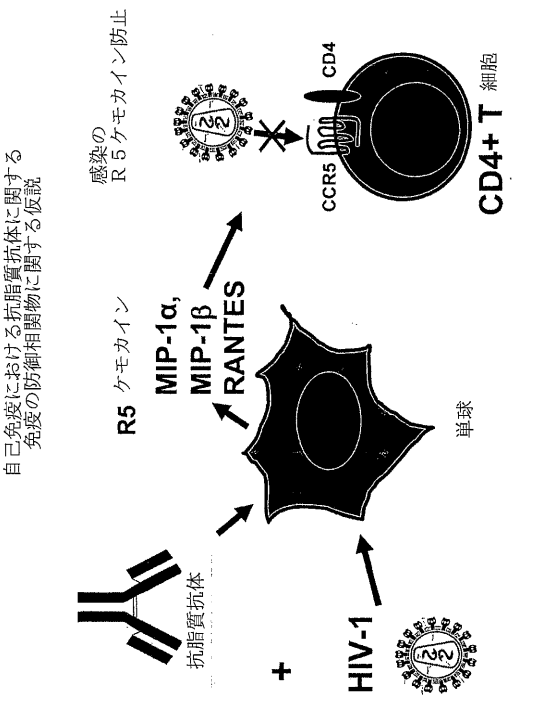


【 図 7 - 2 7 】

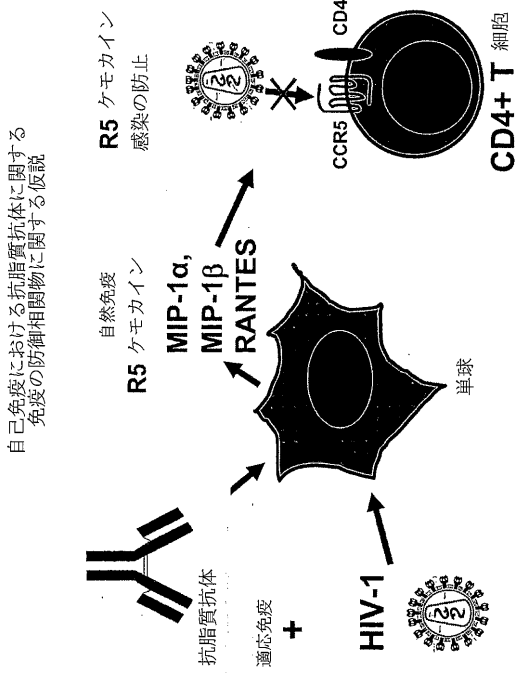


Benedikt Kessler, Sesh Borrow, Phillip Norris, Andrea Stacey, Nancy Smith,
Bart Haynes, Georgia Tomaras, George Shaw, Beatrice Hahn,
Lynn Morris, Andrew McMichael, Nilu Goonetilleke, Bette Korber

【 図 7 - 2 9 】



【 図 7 - 3 0 】

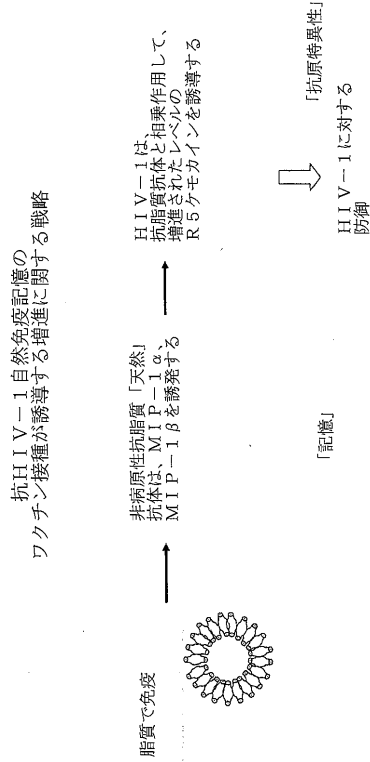


【 図 7 - 3 2 】

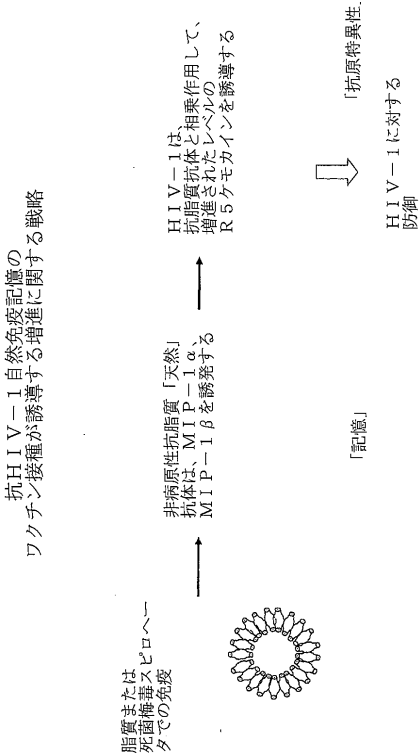
梅毒は、感染被験体の100%で、非病原性抗脂質抗体を誘導する

- VDRL = 抗脂質、抗CL抗体
- 梅毒における大部分の抗脂質抗体は、脂質への結合のため、β-2-糖タンパク質-1に依存しない

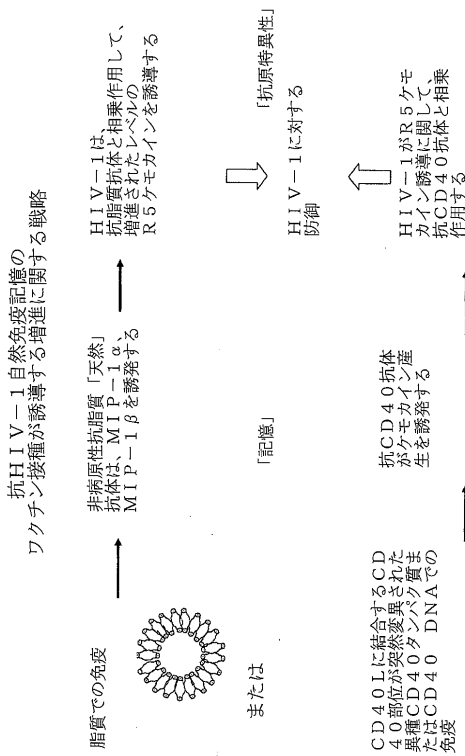
【 図 7 - 3 1 】



【 図 7 - 3 3 】

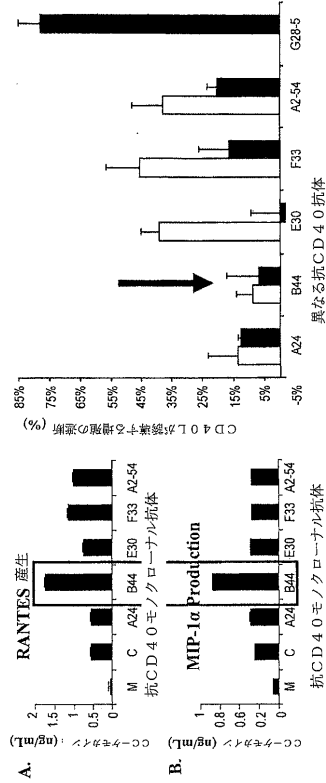


【 図 7 - 3 6 】



【 図 7 - 3 4 】

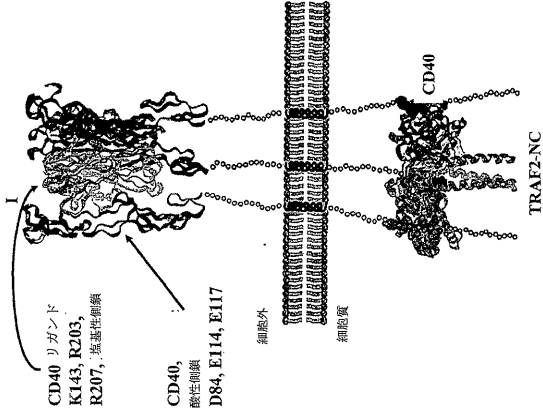
単球CD40へのB44 mAb結合は、
抗HIV-1ケモカイン放出を誘発するが、
同族CD40-CD40リガンド相互作用に干渉しない



Elmark, P. et al., AIDS Res. Human Retrovirol., 24:367, 2008

Abayneh, S.A., Fenyö, E.M. et al., AIDS Res. Hum Retroviruses. 24:447, 2008.

【 図 7 - 3 5 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/18 (2006.01)		A 6 1 P 31/18	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)		C 0 7 K 14/705	

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

(74) 代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72) 発明者 ヘインズ, パートン・エフ

アメリカ合衆国ノース・カロライナ州 2 7 7 0 8 - 0 0 8 3 , ダーラム, ボックス 9 0 0 8 3 ,
デューク ユニバーシティ

F ターム(参考) 4C076 AA19 DD06F DD63F

4C085 AA03 AA38 BA69 BB11 BB50 DD86 EE01 EE06 FF18 GG02

GG03 GG04

4H045 AA11 AA30 CA40 DA50 DA86 EA31