

(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2019-509046

(P2019-509046A)

(43) 公表日 平成31年4月4日 (2019. 4. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/13 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B O 6 3
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63 Z	4 B O 6 5
<b>C O 7 K 16/10 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/10	4 C O 8 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-548300 (P2018-548300)  
 (86) (22) 出願日 平成28年12月5日 (2016. 12. 5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年8月6日 (2018. 8. 6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2016/057367  
 (87) 国際公開番号 W02017/093985  
 (87) 国際公開日 平成29年6月8日 (2017. 6. 8)  
 (31) 優先権主張番号 62/263, 618  
 (32) 優先日 平成27年12月5日 (2015. 12. 5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

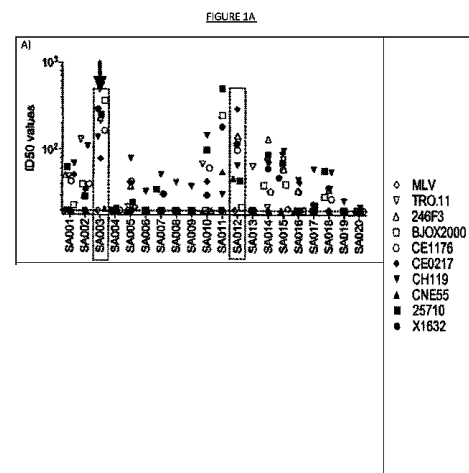
(71) 出願人 518196309  
 サントル オスピタリエ ユニヴェルシテ  
 ール ヴォドア  
 CENTRE HOSPITALIER  
 UNIVERSITAIRE VAUDO  
 I S  
 スイス国 1 0 1 1 ローザンヌ ペアシ  
 ュ 1 0 - 5 1 3 リュ ドウ ビュニヨン  
 2 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H I V 結合剤

## (57) 【要約】

本開示は、H I V に対する特異性を有する結合剤と、  
 H I V 感染および / または A I D S を処置、予防および  
 / または改善するためのその使用方法とに関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

インビトロ HIV 中和アッセイおよび / またはインビボで HIV を中和する結合剤において、配列番号 1 ~ 32 からなる群から選択されかつ / または表 1 に示される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むことを特徴とする結合剤。

## 【請求項 2】

配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、および配列番号 32 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の結合剤。

## 【請求項 3】

配列番号 1 ~ 6 もしくは GNT、またはその保存的置換バリエーション；

配列番号 1 ~ 8、またはその保存的置換バリエーション；

配列番号 9 および 10、またはその保存的置換バリエーション；

配列番号 11 および 12、またはその保存的置換バリエーション；

配列番号 13 および 14、またはその保存的置換バリエーション；

配列番号 15 および 16、またはその保存的置換バリエーション；

配列番号 17 および 18、またはその保存的置換バリエーション；

配列番号 19 および 20、またはその保存的置換バリエーション；

配列番号 21 および 22、またはその保存的置換バリエーション；および

配列番号 23 および 24、またはその保存的置換バリエーション

の少なくとも 1 つを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の結合剤。

## 【請求項 4】

配列番号 70 または 71 を含む可変重鎖領域；

配列番号 70 のアミノ酸 22 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W)；

配列番号 71 のアミノ酸 23 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W)；

配列番号 72 ~ 78 のいずれかの CDRH3 アミノ酸配列；

配列番号 72 のアミノ酸 8 に対応するアミノ酸におけるアラニン (A)；

配列番号 73 のアミノ酸 9 に対応するアミノ酸におけるアラニン (A)；

配列番号 74 のアミノ酸 10 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W)；

配列番号 75 のアミノ酸 11 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W)；

配列番号 76 のアミノ酸 12 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W)；

配列番号 77 のアミノ酸 14 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W)；

配列番号 78 のアミノ酸 15 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W)；

配列番号 79 または 80 を含む可変軽鎖領域；

配列番号 79 のアミノ酸 5 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W)；および / または

配列番号 80 のアミノ酸 6 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W)

を含まないことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の結合剤。

## 【請求項 5】

配列番号 68 のアミノ酸残基 L679、W680 および K683、ならびに / または配列番号 69 のアミノ酸残基 L168、W169 および K172 に対する結合特異性を示すことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の結合剤。

## 【請求項 6】

ITKWLWYIK (配列番号 66) に対する結合特異性を示すことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の結合剤。

## 【請求項 7】

ITKWLWYIK (配列番号 66) に対する結合特異性を示すが、LASWVKYIQ (配列番号 65) および / または ITKWIKYIQ (配列番号 67) に対する結合特異性を示さないことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の結合剤。

## 【請求項 8】

10

20

30

40

50

10<sup>2</sup> ~ 10<sup>0</sup> μg/ml または 10<sup>0</sup> ~ 10<sup>1</sup> μg/ml の濃度において、HIV - 1 偽型ウイルス BJOX (CRF07\_\_BC)、CE1176、TRO.11(B)、X1632(G)、CH119(CRF07\_\_BC)、CNE55(CRF01\_\_AE)、25710(C)、CD0217(C) の中和を示すが、対照ウイルス SVA-MLV の中和を示さないことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 9】

中和パーセントは、少なくとも約 50%であることを特徴とする、請求項 8 に記載の結合剤。

【請求項 10】

25 μg/ml 未満の IC<sub>50</sub> において、図 4 に記載される 118 の HIV - 1 偽型ウイルスの大部分を中和することを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の結合剤。

10

【請求項 11】

単離モノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 12】

前記モノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 11 に記載の結合剤。

【請求項 13】

前記抗体のアイソタイプは、IgG1 または IgG3 であることを特徴とする、請求項 11 または 12 に記載の結合剤。

20

【請求項 14】

配列番号 1 ~ 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの重鎖 CDR アミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の結合剤。

【請求項 15】

配列番号 4 ~ 6 または GNT からなる群から選択される少なくとも 1 つの軽鎖 CDR アミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の結合剤。

【請求項 16】

配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、および配列番号 23 からなる群から選択される少なくとも 1 つの重鎖可変アミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の結合剤。

30

【請求項 17】

配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、および配列番号 24 からなる群から選択される少なくとも 1 つの軽鎖可変アミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の結合剤。

【請求項 18】

配列番号 1 ~ 32 のいずれか 1 つまたは複数のアミノ酸残基の保存的置換を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 19】

ヒト抗体、ヒト IgG、ヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG2a、ヒト IgG2b、ヒト IgG3、ヒト IgG4、ヒト IgM、ヒト IgA、ヒト IgA1、ヒト IgA2、ヒト IgD、ヒト IgE、イヌ抗体、イヌ IgGA、イヌ IgGB、イヌ IgGC、イヌ IgGD、ニワトリ抗体、ニワトリ IgA、ニワトリ IgD、ニワトリ IgE、ニワトリ IgG、ニワトリ IgM、ニワトリ IgY、ヤギ抗体、ヤギ IgG、マウス抗体、マウス IgG、ブタ抗体、およびラット抗体に由来することを特徴とする、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の結合剤。

40

【請求項 20】

誘導体において、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の結合剤のものであることを特徴とする誘導体。

【請求項 21】

50

F<sub>a b</sub>、F<sub>a b 2</sub>、F<sub>a b</sub>' 単鎖抗体、F<sub>v</sub>、単鎖、単一特異性抗体、二特異性抗体、三量体抗体、多特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌ-ヒトキメラ抗体、イヌ-マウスキメラ抗体、イヌFcを含む抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、イヌ化抗体、CDR移植抗体、サメ抗体、ナノボディ、およびラクダ科抗体からなる群から選択されることを特徴とする、請求項21に記載の誘導体。

【請求項22】

少なくとも第1および第2の特異性を含み、前記第1の特異性は、gp41に対するものであり、および前記第2の特異性は、異なる抗原に対するものであることを特徴とする、請求項1～21のいずれか一項に記載の結合剤または誘導体。

【請求項23】

固定可能に取り付けられた検出可能な標識を含むことを特徴とする、請求項1～22のいずれか一項に記載の結合剤またはその誘導体。

【請求項24】

前記検出可能な標識は、フルオレセイン、DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647、5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン、5-FAM、ヒドロキシトリプタミン、5-ヒドロキシトリプタミン(5-HAT)、6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)、FITC、6-カルボキシ-1,4-ジクロロ-2',7'-ジクロロフルオレセイン(TET)、6-カルボキシ-1,4-ジクロロ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン(HEX)、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン(6-JOE)、Alexa fluor、Alexa fluor 350、Alexa fluor 405、Alexa fluor 430、Alexa fluor 488、Alexa fluor 500、Alexa fluor 514、Alexa fluor 532、Alexa fluor 546、Alexa fluor 555、Alexa fluor 568、Alexa fluor 594、Alexa fluor 610、Alexa fluor 633、Alexa fluor 635、Alexa fluor 647、Alexa fluor 660、Alexa fluor 680、Alexa fluor 700、Alexa fluor 750、BODIPYフルオロフォア、BODIPY 492/515、BODIPY 493/503、BODIPY 500/510、BODIPY 505/515、BODIPY 530/550、BODIPY 542/563、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650-X、BODIPY 650/665-X、BODIPY 665/676、FL、FL ATP、FI-セラミド、R6G SE、TMR、TMR-Xコンジュゲート、TMR-X、SE、TR、TR ATP、TR-X SE、ローダミン、ローダミン110、ローダミン123、ローダミンB、ローダミンB200、ローダミンBB、ローダミンBG、ローダミンBエクストラ、5-カルボキシテトラメチルローダミン(5-TAMRA)、5GLD、6-カルボキシローダミン6G、リサミン、リサミンローダミンB、ファリシジン、ファロイジン、ローダミンレッド、Rhod-2、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、カルボキシ-X-ローダミン(5-ROX)、スルホローダミンB can C、スルホローダミンGエクストラ、6-カルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA)、テトラメチルローダミン(TRITC)、ローダミンWT、Texas Red、およびTexas Red-Xからなる群から選択されることを特徴とする、請求項23に記載の結合剤。

【請求項25】

固定可能に取り付けられたエフェクター部分を含むことを特徴とする、請求項1～22のいずれか一項に記載の結合剤またはその誘導体。

【請求項26】

前記エフェクター部分は、細胞毒性薬、毒素、ジフテリアA鎖、外毒素A鎖、リシンA

10

20

30

40

50

鎖、アブリン A 鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシン、および放射化学物質からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 25 に記載の結合剤または誘導体。

【請求項 27】

単離ポリヌクレオチドにおいて、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の結合剤をコードすることを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 28】

配列番号 37 ~ 72 の少なくとも 1 つの核酸配列を含むことを特徴とする、請求項 27 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 29】

発現ベクターにおいて、請求項 27 または 28 に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする発現ベクター。

【請求項 30】

宿主細胞において、請求項 27 もしくは 28 に記載の単離ポリヌクレオチドおよび / または請求項 29 に記載の発現ベクターを含むことを特徴とする宿主細胞。

【請求項 31】

組成物において、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの結合剤もしくは誘導体 ; 請求項 27 もしくは 28 に記載の少なくとも 1 つの単離ポリヌクレオチド ; または請求項 29 に記載の少なくとも 1 つの発現ベクター ; および / または請求項 30 に記載の少なくとも 1 つの宿主細胞 ; あるいはこれらの組合せと、薬学的に許容可能な担体とを含むことを特徴とする組成物。

【請求項 32】

細胞上の HIV を検出するための方法において、試験生体サンプルを、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の結合剤または誘導体と接触させるステップと、前記生体サンプルまたはその成分に結合された前記結合剤を検出するステップとを含むことを特徴とする方法。

【請求項 33】

前記試験生体サンプルまたはその成分への結合量を、対照生体サンプルまたはその成分への結合量と比較するステップをさらに含み、前記対照生体サンプルまたはその成分と比べて増大した前記試験生体サンプルまたはその成分への結合は、前記試験生体サンプル中における HIV 発現細胞の存在を示すことを特徴とする、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記試験生体サンプルは、哺乳類の血液であることを特徴とする、請求項 32 または 33 に記載の方法。

【請求項 35】

インビボ方法であることを特徴とする、請求項 32 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

インビトロ方法であることを特徴とする、請求項 32 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

哺乳類の HIV 感染および / または AIDS を処置、予防および / または改善するための方法において、少なくとも 1 回の有効用量の、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の結合剤または誘導体を含む医薬組成物を前記哺乳類へ投与するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 38】

前記動物に複数回の投与が行われることを特徴とする、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記結合剤は、約 1 ~ 50 mg / kg の投与量で投与されることを特徴とする、請求項 37 または 38 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 40】**

細胞内または細胞上の HIV の発現を検出するためのキットにおいて、請求項 1 ～ 26 のいずれか一項に記載の結合剤または誘導体と、使用説明書とを含むことを特徴とするキット。

**【請求項 41】**

前記結合剤、抗体、または誘導体は、凍結乾燥形態であることを特徴とする、請求項 40 に記載のキット。

**【発明の詳細な説明】****【関連出願の相互参照】****【0001】**

本出願は、2015 年 12 月 5 日に出願された米国特許出願第 62 / 263 , 618 号に対する優先権を主張する。

**【技術分野】****【0002】**

本開示は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する特異性を有する結合剤と、その製造方法と、HIV 感染を処置および / または予防するためのその使用方法とに関する。

**【背景技術】****【0003】**

HIV が流行して 30 ～ 40 年が経つにつれて、HIV 病因の理解および強力かつ安全な抗ウイルス薬の開発において著しい進歩が遂げられている。30 を超える抗ウイルス薬が登録されており、抗レトロウイルス併用療法 (ART) が罹患率および死亡率の両方に与える影響は注目に値するものであった。しかしながら、ART を最適に順守する患者では HIV 複製の長期間の抑制が達成されているにもかかわらず、治療の中断後に HIV は常に元に戻る。さらに、成功した治療は、ART がないと、HIV 複製を制御することができるウイルス特異的免疫応答を誘発せず、またはその回復 / 発生を可能にしない。従って、HIV 感染対象の大多数において、HIV 複製および関連の疾患を制御するには、生涯にわたる ART が必要とされる。

**【0004】**

持続的な抗ウイルス療法がなくてもウイルス複製が抑制されるいくつかの免疫学的介入がこれまでに研究されており、現在、HIV の機能的治癒を達成すること为目标としてさらに開発されている。治療的ワクチン戦略は、これまで研究された主要な介入戦略であったが、結果は、実験動物モデルおよび患者において、CMV ベースのベクター HIV ワクチン (NHP モデルにおいて 50 % の効力) を除いてわずかな効力のみを示している。最近の研究は、HIV 感染における治療薬として抗エンベロープ広域中和抗体 (bNab) を用いる可能性について興味深い結果をもたらしている。

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

当該技術分野において、HIV を標的にするための付加的な試薬、特に中和抗体と、その使用方法とが必要とされている。

**【課題を解決するための手段】****【0006】**

本開示は、HIV、ならびに HIV に感染しておりかつ / または HIV を保有している細胞および / もしくは組織を標的にするために使用され得る試薬および方法を提供することにより、これらの必要性に対処する。

**【0007】**

以下において、添付図面の簡単な説明が提供される。図面は、本発明をより詳細に説明することが意図される。しかしながら、それらは、本発明の主題を限定することは全く意図されない。

**【図面の簡単な説明】**

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 8 】

【図 1 - 1】図 1 A ~ B は、抗レトロウイルス療法を受けていない慢性感染患者からの 70 の血漿サンプルによる、H I V - 1 参照株の包括的パネルからの 9 個の H I V - 1 偽型ウイルスのパネルの中和の結果を示す。M L V 偽型ウイルスは、負の対照として使用される。強力な広域中和抗体を単離するためにリンパ節の採取に選択された 7 人のドナーがボックスで囲われている。矢印で強調されているのは、本発明で記載される広域中和抗体の単離のために選択されたドナー S A 0 0 3 である。I D 5 0 値は、ウイルス感染の 5 0 % を中和することができる血漿の希釈を示す。

【図 1 - 2】図 1 C ~ D は、抗レトロウイルス療法を受けていない慢性感染患者からの 70 の血漿サンプルによる、H I V - 1 参照株の包括的パネルからの 9 個の H I V - 1 偽型ウイルスのパネルの中和の結果を示す。M L V 偽型ウイルスは、負の対照として使用される。強力な広域中和抗体を単離するためにリンパ節の採取に選択された 7 人のドナーがボックスで囲われている。I D 5 0 値は、ウイルス感染の 5 0 % を中和することができる血漿の希釈を示す。

【図 2】図 2 は、リンパ節サンプルから記憶および胚中心 I g G B 細胞を精製するために使用されるゲーティングおよびソーティング戦略を示す。B 細胞を表面マーカー C D 1 9 の発現について選択し、I g G B 細胞を I g A および I g M B 細胞受容体 ( B C R ) の発現の欠乏について陰性選択した。胚中心 B 細胞を C D 3 8 マーカー ( 記憶 B 細胞上に存在しない ) の発現についてさらに選択した。

【図 3】図 3 A - B は、異なる濃度 (  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ) のモノクローナル抗体 L N 0 1 による、H I V - 1 参照株の包括的パネルからの 9 個の H I V - 1 偽型ウイルスのパネル ( および負の対照としての M L V ) の中和の結果を示す。I C 5 0 値は、ウイルス感染の 5 0 % を中和することができるモノクローナル抗体の濃度を示す。エラーバーは、2 度の繰返し標準偏差を示す。

【図 4】図 4 は、モノクローナル抗体 L N 0 1 による、1 1 8 個の H I V - 1 偽型ウイルスのマルチクレードパネルの中和の結果を示す。I C 5 0 値は、ウイルス感染の 5 0 % を中和することができるモノクローナル抗体の濃度を示す。

【図 5 - 1】図 5 A ~ F は、図 4 に記載される 1 1 8 個のウイルスのパネル全体と、個々のクレードまたは循環組換え形態とにおける I C 5 0 値の分布を示す。

【図 5 - 2】図 5 G ~ J は、図 4 に記載される個々のクレードまたは循環組換え形態とにおける I C 5 0 値の分布を示す。

【図 6】図 6 は、T Z M - b 1 または F c ガンマ受容体 I を発現する T Z M - b 1 を標的細胞として用いたときに、モノクローナル抗体 L N 0 1 による、H I V - 1 参照株の包括的パネルからの 9 個の H I V - 1 偽型ウイルスのパネルの中和の結果を示す。

【図 7】図 7 は、7 個の H I V - 2 / H I V - 1 キメラ偽型ウイルスのパネルの中和の結果を示し、ここで、H I V - 2 ( 株 7 3 1 2 A ) M P E R 領域は、クレード B またはクレード C ( バリアント 7 3 1 2 A . C 1 C の場合 ) H I V - 1 株の M P E R コンセンサス配列から対応する残基を導入することにより変異誘発されている。

【図 8 - 1】図 8 A ~ B は、クレード A、B、C、D、グループ M、C R F 0 1 \_\_ A E および C R F 0 2 \_\_ A G のコンセンサス H I V - 1 E n v g p 1 6 0 配列の全長をカバーする、1 2 個のアミノ酸により重複する 1 4 2 3 の 1 5 - m e r ペプチドのアレイに対する L N 0 1 または 7 B 2 モノクローナル抗体の結合を示す。2 . 0 E + 4 よりも低いシグナルは、陰性であるとスコア化される。予想通り、7 B 2 は、g p 4 1 免疫優性領域 ( g p 4 1 I D ) と反応する。

【図 8 - 2】図 8 C ~ D は、図 A ~ B の続きである。

【図 9 - 1】図 9 A ~ B は、表面プラズモン共鳴で評価したときの、可溶性 C D 4 ( s C D 4 ) の存在下または非存在下で広域中和のために複数のエピトープを発現する切断型および可溶性 H I V - 1 E n v トリマー B G 5 0 5 S O S I P . 6 6 4 g p 1 4 0 に対する L N 0 1、P G T 1 4 5、P G T 1 5 1 および 1 7 B モノクローナル抗体の結合を示す。予想通り、P G T 1 4 5 ( V 1 - V 2 グリカン特異的 ) および P G T 1 5 1 ( g p

10

20

30

40

50

120とgp41との間の界面の部位へ結合する)は、sCD4の非存在下および存在下でBG505 SOSIP.664 gp140に対して高親和性で結合したが、17b(CD4結合誘導部位へ結合する)は、sCD4の存在下においてのみ結合した。

【図9-2】図9C~Dは、図A~Bの続きである。

【図10】図10A-Bは、ELISAで測定したときの、HIV-1 Env抗原および負の対照(ctr)抗原のセットに対するLN01および10E8(MPER特異的広域中和抗体)抗体の結合を示す。10E8抗体は、MPER領域を含有するgp41の組換え細胞外ドメインに反応した。

【図11】図11A-Bは、ELISAで測定したときの、融合中間体gp41(gp41int)または負の対照としての非コートプレート(PBS)に対するLN01および10E8モノクローナル抗体の結合を示す。10E8抗体は、MPER領域を含有するgp41に反応した。

【図12】図12は、gp41ペプチドRRRR-NEQEELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIRRRR(配列番号89)に対するmAb 10E8の結合を示す。

【図13-1】図13Aは、LN01抗体点突然変異バリエーションの効力を示す。A. LN01 VHおよびVLバリエーション。

【図13-2】図13B~Cは、LN01抗体点突然変異バリエーションの効力を示す。B. LN01バリエーションのIC<sub>50</sub>(μg/ml)。C. IC<sub>50</sub>比(IC<sub>50</sub> LN01wt/IC<sub>50</sub> LN01バリエーション(「var.」))。

【図14-1】図14A-Dは、4つのウイルスのマルチクレードパネルに対する親LN01抗体の試験を示す。A~D. 中和パーセント(%)。

【図14-2】図14E-Hは、4つのウイルスのマルチクレードパネルに対する親LN01抗体の試験を示す。E~H. 中和パーセント(%)。

【図14-3】図14I-Kは、LN01バリエーション7、8および38の試験を示す。I. 中和パーセント(%)。J. IC<sub>50</sub>(μg/ml)。K. IC<sub>50</sub>比(IC<sub>50</sub> LN01wt/IC<sub>50</sub> LN01バリエーション(「var.」))。

【図15】図15A-Bは、7つのウイルスのマルチクレードパネルに対して、LN01バリエーション41、42、43、44、48および50の試験を示す。A. IC<sub>50</sub>(μg/ml)。B. IC<sub>50</sub>比(IC<sub>50</sub> LN01wt/IC<sub>50</sub> LN01バリエーション(「var.」))。

【図16】図16A-Bは、7つのウイルスのパネルに対して、LN01バリエーション49の試験を示す。A. IC<sub>50</sub>(μg/ml)。B. IC<sub>50</sub>比(IC<sub>50</sub> LN01wt/IC<sub>50</sub> LN01バリエーション(「var.」))。

【図17】図17は、LN01バリエーション82の試験を示す(IC<sub>50</sub>(μg/ml))。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本開示は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する特異性を有する結合剤と、このような結合剤の製造方法と、HIV感染を処置、予防および/または改善するためのこのような結合剤の使用法とに関する。

【0010】

本開示は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する結合親和性を有する結合剤に関する。いくつかの実施形態では、結合剤は、インビトロおよび/またはインビボでウイルス粒子自体の上または細胞表面上のHIV抗原に結合することができる。また、結合剤は、通常、インビトロで単離HIV抗原ならびに/またはその断片および/もしくは誘導体にも結合し得る。また、HIVに関連する1つまたは複数の疾患を診断、処置、予防および/または改善するためのこのような結合剤の使用法も提供される。例えば、結合剤は、HIVのエピトープまたはそのポリペプチドと反応および/または結合し得る抗体(例えば、モノクローナル抗体)であり得る。結合剤は、後天性免疫不全症候群(AIDS)などのHIVにより引き起こされる疾患を処置するために有用であり得る。いくつかの実施

10

20

30

40

50



形態では、本明細書に記載される結合剤は、H I V、および/またはH I V（例えば、複製可能なH I V）を含有しかつ/またはそのタンパク質を発現するH I V感染細胞を選択的に標的にしかつ/または除去し得る。いくつかの実施形態では、このような細胞は、複製可能なH I Vのリザーバーであり得る。いくつかの実施形態では、例えば、異なる特異性を有する（例えば、異なるエピトープを認識する）結合剤は、感染、複製および/または他の細胞への伝播などのH I V活性に対して組み合わせられ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される結合剤は、H I VまたはH I V発現細胞の選択的な除去および/または抑制も提供し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される結合剤は、H I Vおよび/またはH I V発現細胞を抑制および/または除去して、例えば、H I V感染および/またはA I D Sを処置するために使用され得る。他の実施形態、使用などは以下に記載される。

10

#### 【0011】

結合剤は、モノクローナル抗体などの抗体であり得る。本明細書中の実施例に示されるように、以下で議論される技術は、本明細書に記載されかつ実施例に示される特定の特徴を有する、「L N 0 1」と呼ばれる完全ヒトm A bを同定するために使用されている。L N 0 1抗体を単離し、前記抗体の可変重鎖（V<sub>H</sub>）および軽鎖（V<sub>L</sub>）ドメインのアミノ酸配列を決定した。L N 0 1などの結合剤は、その可変性および/または相補性決定領域（「C D R」）に対応するアミノ酸および/または核酸配列を参照することにより同定され得る。C D Rは、K a b a t、C h o t h i a、K a b a tおよびC h o t h i aの両方の蓄積、A b M、接触の定義、および/もしくは立体構造の定義、または当技術分野において周知の任意のC D R決定方法、抗体モデリングソフトウェア（現A c c e l r y s（登録商標））、あるいはM a c C a l l u m e t a l., 1996, J. M o l. B i o l., 262: 732 - 745により記載される、観察された抗原接触に基づくC D Rの「接触定義」に従って同定される可変領域内のアミノ酸残基を含む。C D Rの「立体構造の定義」において、C D Rの位置は、抗原結合へのエンタルピー寄与を行う残基として同定され得る（M a k a b e e t a l., 2008, J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y, 283: 1156 - 1166）。さらに他のC D R境界の定義は、上記のアプローチの1つに厳密に従わないことがあり得るが、それでも、特定の残基もしくは残基群またはさらにC D R全体が抗原結合に有意に影響を与えないという予測または実験的知見を踏まえて、これらは、短くまたは長くなり得るものの、K a b a t C D Rの少なくとも一部とオーバーラップし得る。本明細書で使用される場合、C D Rは、当該技術分野で知られている任意のアプローチ（アプローチの組合せを含む）により定義されるC D Rを指すことができる。本明細書において使用される方法は、これらのアプローチのいずれかに従って定義されるC D Rを利用し得る。2つ以上のC D Rを含有する任意の所与の実施形態について、C D Rは、K a b a t、C h o t h i a、拡張、A b M、接触、および/または立体構造の定義のいずれかに従って定義され得る。

20

30

#### 【0012】

L N 0 1およびその特定の例示的なバリエーションの重鎖C D R（C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3）、軽鎖C D R（C D R L 1、C D R L 2（およびC D R L 2長鎖）、C D R L 3）、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインのアミノ酸配列は、以下の表1に示される。

40

#### 【0013】

【表 1 - 1】

表1

LN01 領域	配列番号	アミノ酸配列 (1 文字コード)
LN01 CDRH1	1	GDSVSNNDNYY
LN01 CDRH2	2	IYYSGTT
LN01 CDRH3	3	VRMP SHGFWSTSF SYWYFDL
LN01 CDRL1	4	QSVTKY
LN01 CDRL2	-	GTY
LN01 CDRL2 (長鎖)	5	LIYGTYTLL
LN01 CDRL3	6	QQAHS TPWT
LN01 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下線)	7	EVQLVESGPGLVQPWGTL SLTCRVSGDSVSN <u>DN</u> <u>YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYYNPSLR</u> <u>NRVTISLDKSVNVVSLRLGVSAA</u> DTAQYYC <u>V</u> <u>R</u> <u>MP SHGFWSTSF SYWYFDL</u> WGRGHFVAVSW
LN01 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 および CDRL3 に下線)	8	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRILIYGTYTLLSGVSPRFSGAGS GSLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHS TPWTFGQG THVAAN
LN01 バリエント 7 可 変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下線)	9	EVQLVESGPGLVQPWGTL SLTCRVSGDSVSN <u>WN</u> <u>YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYYNPSLR</u> <u>NRVTISLDKSVNVVSLRLGVSAA</u> DTAQYYC <u>V</u> <u>R</u> <u>MP SHGFWSTSF SYWYFDL</u> WGRGHFVAVSW
LN01 バリエント 7 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 および CDRL3 に下線)	10	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRILIYGTYTLLSGVSPRFSGAGS GSLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHS TPWTFGQG THVAAN
LN01 バリエント 8 可 変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下線)	11	EVQLVESGPGLVQPWGTL SLTCRVSGDSVSN <u>DW</u> <u>YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYYNPSLR</u> <u>NRVTISLDKSVNVVSLRLGVSAA</u> DTAQYYC <u>V</u> <u>R</u> <u>MP SHGFWSTSF SYWYFDL</u> WGRGHFVAVSW
LN01 バリエント 8 可 変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 および CDRL3 に下線)	12	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRILIYGTYTLLSGVSPRFSGAGS GSLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHS TPWTFGQG THVAAN
LN01 バリエント 38 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下線)	13	EVQLVESGPGLVQPWGTL SLTCRVSGDSVSN <u>DN</u> <u>YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYYNPSLR</u> <u>NRVTISLDKSVNVVSLRLGVSAA</u> DTAQYYC <u>V</u> <u>R</u> <u>MP SHGFWSTSF SYWYFDL</u> WGRGHFVAVSW
LN01 バリエント 38 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 および CDRL3 に下線)	14	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRILIYGTYTLLSGVSPRFSGAGW GSLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHS TPWTFGQG THVAAN
LN01 バリエント 41 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下線)	15	EVQLVESGPGLVQPWGTL SLTCRVSGDSVSN <u>FN</u> <u>YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYYNPSLR</u> <u>NRVTISLDKSVNVVSLRLGVSAA</u> DTAQYYC <u>V</u> <u>R</u> <u>MP SHGFWSTSF SYWYFDL</u> WGRGHFVAVSW
LN01 バリエント 41	16	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN

10

20

30

40

【表 1 - 2】

可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 および CDRL3 に下線)		WYQFKTGQAPRILIYGTYTLLSGVSPRFGAGS GSLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGQG THVAAN	
LN01 バリアント 42 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下線)	17	EVQLVESGPGLVQPWGTLSTCRVSGDSVSNYN YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYYNPSLR NRVTISLDKSVNVVSLRLGSVSAADTAQYYCV RMPSHGFWSTSFYWFYFDLWGRGHFVAVSW	
LN01 バリアント 42 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 および CDRL3 に下線)	18	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRILIYGTYTLLSGVSPRFGAGS GSLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGQG THVAAN	10
LN01 バリアント 48 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下線)	19	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSVSNWN YYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYYNPSLR NRVTISLDKSVNVVSLRLGSVSAADTAQYYCV RMPSHGFWSTSFYWFYFDLWGRGTLTVSS	
LN01 バリアント 48 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 および CDRL3 に下線)	20	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRILIYGTYTLLSGVSPRFGAGS GSLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGQG THVAAN	20
LN01 バリアント 49 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下線)	21	EVQLVESGPGLVQPWGTLSTCRVSGDSVSNW WYYWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYYNPSL RNRVTISLDKSVNVVSLRLGSVSAADTAQYYCV RMPSHGFWSTSFYWFYFDLWGRGHFVAVSW	
LN01 バリアント 49 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 および CDRL3 に下線)	22	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRILIYGTYTLLSGVSPRFGAGS GSLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGQG THVAAN	
LN01 バリアント 82 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下線)	23	QVQLEESGPGLVQPWGTLSTCRVSGGSISSSY YWAWIRQTPGRELQVIGTIYYSGTTYYNPSLRN RVTISLDKSVNVVSLRLGSVSAADTAQYYCV RMPSHGFWSTSFYWFYFDLWGRGHFVAVSW	30
LN01 バリアント 82 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 および CDRL3 に下線)	24	DIQMTQSPSSLSASVGDKVTITCRASQSVTKYLN WYQFKTGQAPRILIYGTYTLLSGVSPRFGAGS GSLYTLTITNIQPEDFATYYCQQAHSPTWTFGQG THVAAN	
LN01 バリアント 7 および 48 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) CDRH1	25	GDSVSNWNYY	
LN01 バリアント 8 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) CDRH1	26	GDSVSNWY	
LN01 バリアント 41 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) CDRH1	27	GDSVSNFNYY	40
LN01 バリアント 42 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) CDRH1	28	GDSVSNYNY	
LN01 バリアント 43 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) CDRH1	29	GDSVSNLNY	

【表 1 - 3】

LN01 バリアント 44 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) CDRH1	30	GDSVSNINYY
LN01 バリアント 49 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) CDRH1	31	GDSVSNWWYY
LN01 バリアント 82 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) CDRH1	32	GSISSSSY

10

## 【0016】

本開示の結合剤は、例えば、表 1 に示されるアミノ酸配列のいずれか 1 つまたは複数（すなわち、配列番号 1 ~ 32 または G T Y ( L N 0 1 C D R L 2 ) のいずれか 1 つまたは複数）を含み得る。これらの断片および / または誘導体（例えば、保存的置換などの置換アミノ酸を含む）も開示される。L N 0 1 抗体（I g G 3 抗体）の例示的な誘導体は、例えば「I g G 1 L N 0 1」と呼ばれており、L N 0 1 の可変領域が I g G 1 骨格にクローン化されたものである。いくつかの実施形態では、次に、本開示の結合剤は、配列番号 1 ~ 32 の 1 つまたは複数（すなわち 1、2、3、4、5、6 または 7 つ）を含み得る。いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号 1 ~ 6 およびまたは G T Y ( L N 0 1 C D R L 2 ) のそれぞれを含むことが好ましい。いくつかの実施形態では、このような結合剤は、配列番号 7 および / もしくは配列番号 8 ; 配列番号 9 および / もしくは 10 ; 配列番号 11 および / もしくは 12 ; 配列番号 13 および / もしくは 14 ; 配列番号 15 および / もしくは 16 ; 配列番号 17 および / もしくは 18 ; 配列番号 19 および / もしくは 20 ; 配列番号 21 および / もしくは 22 ; または配列番号 23 および / もしくは 24 ; あるいはこれらの保存的置換バリエーションを含み得る。好ましい実施形態では、結合剤は、配列番号 7 および配列番号 8 ; 配列番号 9 および 10 ; 配列番号 11 および 12 ; 配列番号 13 および 14 ; 配列番号 15 および 16 ; 配列番号 17 および 18 ; 配列番号 19 および 20 ; 配列番号 21 および 22 ; もしくは配列番号 23 および 24 ; またはこれらの保存的置換バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、結合剤は、1 つまたは複数のアミノ酸置換、特に保存的置換（例えば、表 2 を参照されたい）を含む配列番号 1 ~ 32 のいずれかを含み得る。配列番号 1 ( L N 0 1 C D R H 1 ) の例示的なバリエーションには、例えば、配列番号 25 ~ 32 のいずれかが含まれる。いくつかの実施形態では、結合剤は、モノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体であり得る。いくつかの実施形態では、結合剤は、このようなモノクローナル抗体の H I V 結合断片であり得る。このような実施形態は、通常、配列番号 1 ~ 32 の少なくとも 1 つまたは複数を含むことができ、好ましくは、配列番号 1 ~ 6（または G T Y ( L N 0 1 C D R L 2 ) のそれぞれを含み、例えば、配列番号 7 ~ 8 ; 配列番号 25 ( L N 0 1 バリエーション 7 および 48 C D R H 1 ) ; 配列番号 26 ( L N 0 1 バリエーション 8 C D R H 1 ) ; 配列番号 27 ( L N 0 1 バリエーション 41 C D R H 1 ) ; 配列番号 28 ( L N 0 1 バリエーション 42 C D R H 1 ) ; 配列番号 29 ( L N 0 1 バリエーション 43 C D R H 1 ) ; 配列番号 30 ( L N 0 1 バリエーション 44 C D R H 1 ) ; 配列番号 31 ( L N 0 1 バリエーション 49、L N 0 1 バリエーション 7 C D R H 1 および L N 0 1 バリエーション 8 C D R H 1 の組合せ ) ; または配列番号 32 ( L N 0 1 バリエーション 82 C D R H 1 ) などである。いくつかの実施形態では、配列番号 70 または 71 を含む可変重鎖領域（それぞれ L N 0 1 バリエーション 13 および 14 ) ; 配列番号 70 のアミノ酸 22 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン ( W ) ( L N 0 1 バリエーション 13 ) ; 配列番号 71 のアミノ酸 23 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン ( W ) ( L N 0 1 バリエーション 14 ) ; 配列番号 72 ~ 78 のいずれかの C D R H 3 アミノ酸配列（それぞれ L N 0 1 バリエーション 18 ~ 24 ) ; 配列番号 72 のアミノ酸 8 に対応するアミノ酸におけるアラニン ( A ) ( L N 0 1 バリエーション 18 ) ; 配列番号 73

20

30

40

50

のアミノ酸 9 に対応するアミノ酸におけるアラニン (A) (L N 0 1 バリエーション 1 9) ; 配列番号 7 4 のアミノ酸 1 0 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W) (L N 0 1 バリエーション 2 0) ; 配列番号 7 5 のアミノ酸 1 1 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W) (L N 0 1 バリエーション 2 1) ; 配列番号 7 6 のアミノ酸 1 2 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W) (L N 0 1 バリエーション 2 2) ; 配列番号 7 7 のアミノ酸 1 4 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W) (L N 0 1 バリエーション 2 3) ; 配列番号 7 8 のアミノ酸 1 5 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W) (L N 0 1 バリエーション 2 4) ; 配列番号 7 9 または 8 0 を含む可変軽鎖領域 (それぞれ L N 0 1 バリエーション 3 2 および 3 3) ; 配列番号 7 9 のアミノ酸 5 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W) (L N 0 1 バリエーション 3 2) ; および / または配列番号 8 0 のアミノ酸 6 に対応するアミノ酸におけるトリプトファン (W) (L N 0 1 バリエーション 3 3) を含むバリエーションは、適切な H I V 中和活性を提供し得ないため、これらを回避することが有益であり得る。従って、いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号 1 ~ 3 2 のいずれかを含み得るが、配列番号 7 0 ~ 8 0 のいずれか 1 つまたは複数を有するものではない。他の適切な実施形態は、当業者により、本開示から誘導され得る。

#### 【 0 0 1 7 】

結合剤 (例えば、抗体、またはその抗原結合性断片) は、配列番号 1 ~ 3 2 (すなわち、表 1 に示される C D R 配列、V H 配列および / または V L 配列) の少なくとも 1 つに対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % の同一性を有する、1 つまたは複数のアミノ酸配列を含むことが好ましい。いくつかの実施形態では、その同一性パーセントは、少なくとも 3 個のアミノ酸 (例えば、L N 0 1 C D R L 2 の G T Y の場合など)、6 個のアミノ酸 (例えば、L N 0 1 C D R L 1 (配列番号 4) の場合など)、7 個のアミノ酸 (例えば、L N 0 1 C D R H 2 (配列番号 2) の場合など)、9 個のアミノ酸 (例えば、L N 0 1 C D R L 2 (長鎖) (配列番号 5)、L N 0 1 C D R L 3 (配列番号 6)、L N 0 1 バリエーション 8 2 C D R H 1 (配列番号 3 2) の場合など)、1 0 個のアミノ酸 (例えば、L N 0 1 C D R H 1 (配列番号 1) または配列番号 2 5 ~ 3 1 のいずれかの場合など)、または 2 0 個のアミノ酸 (例えば、L N 0 1 C D R H 3 (配列番号 3) の場合など) のアミノ酸配列に関するものである。以下で議論されるように、1 0 0 % 未満の同一性は、保存的置換の場合のように、別のアミノ酸による 1 つまたは複数のアミノ酸の天然または合成置換に起因し得る (例えば、表 2 を参照されたい)。配列番号 1 ~ 3 2 の種々の組合せは、当業者により本明細書に記載される技術を用いて確認され得るため、または他の方法で当業者が利用可能であり得るために有用であり得る。好ましい実施形態では、結合剤は、H I V、および / または H I V に感染しておりかつ / もしくは H I V タンパク質を発現する細胞に結合する。いくつかの特に好ましい実施形態では、結合剤は、本明細書に記載されるように H I V を中和する。好ましい実施形態では、結合剤は、H I V、および / または H I V に感染しておりかつ / もしくは H I V タンパク質を発現する細胞に結合すると共に H I V を中和する。

#### 【 0 0 1 8 】

可変領域および / または C D R 配列 (例えば、表 1) は、当業者に利用可能な 1 つまたは複数の他の可変領域 / C D R アミノ酸配列と組み合わせて使用されてもよい。このような可変領域 / C D R アミノ酸配列は、代替的および / または同様に、抗体分子の 1 つまたは複数のタイプの定常領域ポリペプチドに隣接され得る。例えば、表 1 に示される C D R アミノ酸配列は、同じまたは異なる種 (例えば、ヒト、ヤギ、ラット、ヒツジ、ニワトリ) の任意の抗体分子、および / または C D R アミノ酸配列が由来するものの抗体サブタイプの定常領域に隣接または関連され得る。例えば、例示的な結合剤は、表 1 に示されるアミノ酸配列 (例えば、L N 0 1 および I g G 1 L N 0 1) の 1 つまたは複数を含み別の結合剤とほぼ同一の中和活性を有するもの、および / または同一または類似のエピトープに結合するもの、および / またはほぼ同一の親和性を示すものであってもよく、またはこ

10

20

30

40

50

れらに由来してもよい。結合剤は、1つまたは複数の定常領域および/または可変領域をそれぞれ含む抗体重鎖および/または軽鎖を含み得る。また、本明細書に記載されるアミノ酸配列(例えば、表1に示される)のいずれか、ならびに/またはこれらの任意の断片および/もしくは誘導体は、任意の順序および/または組合せで任意の他の可変領域および/またはCDRと組み合わせられて、新しい結合剤、例えば、ハイブリッドおよび/または融合結合剤を形成してもよく、かつ/または標準的な技術を用いて他の重鎖および/または軽鎖可変領域に挿入されてもよい。

# 【0019】

また、本開示は、HIV、および/またはHIVを保有しており、かつ/もしくはHIVに感染しており、かつ/もしくはHIV抗原を発現する細胞を単離し、同定し、かつ/または標的にするためのこのような結合剤の使用も提供する。特定の実施形態では、このような結合剤は、細胞の表面で発現されるタンパク質などのHIV抗原に対して反応性であり得る。いくつかの実施形態では、結合剤は抗体である。「抗体」という用語は、非精製もしくは部分精製形態(例えば、ハイブリドーマ上清、腹水、ポリクローナル抗血清)または精製形態の抗体全体または断片化抗体を指すことができる。抗体は、例えば、マウスを含む任意の適切な起源または形態を有していてもよく(例えば、マウスハイブリドーマ細胞により産生される)、またはヒト化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体などとして発現されてもよい。例えば、抗体は、例としてヒト(例えば、IgG(IgG1、IgG2、IgG2a、Ig2b、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(IgA1およびIgA2)、IgD、およびIgE)、イヌ(例えば、IgGA、IgGB、IgGC、IgGD)、ニワトリ(例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgY)、ヤギ(例えば、IgG)、マウス(例えば、IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)、ブタ(例えば、IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)、および/またはラット(例えば、IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)抗体に完全または部分的に由来し得る。種々のタイプの抗体の調製、利用および貯蔵方法は当業者によく知られており、本発明の実施において適切であり得る(例えば、Harlow, et al. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow, et al. Using Antibodies: A Laboratory Manual, Portable Protocol No. 1, 1998; Kohler and Milstein, Nature, 256: 495 (1975); Jones et al. Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al. Nature, 332: 323-329 (1988); Presta (Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992); Verhoeyen et al. (Science, 239: 1534-1536 (1988); Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991); Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991); Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995); ならびに米国特許第4, 816, 567号明細書; 米国特許第5, 545, 807号明細書; 米国特許第5, 545, 806号明細書; 米国特許第5, 569, 825号明細書; 米国特許第5, 625, 126号明細書; 米国特許第5, 633, 425号明細書; および米国特許第5, 661, 016号明細書を参照されたい

10

20

30

40

50

）。特定の応用では、抗体は、ハイブリドーマ上清または腹水内に含有され、それ自体で直接または標準的な技術を用いて濃縮した後に利用され得る。他の応用では、抗体は、例えば、塩分別およびイオン交換クロマトグラフィー、またはアガロースビーズなどの固相担体に共有結合されたタンパク質 A、タンパク質 G、タンパク質 A / G、および / もしくはタンパク質 L リガンドを用いる親和性クロマトグラフィー、あるいはこれらの技術の組合せを使用してさらに精製され得る。抗体は、任意の適切なフォーマット、例えば、凍結調製物（例えば、- 20 または - 70 ）として、凍結乾燥形態で、または通常の冷蔵条件（例えば、4 ）下で貯蔵され得る。例えば、液体形態で貯蔵される場合、T r i s 緩衝食塩水（T B S）またはリン酸緩衝食塩水（P B S）などの適切な緩衝剤が利用されることが好ましい。いくつかの実施形態では、結合剤は、非経口的に許容できる無毒性の希釈剤または溶媒中の懸濁液などの注射用調製物として調製され得る。利用され得る適切な媒体および溶媒には、特に水、リンゲル溶液、ならびに等張性の塩化ナトリウム溶液、T B S および / または P B S が含まれる。このような調製物は、インビトロまたはインビボでの使用に適しており、当該技術分野において知られているように調製することができ、かつ正確な調製物は特定の応用に依存し得る。

#### 【0020】

しかしながら、本明細書に記載される結合剤は、決して抗体（すなわち全抗体）に限定されない。例えば、結合剤は、別のもの（例えば、模倣物）のように類似の結合特性を示す任意の化合物であり得る。例えば、例示的な結合剤は、H I V に結合し、かつ / または H I V に対する特異性を有する別の結合剤（例えば、L N O 1 などのモノクローナル抗体）と競合し得るものであり得る。いくつかの実施形態では、模倣物は、結合アッセイにおいて、比較されている結合剤（例えば、モノクローナル抗体）と実質的に同一の親和性を示すことができる。特定の結合剤の親和性は、細胞表面 H I V 抗原（例えば、ポリペプチド）の F A C S 染色を含むがこれらに限定されない任意の適切なアッセイによって測定され得る。測定値（例えば、n m）が互いにほぼ 1 ~ 20、1 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 15、または 15 ~ 20 パーセントのいずれかの範囲内にある場合、1 つの結合剤は別の結合剤と「実質的に同一の親和性」を有すると言うことができる。例示的な模倣物は、例えば、H I V に特異的に結合する有機化合物、またはアフイボディ（a f f i b o d y）（N y g r e n , e t a l . F E B S J . 275 (11) : 2668 - 76 (2008)）、アフイリン（a f f i l i n）（E b e r s b a c h , e t a l . J . M o l . B i o l . 372 (1) : 172 - 85 (2007)）、アフイチン（a f f i t i n）（K r e h e n b r i n k , e t a l . J . M o l . B i o l . 383 (5) : 1058 - 68 (2008)）、アンチカリン（a n t i c a l i n）（S k e r r a , A . F E B S J . 275 (11) : 2677 - 83 (2008)）、アビマー（a v i m e r）（S i l v e r m a n , e t a l . N a t . B i o t e c h n o l . 23 (12) : 1556 - 61 (2005)）、D A R P i n（S t u m p p , e t a l . D r u g D i s c o v . T o d a y 13 (15 - 16) : 695 - 701 (2008)）、フィノマー（F y n o m e r）（G r a b u l o v s k i , e t a l . J . B i o l . C h e m . 282 (5) : 3196 - 3204 (2007)）、クニッツ（K u n i t z）ドメインペプチド（N i x o n , e t a l . C u r r . O p i n . D r u g D i s c o v . D e v e l . 9 (2) : 261 - 8 (2006)）、および / もしくはモノボディ（m o n o b o d y）（K o i d e , e t a l . M e t h o d s M o l . B i o l . 352 : 95 - 109 (2007)）を含むことができる。他の模倣物は、例えば、抗体の誘導体、例えば、F<sub>a b</sub>、F<sub>a b</sub>2、F<sub>a b</sub>' 単鎖抗体、F<sub>v</sub>、単一ドメイン抗体、単一特異性抗体、二特異性抗体、三特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌ - ヒトキメラ抗体、イヌ - マウスキメラ抗体、イヌ Fc を含む抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、イヌ化、C D R 移植抗体（すなわち、表 1 に示される配列番号 1 ~ 32 のいずれかを含む）、サメ抗体、ナノボディ、ラクダ科抗体、マイクロボディ、および / もしくはイントラボディ、またはこれらの誘導体などを含むことができる。その他の結合剤も、当業者により理解されるように本明細書において提供される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 1 】

当業者に知られている任意の方法を使用して、H I Vに対する特異性を有する（例えば、H I Vに結合する）結合剤を作製することができる。例えば、モノクローナル抗体を作製および単離するために、マウスなどの動物は、1つまたは複数のH I Vタンパク質を投与（例えば、免疫化）され得る。活性化ヒトTリンパ球上で発現されたH I Vに対して血清反応性を示す（例えば、フローサイトメトリーおよび/または顕微鏡法で決定したときに）動物は、次に抗H I Vハイブリドーマ細胞株の生成について選択され得る。これは、複数回繰り返すことができる。また、スクリーニングは、例えば、結合剤がH I Vに対して特異的であると同定するための親和性結合および/または機能的特徴付けを含むこともできる。いくつかの実施形態、例えば、本明細書中の実施例では、H I Vに対する抗体の発現についてヒトがスクリーニングされ得る。いくつかの実施形態では、抗H I V抗体、特に中和抗体を発現する人を同定するために、H I Vに感染したヒトの血漿サンプルがスクリーニングされ得る。次に、このような人の中和抗体産生細胞を単離した後、それにより産生された抗体の単離および特徴付けを行うことができる（例えば、本明細書中の実施例のように）。中和抗体は、H I Vによる細胞の感染を中和または阻害する能力を示すものであり得る。一般に、中和アッセイは、通常、ウイルスと特異的抗体との反応によるウイルスの感染力の損失を測定する。通常、感染力の損失は、標的細胞への結合、侵入、および/またはウイルス放出を含むが、これらに限定されないウイルス複製ステップのいずれかとの結合抗体による干渉によって引き起こされる。非中和ウイルスの存在は、当業者に利用可能なシステムのいずれか（例えば、ルシフェラーゼに基づくシステム）を用いて標的細胞の感染を測定することにより、所定の時間後、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12または14日後に検出される。中和アッセイの非限定的な例は、所与の量のウイルスまたは偽型ウイルス（以下を参照されたい）を組み合わせることを含み得、種々の濃度の試験または対照（通常、正および負の対照が別々にアッセイされる）抗体が適切な条件（例えば、室温で1時間）下で混合され、次に適切な標的細胞培養物（例えば、T Z M - b 1細胞）に接種される。例えば、結合剤産生細胞（例えば、B細胞産生抗体）は、エプスタイン - バーウイルス（E B V）（記憶B細胞もポリクローナルに刺激する）、成長因子の混合物（例えば、T L R 9アゴニストC p G - 2 0 0 6、I L - 2（1 0 0 0 I U / m l）、I L - 6（1 0 n g / m l）、I L - 2 1（1 0 n g / m l）、および抗B細胞受容体（B C R）ヤギ抗体（B C Rを誘発する）の存在下において、ヒトフィーダー細胞における単一細胞マイクロ培養（single cell micro-culture）としてこのような細胞を別々のプレートに播種することにより、H I V - 1中和抗体の産生についてアッセイされ得る。適切な時間後（例えば、14日後）、このような培養物の上清は、このような細胞を生産的に感染させる2つ以上の代表的なH I V - 1ウイルスまたは偽型ウイルスを用いて、ルシフェラーゼに基づく一次スクリーニングシステムにおいて試験され得る。偽型ウイルスはB細胞培養物の上清と共に適切な時間および温度（例えば、37%（5% C O<sub>2</sub>）で1時間）でインキュベートされた後、宿主細胞（例えば、3000のT Z M - b 1細胞）が添加され得る。その後、適切な時間（例えば、72時間）のインキュベーションが行われた後、上清が除去され、Steady l i t e 試薬（P e r k i n E l m e r）が添加され得る（例えば、15 μ l）。次に、S y n e r g y マイクロプレートルミノメーター（B i o T e k）においてルシフェラーゼ活性が決定され得る（例えば、5分後）。負の対照に対して低下したルシフェラーゼ活性は、通常、ウイルスの中和を示す。本開示の結合剤を分析するのに適したこれらのような中和アッセイは、当該技術分野において知られている（例えば、M o n t e f i o r i , D . C . C u r r . P r o t o c o l . I m m u n o l . C h a p t e r 1 2 , U n i t 1 2 . 1 1（2005）; E d m o n d s , e t a l . V i r o l o g y , 4 0 8（1）: 1 - 1 3（2010）; S e a m a n , e t a l . J . V i r o l . 8 4（3）: 1 4 3 9 - 1 4 5 2（2010）; P a c e , e t a l . P N A S U S A , 1 1 0（33）: 1 3 5 4 0 - 1 3 5 4 5（2013）を参照されたい）。いくつかの実施形態では、試験サンプルは、H I V偽型ウイルスのパネル（例えば、本明細書中の実施

10

20

30

40

50



例で実行されるように、H I V - 1 参照株の包括的パネルからの 9 個の H I V - 1 偽型ウイルス（これらの偽型ウイルスは、B J O X ( C R F 0 0 7 \_ B C )、C E 1 1 7 6 ( C )、T R O . 1 1 ( B )、X 1 6 3 2 ( G )、C H 1 1 9 ( C R F 0 7 \_ B C )、C N E 5 5 ( C R F 0 1 \_ A E )、2 5 7 1 0 ( C )、2 4 6 F 3 ( A C )、C E 0 2 1 7 ( C )である)；DeCamp, A. et al. Global panel of HIV - 1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine - elicited neutralizing antibodies. J Virol 88, 2489 - 2507 (2014) を中和することができる抗体の存在についてスクリーニングされ得る。また、より大きい偽型ウイルスのパネルの中和も試験することができ、例えば、de Camp et al. は、12 個の偽型ウイルス (H I V - 1 Env 参照株としても知られている)：398F1、25710、CNE8、TRO11、X2278、BJOX2000、X1632、CE1176、246F3、CH119、CE0217、およびCNE55 のグループを記載している。いくつかの実施形態では、10 個の H I V 単離物のパネルを試験することができ、9 個の偽型ウイルスのパネルの 6、7、8、9 個のメンバー；または 12 個の偽型ウイルスのパネルの 6、7、8、9、10、11 もしくは 12 個のメンバーを中和するものとして BNA が同定され得る。また、このような偽型ウイルスのより大きいパネル（例えば、本明細書中の実施例のように、118 個の偽型ウイルスのパネル）のスクリーニングも実行され得る。実施例で使用される、試験サンプルが中和抗体について試験され得る 118 個の偽型ウイルスの例示的なパネルは、例えば、図 4 に示されるもの（クレード A、クレード B、クレード C、クレード D、クレード G、循環組換え形態 C R F 1 0 \_ C D、C R F 0 1 \_ A E、C R F 0 2 \_ A G および C R F 0 7 \_ B C、ならびに非循環組換え体 A C および A C D 株を含む）を含むことができる。いくつかの実施形態では、中和は、ウイルス感染の約 50%、60%、70%、80%、90%、95%、または 99% のいずれかを中和することができるモノクローナル抗体の濃度（例えば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の尺度として決定され得る（「 $\text{IC}_{50}$ 」値）。いくつかの実施形態では、結合剤は、例えば、約  $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、または  $10^3 \mu\text{g}/\text{ml}$  のいずれかの濃度でウイルス感染の 50% を中和することができる場合、中和性であると考えることができる（図 3 に示されるような  $\text{IC}_{50}$  値）。いくつかの実施形態では、本明細書中の実施例のように、この  $\text{IC}_{50}$  値は 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  よりも低く、さらにより好ましくは、約 15、10、5、2、1、0.5、0.25、0.1、0.05、または 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のいずれかよりも低いことが好ましい。好ましい実施形態では、本明細書に記載される LN01 抗体のように、 $\text{IC}_{50}$  値は 0.011 未満であり得る（例えば、図 7）。いくつかの実施形態では、中和抗体がウイルス感染を中和する能力は、中和パーセント（例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または 99%（例えば、図 3 のように））として表すこともできる。また、当業者により決定され得るように、他の中和の尺度も適切であり得る。

#### 【0022】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される結合剤は、H I V に感染した人から得られる生体サンプル（例えば、血漿）中で同定された広域中和抗体（BNA）であり得る。上記のようにかつ本明細書中の実施例に示されるように、このような BNA は、マルチクレード H I V 単離物を中和する能力について、慢性的に H I V に感染した患者（好ましくは、抗レトロウイルス療法を受けていない）の血漿サンプルを試験することによって同定され得る（例えば、最初に偽型ウイルスの 9 個または 12 個のメンバーからなるパネルを用い、次により大きいパネル（例えば、118 個のメンバー）を用いる）。いくつかの実施形態では、サンプルは、血漿 1 ml 当たり 50 未満の H I V RNA コピーのウイルス血症を有する「エリートコントローラー」であることが分かっている患者から得ることができる。これらのようなスクリーニング手順の結果、患者の同定が得られ、これらの患者は、その後、BNA を産生する B 細胞の単離および特徴付けのためのリンパ節ドナー

としての機能を果たし得る。このようなスクリーニングアッセイの実行において、中和活性は、通常、マウス白血病ウイルス（MLV）偽型ウイルスなどの負の対照と比較される。

#### 【0023】

いくつかの実施形態では、中和結合剤（例えば、抗体）を発現する患者の胚中心および記憶IgG B細胞が単離され、さらに研究され得る。いくつかの実施形態では、細胞は、IgG（例えば、IgAおよびIgM陰性細胞）、CD19、およびCD38発現（胚中心B細胞はCD38陽性）に従って別々に選別され（例えば、図2を参照されたい）、HIV-1中和抗体の産生について調べられる。例えば、高純度のIgG記憶B細胞およびIgG胚細胞は、エプスタイン-バーウイルス（EBV）（記憶B細胞もポリクローナルに刺激する）および成長因子などの混合物（例えば、TLR9アゴニストCpG-2006、IL-2（1000 IU/ml）、IL-6（10 ng/ml）、IL-21（10 ng/ml）、および抗BCRヤギ抗体（B細胞受容体（BCR）を誘発）で構成される）の存在下において、ヒトフィーダー細胞における単一細胞マイクロ培養として別々のプレートに播種され得る。このような培養物（例えば、14日目の培養物から）の上清は、次に一次スクリーニング（例えば、本明細書中の実施例に示されるように、クレードCおよびCRF07の代表である2つの株、CE1176およびBJOX2000を並行して使用して、384ウェルベースのHIV-1偽型ウイルス中和アッセイを用いる）において試験され得る。中和アッセイは、任意の適切な宿主細胞（例えば、TZM-bl細胞（Seaman, et al., J. Virol., 84(3): 1439-52 (2010) ; NIH AIDS Reagent Program Catalog Number 8129））を用いて実行され得る。著しい出力の相対光単位（RLU）（例えば、50~100×10<sup>4</sup> RLU）（すなわち細胞の増殖性感染を示す）をもたらすHIV-1偽型ウイルスは、次にB細胞培養物の上清と共に適切な時間および温度（例えば、37%（5% CO<sub>2</sub>）で1時間）でインキュベートされた後、宿主細胞（例えば、3000のTZM-bl細胞）が添加され得る。その後、通常、適切な時間（例えば、72時間）のインキュベーションが行われた後、上清が除去され、Steady-lite 試薬（Perkin Elmer）が添加され得る（例えば、15 μl）。次に、Synergy マイクロプレートルミノメーター（BioTek）においてルシフェラーゼ活性が検出される（例えば、5分後）。ルシフェラーゼ活性の低下は、より少ない量のウイルスが細胞により放出されることおよびウイルスの中和を示す。例えば、特定の偽型ウイルスの基礎RLUが50~100×10<sup>4</sup> RLUであれば、中和抗体は、その偽型ウイルスのRLUを、25~50×10<sup>4</sup> RLUまで低下させ（すなわち50%の低下）、またはそれよりも低い値まで低下させることが決定され得る。このような系を用いて、株を交差中和させることができる上清が同定され、さらに収集され、他の偽型ウイルスを中和するその能力について試験され得る。

#### 【0024】

このような中和抗体含有培養物から得られる抗体は、次に抗体可変領域および相補性決定領域（CDR）領域のアミノ酸およびヌクレオチド配列を決定することによってさらに特徴付けされ得る。これらの技術を用いて、「LN01」と呼ばれるHIV中和結合剤を、表1に示されるCDR、VHおよびVL配列（配列番号1~7および/またはGTY）を有するIgG3型完全ヒトモノクローナル抗体として同定した。LN01はIGHV4-39\*07およびIGKV1-39\*01生殖系列遺伝子に由来し、生殖系列と比較して重鎖（28%）およびカッパ軽鎖（27%）の両方の可変遺伝子において体細胞性に高度に突然変異されていることが決定された。また、LN01は、20個のアミノ酸で構成される長い重鎖相補性決定3領域（「CDRH3」）ループを有することも見出された。いくつかの実施形態では、結合剤の可変重鎖（V<sub>H</sub>）および可変軽鎖（V<sub>L</sub>）遺伝子は、次に同一または異なるアイソタイプのIgG発現ベクターにクローン化され得る。実施例に示されるように、例えば、LN01 CDRをコードする核酸（表3）をIgG1骨格にクローン化し、適切な宿主細胞（例えば、Exp293F細胞）をトランスフェクト

することにより、組換えのIgG1ベースの抗体(IgG1-LN01)を作製した。抗体全長IgG1ベースの抗体は、次に標準的な技術を用いて精製され得る(例えば、全長IgG1ベースの抗体は、組換えプロテインAカラム(GE-Healthcare)を用いて精製され得る)。組換えで産生されたIgG1抗体は、次に適切な宿主細胞(例えば、TZM-bl細胞)において、本明細書に記載されるもののいずれかなどの偽型ウイルスのパネルのいずれか(例えば、実施例で使用される9個のHIV-1参照偽型ウイルスの包括的パネル)に対して試験され得る。好ましい実施形態では、結合剤は、負の対照ウイルス(例えば、MLV偽型ウイルス)を中和することなく、偽型ウイルスパネルメンバー(例えば、9、12または118個のメンバーを含む)の大部分(すなわち、少なくとも約50%以上)を中和する能力を示す。結合剤は、中和と考えられる $IC_{50}$ 値(以下を参照されたい)でこのようなウイルスの大部分を中和する能力(例えば、約50%よりも多くの中和、例えば、約60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%のいずれかの中和)を示すことが好ましい。例えば、いくつかの実施形態では、本開示の結合剤は、約 $10^0 \mu g/ml$ 以下において、HIV-1偽型ウイルスBJOX(CRF07\_BC)、CE1176、TRO.11(B)、X1632(G)、CH119(CRF07\_BC)、CNE55(CRF01\_AE)、25710(C)、CD0217(C)の中和を示すことができるが、対照ウイルスSVA-MLVの中和を示さない(図3)。いくつかの実施形態では、HIV-1偽型ウイルスの中和は、抗体濃度が $10^2 \sim 10^0 \mu g/ml$ 、または $10^0 \sim 10^1 \mu g/ml$ である場合に観察され得る(図3)。いくつかのこのような実施形態では、結合剤による中和パーセントは、少なくとも約50%である(図3)。いくつかの実施形態では、1つのHIV-1単離物の感染は、この単離物の少なくとも1つの単離物の感染が $25 \mu g/ml$ 未満の $IC_{50}$ で中和される場合、 $25 \mu g/ml$ 未満の $IC_{50}$ で結合剤(例えば、抗体)により中和されると考えられる。いくつかの実施形態では、図4に記載される118個のHIV-1偽型ウイルスの大部分が、 $25 \mu g/ml$ 未満、例えば、約 $10 \mu g/ml$ 、 $9 \mu g/ml$ 、 $8 \mu g/ml$ 、 $7 \mu g/ml$ 、 $6 \mu g/ml$ 、 $5 \mu g/ml$ 、 $4 \mu g/ml$ 、 $3 \mu g/ml$ 、 $2 \mu g/ml$ 、 $1 \mu g/ml$ 、 $0.9 \mu g/ml$ 、 $0.8 \mu g/ml$ 、 $0.7 \mu g/ml$ 、 $0.6 \mu g/ml$ 、 $0.5 \mu g/ml$ 、 $0.4 \mu g/ml$ 、 $0.3 \mu g/ml$ 、 $0.2 \mu g/ml$ 、 $0.1 \mu g/ml$ 、 $0.09 \mu g/ml$ 、 $0.08 \mu g/ml$ 、 $0.07 \mu g/ml$ 、 $0.06 \mu g/ml$ 、 $0.05 \mu g/ml$ 、 $0.04 \mu g/ml$ 、 $0.03 \mu g/ml$ 、 $0.02 \mu g/ml$ 、または $0.01 \mu g/ml$ の $IC_{50}$ で中和されると考えられる場合、結合剤は中和性であると考えることができる。好ましい実施形態では、結合剤は、ID6535.3、QH0692.42、SC422661.8、PVO.4、TRO.11、PEJO4541.67、WITO4160.33、1006\_\_11\_\_C3\_\_1601、1054\_\_07\_\_TC4\_\_1499、1056\_\_TA11\_\_1826、1012\_\_11\_\_TC21\_\_3257、6244\_\_13\_\_B5\_\_4576、SC05\_\_8C11\_\_2344、Du156.12、Du172.17、Du422.1、ZM197M.PB7、ZM214M.PL15、ZM233M.PB6、ZM249M.PL1、ZM109F.PB4、ZM135M.PL10a、HIV-0013095-2.11、HIV-16055-2.3、HIV-16845-2.22、Ce1086\_\_B2、Ce1176\_\_A3、Ce0682\_\_E4、Ce1172\_\_H1、ZM247v1(Rev-)、3016.v5.c45、A07412M1.vrc12、231966.c02、CNE20、CNE21、CNE17、CNE30、CNE53、CNE58、9004SS\_\_A3\_\_4、928-28、263-8、T255-34、211-9、235-47、CNE8、C1080.c03、R2184.c04、R1166.c01、C2101.c01、C3347.c11、BJOX015000.11.5、BJOX010000.06.2、BJOX025000.01.1、BJOX028000.10.3、X1193\_\_c1、X2131\_\_C1\_\_B5、P1981\_\_C5\_\_3、6952.v1.c20、および0815.v3.c3のHIV-1偽型ウイルス株を約 $1 \mu g/ml$ 以下の $IC_{50}$ で中和することができる(図4)。いくつかの好ましい実施形態では、

結合剤は、ID QH0692.42、SC422661.8、PVO.4、TRO.11、PEJO4541.67、WITO4160.33、1006\_\_11\_\_C3\_\_1601、1054\_\_07\_\_TC4\_\_1499、1056\_\_TA11\_\_1826、6244\_\_13\_\_B5\_\_4576、SC05\_\_8C11\_\_2344、Du156.12、Du172.17、ZM197M.PB7、HIV-0013095-2.11、HIV-16055-2.3、HIV-16845-2.22、Ce1086\_\_B2、Ce1172\_\_H1、ZM247v1(Rev-)、3016.v5.c45、A07412M1.vrc12、CNE20、CNE21、CNE53、CNE58、9004SS\_\_A3\_\_4、928-28、263-8、T255-34、CNE8、C1080.c03、BJOX015000.11.5、BJOX010000.06.2、BJOX025000.01.1、BJOX028000.10.3、X2131\_\_C1\_\_B5、P1981\_\_C5\_\_3、6952.v1.c20、および0815.v3.c3のHIV-1偽型ウイルス株を約0.5 μg/ml以下のIC<sub>50</sub>で中和することができる(図4)。いくつかの好ましい実施形態では、結合剤は、ID1054\_\_07\_\_TC4\_\_1499、1056\_\_TA11\_\_1826、6244\_\_13\_\_B5\_\_4576、Du172.17、HIV-0013095-2.11、HIV-16845-2.22、Ce1172\_\_H1、CNE20、CNE21、928-28、CNE8、P1981\_\_C5\_\_3のHIV-1偽型ウイルス株を約0.1 μg/ml以下のIC<sub>50</sub>で中和することができる(図4)。結合剤は、クレード依存性を示さないことがさらに好ましい。例えば、いくつかの実施形態では、結合剤は、HIV-1クレードB、B(T/F)、C、C(T/F)、D、D(T/F)、BC、A、A(T/F)、CRF02\_\_AG、CRF01\_\_Ae、CRF01\_\_AE(T/F)、G、CD、ACおよびACDの偽型ウイルスを中和する能力を示し得る(図4)。いくつかの好ましい実施形態では、結合剤は、クレードB、B(T/F)、C、C(T/F)、D、BC、A、A(T/F)、CRF02\_\_AG、CRF01\_\_Ae、CRF01\_\_AE(T/F)、G、CD、およびACDのそれぞれの中の少なくとも1つの偽型ウイルスを約1 μg/ml以下のIC<sub>50</sub>で中和し得る(図4)。いくつかの好ましい実施形態では、結合剤は、クレードB、B(T/F)、C、C(T/F)、D、BC、A(T/F)、CRF02\_\_AG、CRF01\_\_Ae、CRF01\_\_AE(T/F)、G、CD、およびACDのそれぞれの中の少なくとも1つの偽型ウイルスを約0.5 μg/ml以下のIC<sub>50</sub>で中和し得る(図4)。いくつかの好ましい実施形態では、結合剤は、クレードB(T/F)、C、C(T/F)、BC、A(T/F)、CRF02\_\_AG、CRF01\_\_AE、CRF01\_\_AE(T/F)、G、およびCDのそれぞれの中の少なくとも1つの偽型ウイルスを約0.1 μg/ml以下のIC<sub>50</sub>で中和し得る(図4)。いくつかの実施形態では、結合剤は、これらの特性のいずれか1つもしくは複数、および配列番号1~32の1つもしくは複数、好ましくは配列番号1~7のそれぞれおよび/もしくは配列番号8~9、ならびに/またはこれらの断片および/もしくは誘導体を含む。これらは、図4に示されるようにIgG1 LN01などのLN01タイプの結合剤の特徴である。

【0025】

いくつかの実施形態では、結合剤は、1つまたは複数のタイプのFc受容体を発現する細胞または発現しない細胞(例えば、実施例の場合のように、親TZM-bl細胞、およびFc-ガンマ受容体I(CD64)を発現するTZM-bl細胞;例えば、Perez, et al. Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. J Virol 83, 7397-7410 (2009); NIH AIDS Reagent Program Catalog No. 11798を参照されたい)を用いて、HIV参照偽型ウイルス(例えば、上記の9個のHIV-1参照偽型ウイルスの包括的パネル)に対する中和能について試験され得る。Fc受容体を発現する細胞における中和活性の増強は、抗体にウイルス阻害のための動力学的

利点を提供し得る。この動力学的利点は、抗体に特有である可能性があり、そのエピトープは、アクセスすることが困難であるか、または融合の初期段階中に E n v タンパク質の中間構造においてごく短時間暴露されると考えられる。また、F c - ガンマ受容体は、H I V - 1 中和を潜在的に促進する可能性もあり、それは食作用であり、それにより抗体の中和能が増大される。今までのところ、T Z M - b 1 細胞株を構築した H e L a 細胞は、ノンプロフェッショナルな食細胞の特性を示すことが知られている。従って、その表面に F c - ガンマ受容体を導入することにより、T Z M - b 1 細胞がプロフェッショナルな食細胞に変換された可能性がある。H I V - 1 中和抗体に対する任意の F c - ガンマ受容体媒介性抗ウイルス薬の効果は、侵入阻害によるか食作用によるかにかかわらず、H I V の処置およびワクチンの投与計画において有益であり得る。F c - ガンマ受容体は、C D 4 + リンパ球上でめったに発現されないが、いくつかの他の H I V - 1 感受性細胞型は、複数の F c - ガンマ受容体を発現し、性感染と、長寿命のウイルスリザーバーの早期確立とに關与する。特に、マクロファージは、粘膜暴露後にウイルスが遭遇する最初の感染感受性細胞の 1 つであり、慢性感染において、長寿命のウイルスリザーバーとしての機能を果たすと考えられる。マクロファージならびに単球および樹状細胞の特定のサブセットは、複数の F c - ガンマ受容体を発現することが知られている。また、F c - ガンマ受容体が、抗原取込み、抗原提示、細胞活性化および B 細胞寛容を促進することにより、適応免疫および末梢寛容の調節に關与することに言及することも重要である。従って、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される結合剤は、F c 受容体の発現を誘発および / または増強する薬剤と併せて使用することができ、本明細書に記載される結合剤による処置と共に、または併せて 1 つまたは複数の F c 受容体をコードする核酸の導入することが含まれる。

10

20

30

40

#### 【0026】

本明細書に記載される結合剤の特異性は、当業者に利用可能な多数の技術のいずれかを用いて決定され得る。例えば、本明細書中の実施例に示されるように、特定のエピトープに関する結合剤（例えば、I g G 1 L N 0 1 抗体）の特異性は、中和能について試験するためにキメラ偽型ウイルスのパネル（例えば、親 H I V - 2 / 7 3 1 2 A 内に H I V - 1 M P E R の種々のセグメントを含有する H I V - 2 / H I V - 1 キメラ）を用いて確認され得る。例えば、本明細書中の実施例は、I g G 1 L N 0 1 抗体が親 H I V - 2 7 3 1 2 A 株を中和しないことを実証する。しかしながら、I g G 1 L N 0 1 抗体は、H I V - 2 M P E R ( L A S W V K Y I Q ( 配列番号 6 5 ) ) の 6 個の残基が H I V - 1 M P E R 領域の残基で置換された ( I T K W L W Y I K ( 配列番号 6 6 ) ) キメラウイルス 7 3 1 2 A . C 4 を強力に中和することが見出された。また、I g G 1 L N 0 1 抗体は、同じ領域内の 3 個の残基のみが置換された ( I T S W I K Y I Q ( 配列番号 6 7 ) ) キメラウイルス 7 3 1 2 A . C 6 を中和しないことも見出された（例えば、図 7 を参照されたい）。キメラウイルス 7 3 1 2 A . C 4 と同じ 6 個の変化が、N 末端領域における付加的な 7 個の突然変異と組み合わせられたキメラウイルス 7 3 1 2 A . C 1 C を用いて同様の知見が得られた。これらの結果は、g p 4 1 M P E R の C 末端領域のアミノ酸残基 L 6 7 9、W 6 8 0 および K 6 8 3 が、I g G 1 L N 0 1 抗体の結合に關与することを示す。従って、いくつかの実施形態では、結合剤は、G e n B a n k 受入番号 K 0 3 4 5 5 ( N C B I G e n P e p t 受入番号 A A B 5 0 2 6 2 ) の H I V - 1 エンベロープアミノ酸配列、例えば、配列番号 6 8 ( L 6 7 9、W 6 8 0 および K 6 8 3 に下線 ) :

1	MRVKEKYQHL	WRWGWRWGT	LLGMLMCSA	TEKLWVTVYY	GVPVWKEATT	TLFCASDAKA
61	YDTEVHNVA	THACVPTDPN	PQEVVLNVNT	ENFNMWKNDM	VEQMHEDIIS	LWDQSLKPCV
121	KLTPLCVSLK	CTDLKNDTNT	NSSSGRMIME	KGEIKNCSFN	ISTSIRGKVQ	KEYAFFYKLD
181	IIPIDNDTTS	YKLTSCNTSV	ITQACPKVSF	EPIPIHYCAP	AGFAILKCNN	KTFNGTGPCT
241	NVSTVQCTHG	IRPVVSTQLL	LNGSLAEEEV	VIRSVNFTDN	AKTIIVQLNT	SVEINCTRPN
301	NNTRKRIRIQ	RGPGRFVTI	GKIGNMRQAH	CNISRAKWNN	TLKQIASKLR	EQFGNNKTII
361	FKQSSGGDPE	IVTHSFNCGG	EFFYCNSTQL	FNSTWFNSTW	STEGSNNTG	SDTITLPCRI
421	KQIINMWQKV	GKAMYAPPIS	GQIRCSSNIT	GLLLTRDGGN	SNNSEIFRP	GGGDMDNRWR
481	SELYKYKVVK	IEPLGVAPTK	AKRRVVQREK	RAVGIGALFL	GFLGAAGSTM	GAASMTLTVQ
541	ARQLLSGIVQ	QQNNLLRAIE	AQQHLLQLTV	WGIKQLQARI	LAVERYLKDQ	QLLGIWGCSG
601	KLICTTAVPW	NASWSNKSLE	QIWNHTTWME	WDREINNYTS	LIHSLIEESQ	NQQEKNEQEL
661	LELDKWASLW	NWFNITNWLW	YIKLFIMIVG	GLVGLRIVFA	VLSIVNRVRQ	GYSPLSFQTH
721	LPTPRGPDRP	EGIEEEGGER	DRDRSIRLVN	GSLALIWDLL	RSLCLFSYHR	LRDLLLIVTR
781	IVELLGRRGW	EALKYWNNLL	QYWSQELKNS	AVSLLNATAI	AVAEGTDRVI	EVVQGACRAI
841	RHIPRRIRQG	LERILL	(配列番号 68)			

10

## 【 0 0 2 7 】

または当業者に理解され得るようなこれらの均等物において見出されるように、アミノ酸残基 L 6 7 9、W 6 8 0 および K 6 8 3 を含む g p 4 1 を発現する H I V を結合および / または中和する能力を示す。例示的な g p 4 1 ポリペプチドは、以下に示される：

AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTV  
WGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWM  
EWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMI  
VGGLVGLRIVFAVLSIVNRVRQG (配列番号 69)

20

## 【 0 0 2 8 】

別の例示的な g p 4 1 ポリペプチドは、GenBank 受入番号 1 1 0 3 2 9 9 B を有する (Meusing, et al. Nature 313 (6002), 450 - 458 (1985))。アミノ酸残基 L 6 7 9、W 6 8 0 および K 6 8 3 の例示的な均等物は、配列番号 1 4 (および GenBank 受入番号 1 1 0 3 2 9 9 B) の下線を引いたアミノ酸残基 L 1 6 8、W 1 6 9 および K 1 7 2 である。いくつかの実施形態では、結合剤は、アミノ酸配列 I T K W L W Y I K (配列番号 6 6) を発現する H I V を結合および / または中和する能力を示す。いくつかの実施形態では、結合剤は、アミノ酸配列 I T K W L W Y I K (配列番号 6 6) を発現する H I V を結合および / または中和するが、L A S W V K Y I Q (配列番号 6 5) および / または I T K W I K Y I Q (配列番号 6 7) を発現する H I V を結合および / または中和しない能力を示す。いくつかの実施形態では、結合剤が結合する (すなわち、特異性を有する) エピトープは、H I V e n v (例えば、配列番号 6 8) のアミノ酸残基 L 6 7 9、W 6 8 0 および K 6 8 3、またはこれらの均等物を含む。g p 4 1 に関して、好ましい実施形態では、結合剤が結合する (すなわち、特異性を有する) エピトープは、配列番号 6 9 のアミノ酸残基 L 1 6 8、W 1 6 9 および K 1 7 2、またはこれらの均等物を含む。いくつかの実施形態では、本開示の結合剤は、上記の中和特徴 (すなわち、 $10^2 \sim 10^0 \mu\text{g/ml}$ 、または  $10^0 \sim 10^1 \mu\text{g/ml}$  の濃度で少なくとも約 50% まで H I V - 1 偽型ウイルス B J O X (C R F 0 7 \_\_ B C)、C E 1 1 7 6、T R O . 1 1 (B)、X 1 6 3 2 (G)、C H 1 1 9 (C R F 0 7 \_\_ B C)、C N E 5 5 (C R F 0 1 \_\_ A E)、2 5 7 1 0 (C)、C D 0 2 1 7 (C) を中和するが、対照ウイルス S V A - M L V を中和せず (図 3)、および  $25 \mu\text{g/ml}$  未満の I C<sub>50</sub> で、図 4 に記載される 1 1 8 個の H I V - 1 偽型ウイルスの大部分を中和する) と共に、これらの結合特異性を含み得る。

30

40

## 【 0 0 2 9 】

ペプチドマイクロアレイも、本明細書に記載される結合剤の結合特異性を決定するために代替的および / または同様に使用され得る。1 つまたは複数のペプチドマイクロアレイは、重複ペプチドが H I V ポリペプチドアミノ酸配列全体を包含するように設計され得る。例えば、本明細書中の実施例に示されるように、クレード A、B、C、D、グループ M、C R F 0 1 \_\_ A E および C R F 0 2 \_\_ A G のコンセンサス H I V - 1 E n v g p 1 6 0 配列をカバーする 1 4 2 3 の重複 (1 2 個のアミノ酸による) 1 5 - m e r ペプチド

50

によって形成されるペプチドマイクロアレイを利用して、結合剤 I g G 1 L N 0 1 の特異性を試験した。本明細書中の実施例では、ペプチドを 3 D - エポキシガラススライド上に印刷し、GenePix 4000 B スキャナーを用いて分析した (Tomaras, G. D. et al. Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals. J Virol 85, 11502-11519 (2011)) が、当業者に利用可能な任意の適切なシステムを利用することができる。結合剤は、対照結合剤と共に試験され得る (例えば、本明細書中の実施例では、gp 41 の免疫優性領域に対する特異性を有する 7 B 2 と呼ばれる対照抗体と並行して、I g G 0 1 L N 0 1 を 20 μg/ml で試験した)。10  
マイクロアレイ内のペプチドへの結合剤の結合は、任意の適切なプロセスにより、例えば、本明細書中の実施例では DyLight 649 標識化ヤギ抗ヒト I g G とのインキュベーションにより検出され得る。蛍光強度は、任意の適切なシステムにより、例えば、本明細書中の実施例のように GenePix 4000 B スキャナー / GenePix ソフトウェアにより測定され得る (例えば、図 8 を参照されたい)。本明細書中の実施例に示されるように、I g G 1 L N 0 1 抗体は、そのライブラリー内のペプチドのいずれとも明白に反応しなかったが、対称抗体 (7 B 2) は、gp 41 免疫優性領域にわたる 190 ~ 195 のペプチドと強力に反応し、I g G 1 L N 0 1 抗体は HIV-1 Env の直鎖エピトープを認識しないことが示された。また、本明細書で企図される結合剤のいずれかにおいて同様の試験が実施され得る。20

#### 【0030】

また、結合剤の特異性は、HIV タンパク質を示す可溶性トリマー (例えば、本明細書中の実施例で使用されるように、サブタイプ A 伝達 (transmitted) / 創始 (founder) 株、BG 505 に基づく可溶性の切断型 SOSIP. 664 gp 140 トリマー) への結合についても試験され得る。好ましいトリマー (例えば、本明細書中の実施例で使用されるもの) は、高度に安定し、同種であり、かつネガティブ染色電子顕微鏡法 (EM) により可視化したときに天然のウイルススパイクによく類似しているものである (Sanders, R. W. et al. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG 505 SOSIP. 664 gp 140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. PLoS Pathog. 9, e1003618 (2013))。通常、HIV-1 Env 上の複数の中和エピトープに対する広域中和抗体は、このようなトリマー (例えば、4 エピトープ抗体 (CH 01、PG 9、PG 16 および PGT 145) を含む、BG 505 SOSIP. 664 gp 140 トリマー) と非常によく反応するであろう。反対に、CD 4 結合部位、CD 4 誘発性エピトープまたは gp 41 外部ドメインに対する非中和抗体 (NA b) は、そのエピトープが Env のより簡単な形態 (例えば、gp 120 モノマーまたは解離 gp 41 サブユニット) 上に存在する場合でもトリマーと反応しないであろう (および実施例において反応しなかった)。また、実施例は、トリマーの可溶性を改善し、凝集体の形成を低減するために M P E R を欠失させた、本明細書に記載される結合剤のいずれかを試験する際に使用することができる試験も含む。また、結合剤は、可溶性 CD 4 (sCD 4) の存在下または非存在下において、このようなトリマーへの結合について試験され得る。本明細書中の実施例には、sCD 4 の存在下または非存在下において、BG 505 SOSIP. 664 gp 140 トリマーへの結合についての、I g G 1 L N 0 1、PGT 145 (V1-V2 グリカン特異的)、PGT 151 (gp 120 と gp 41 との間の界面の部位に結合) および 17b (CD 4 結合誘発部位に結合) 抗体の試験 (表面プラズモン共鳴 (SPR) により測定される) が記載される。そこに示されるように、PGT 145 および PGT 151 抗体は、sCD 4 の存在下または非存在下において、BG 505 SOSIP. 664 gp 140 トリマーに強く反応し; 17b は、sCD 4 の存在下においてのみ B G 30  
40  
50

505 SOSIP.664 gp140トリマーに反応し；およびIgG1 LN01は、sCD4の存在下でも非存在下でもBG505 SOSIP.664 gp140トリマーと反応しなかった（例えば、図9を参照されたい）。また、本明細書で企図される結合剤のいずれかにおいて同様の試験が実施され得る。

#### 【0031】

ELISAなどの他のアッセイシステムも、本明細書で企図される結合剤を試験するために使用され得る。例えば、実施例に示されるように、MPER特異的10E8抗体（Huang, J. et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. Nature 491, 406-412 (2012)）と並行して、IgG1 LN01抗体を、HIV-1抗原のパネル（ConsB、コンセンサスクレードB gp140、426c、クレードC gp140、426c-NLGS、426c gp140（N結合グリコシル化部位が除去された）、426cコア、gp140（ループが除去された）、UG37 gp140、クレードAおよびgp41、gp41の組換え細胞外ドメイン、HxB2株からのアミノ酸541~682、Vybiion）に対してELISAにより試験した。ELISAにより、試験抗原は、いずれもIgG1 LN01抗体により認識されなかった（例えば、図10を参照されたい）。反対に、10E8抗体は、gp41の組換え細胞外ドメインに反応した。従って、実施例で示された結果は、IgG1 LN01抗体が、10E8と異なってgp41のMPERのエピトープを認識し得ることを示す。また、本明細書中の実施例は、ELISAを用いて、gp41 intと呼ばれる融合中間体gp41および非コートプレート（PBS）に対するIgG1 LN01抗体の試験も実証する（Lai, R. P. J. et al. A fusion intermediate gp41 immunogen elicits neutralizing antibodies to HIV-1. J Biol Chem 289, 29912-29926 (2014)）。gp41 int抗原は、MPER抗体4E10、2F5および10E8により、高親和性で認識される。10E8はELISAによりgp41 intに反応したが、IgG1 LN01抗体は反応しなかった（例えば、図11を参照されたい）。これらの結果は、IgG1 LN01抗体が、恐らくMPER領域において、試験される抗原のいずれにおいても容易に提示されない保存エピトープを認識することを示す。本明細書で企図される結合剤のいずれかにおいて同様の試験が実施され得る。

#### 【0032】

「結合親和性」および／または $K_D$ という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離定数を指す。 $K_D$ は、結合速度（「オンレート（on-rate）（ $k_a$ ）」）に対する解離の速度（「オフレート（off-rate）（ $k_d$ ）」）の比率である。従って、 $K_D$ は $k_d/k_a$ に等しく、モル濃度（M）で表される。従って、 $K_D$ が小さいほど、結合の親和性は強力になる。例えば、1mMの $K_D$ は、1nMの $K_D$ と比べて弱い結合を示す。抗体の $K_D$ 値は、当該技術分野において十分に確立された方法を用いて、例えば、Biacore（登録商標）システムを使用することによって決定することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される結合剤は、それぞれの各 $K_D$ 値に関して別の結合剤と比較され得る。これらの特性は、結合剤を互いに比較するために、中和能および／またはエピトープ特異性などの他の特徴と組み合わせることができる。従って、本明細書に記載されるものと同様の $K_D$ を有し、恐らく本明細書に記載される中和能およびエピトープ特異性（例えば、LN01に示されるような）を有する結合剤も本開示の一部として企図される。

#### 【0033】

また、表1のアミノ酸配列（および／またはこれらの任意の1つまたは複数の断片および／または誘導体）のいずれも、当業者によって必要とされる通りに任意の他のアミノ酸によって置換され得る。例えば、当業者は、以下の表2に示されるように特定のアミノ酸を他のアミノ酸で置換することにより、保存的置換を行うことができる。選択される特異



的なアミノ酸置換は、選択される部位の場所に依存し得る。置換されているアミノ酸の周囲のアミノ酸配列間に当業者が相当量の類似性を確認し得る場合、アミノ酸置換は「対応する」と言うことができる。例えば、比較されているポリペプチドにおいて、置換されているアミノ酸の周囲の２個、３個、４個またはそれを超えるＮ末端およびＣ末端アミノ酸が同一または同様である（例えば、表２に記載されるように）場合、特定のアミノ酸配列は別のアミノ酸配列に対応し得る。保存的アミノ酸置換は、その位置のアミノ酸残基のサイズ、極性、電荷、疎水性、または親水性に対する影響がわずかであるかまたは全くなき、特に、例えば、ＨＩＶ中和能の低下および／または異なるエピトープ特異性をもたらさないような、非天然残基による天然アミノ酸残基の置換を含み得る。

【 ０ ０ ３ ４ 】

【 表 ２ 】

表 2

元のアミノ酸残基	元のアミノ酸残基の例示的な保存的置換	元のアミノ酸残基の好ましい保存的置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ-酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

【 ０ ０ ３ ５ 】

特定の実施形態では、本明細書に記載される１つまたは複数の結合剤をコードする核酸分子は、以下でより詳細に議論されるように、１つまたは複数の発現ベクターに挿入され得る。このような実施形態では、結合剤は、アミノ酸配列に対応するヌクレオチドによってコードされ得る。種々のアミノ酸（ＡＡ）をコードするヌクレオチドの特定の組合せ（コドン）は、当業者により使用される種々の参考文献（例えば、Lewin, B. Genes V, Oxford University Press, 1994）に記載されるように、当該技術分野においてよく知られている。前記結合剤のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列は、例えば、表３を参照して確認され得る。核酸バリエーションは、結合剤をコードするヌクレオチドの任意の組合せを使用し得る。

【 ０ ０ ３ ６ 】

10

20

30

40

【表 3】

表 3

## アミノ酸(AA)をコードするコドン

AA	コドン	AA	コドン	AA	コドン	AA	コドン
Phe (F)	TTT	Ser (S)	TCT	Tyr (Y)	TAT	Cys (C)	TGT
	TTC		TCC		TAC		TGC
Leu (L)	TTA		TCA	TERM	TAA	TERM	TGA
	TTG		TCG		TAG	Trp (W)	TGG
	CTT	Pro (P)	CCT	His (H)	CAT	Arg (R)	CGT
	CTC		CCC		CAC		CGC
	CTA		CCA	Gln (Q)	CAA		CGA
	CTG		CCG		CAG		CGG
Ile (I)	ATT	Thr (T)	ACT	Asn (N)	AAT	Ser (S)	AGT
	ATC		ACC		AAC		AGC
	ATA		ACA	Lys (K)	AAA	Arg (R)	AGA
Met (M)	ATG		ACG		AAG		AGG
Val (V)	GTT	Ala (A)	GCT	Asp (D)	GAT	Gly (G)	GGT
	GTC		GCC		GAC		GGC
	GTA		GCA	Glu (E)	GAA		GGA
	GTG		GCG		GAG		GGG

10

20

30

## 【 0 0 3 7 】

当業者は、配列番号 1 ～ 7 のいずれかのアミノ酸配列および表 4 に示される情報から、特定のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を容易に導き出せることを理解する。例えば、アミノ酸配列 G D S V S N D N Y Y (配列番号 1) および表 4 に示される情報から、アミノ酸配列は、ヌクレオチド配列 G G T G A C T C A G T C A G T A A T G A T A A T T A T T A T (配列番号 33) によってコードされ得ることが推定され得る。当業者は、配列番号 2 ～ 32 および 34 ～ 36 をコードするヌクレオチド配列が同じようにして推定され得ること、およびこのようなヌクレオチド配列が本明細書で企図されることを理解するであろう。表 4 は、表 1 に示されるアミノ酸配列 (配列番号 1 ～ 32) をコードする例示的な核酸配列を提供する。

## 【 0 0 3 8 】

【表 4 - 1】

表 4

LN01 領域	アミノ配列	例示的なヌクレオチド配列
LN01 CDRH1	GDSVSNDNYY (配列番号 1)	GGTGACTCAGTCAGTAATGATA ATTATTAT (配列番号 33)
LN01 CDRH2	IYYSGTT (配列番号 2)	ATCTATTACAGCGGCACAACC (配列番号 34)
LN01 CDRH3	VRMPSHGFWSTSFSYW YFDL (配列番号 3)	GTTCGCATGCCCAGTCACGGATT TTGGAGTACTTCTTTCTCTTACTG GTATTTTCGATCTC (配列番号 35)
LN01 CDRL1	QSVTKY (配列番号 4)	CAGAGTGTCACCAAATAT (配列 番号 36)
LN01 CDRL2	GTY	GGGACTTAT
LN01 CDRL2 (長 鎖)	LIYGTYTLL (配列番号 5)	CTCATCTATGGGACTTATACTT TACTC (配列番号 37)
LN01 CDR3	QQAHSPTWT (配列番号 6)	CAACAGGCTCACAGTACTCCCT GGACC (配列番号 38)
LN01 可変重鎖 (VH)	EVQLVESGPGGLVQPWGT LSLTCRVSGDSVSNDNYY WAWIRQTPGRELQVIGTI YYSGTTYYNPSLRNRVTI SLDKSVNVVSLRLGSVSA ADTAQYYCVRMPSHGF WSTSFSYWYFDLWGRGH FVAVSW (配列番号 7)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGG GCCCAGGACTGGTGCAGCCCTG GGGGACCCTGTCCCTCACCTGTC GTGTCTCTGGTGAAGTCAGT AATGATAATTATTATTGGGCCTGG ATTCGCCAGACCCCCGGGAGGG AACTGCAGGTATCGGAAGTATC TATTACAGCGGCACAACCTACTA CAATCCGTCGCTCAGGAATCGAG TCACGATCTCATTGGACAAGTCC GTCAATGTGGTCTCCCTGAGATT GGGGTCTGTGAGTGCCGCGGAC ACGGCCCAATATTATTGCGTTCG CATGCCCAGTCACGGATTTTGA GTAATCTTTCTCTTACTGGTATT TCGATCTCTGGGGCCGTGGTCAT TTCGTCGCTGTCTCCTGG (配列番 号 39)
LN01 可変軽鎖 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDK VTITCRASQSVTKYLNW YQFKTGQAPRILIYGTYT LLSGVSPRFSGAGSGSLY TLTITNIQPEDFATYYCQQ AHSTPWTFGQGTHVAAN (配列番号 8)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC GTCCTCCCTGTCTGCCTCTGTTG GAGACAAAGTCACCATCACCTG CCGGGCCAGTCAGAGTGTCACC AAATATTTAAATTGGTATCAGTTT AAGACCGGCCAAGCCCCAAGAA TCCTCATCTATGGGACTTATACTT TACTCAGTGGCGTCTCGCCTCGG TTCAGTGGCGCCGGATCTGGTTC ACTCTACACTCTGACCATCACCA ATATACAGCCTGAAGACTTCGCC ACCTATTATTGTCAACAGGCTCA CAGTACTCCCTGGACCTTCGGCC

【表 4 - 2】

		AAGGAACCCACGTGGCGGCCAA C (配列番号40)
LN01 バリアント 7 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下 線)	EVQLVESGPGLVQPWGT LSLTCRVSGDSVSNWNY <u>YWAWIRQTPGRELQVIGT</u> <u>IYYSGTTYYNPSLRNRVTI</u> SLDKSVNVVSLRLGSVSA ADTAQYYCVRMPSHGF WSTSFSYWYFDLWG RGHFVAVSW (配列番号9)	GAAGTGCAGCTGGTGAATCTG GCCCTGGCCTGGTGCAGCCTTGG GGCACACTGAGCCTGACCTGTA GAGTGTCCGGCGACAGCGTGTC CAACTGGAATACTACTGGGCCT GGATCCGGCAGACCCCGGCAG AGAACTGCAAGTGATCGGCACC ATCTACTACAGCGGCACAACCTA CTACAACCCAGCCTGCGGAAC AGAGTGACCATCAGCCTGGACA AGAGCGTGAACGTGGTGTCCCT GAGACTGGGCTCTGTGTCTGCCG CCGATAACCGCCAGTACTACTGC GTGCGGATGCCCAGCCACGGCTT CTGGTCTACCAGCTTCAGCTACT GGTACTTCGACCTGTGGGGCAG AGGCCACTTCGTGGCCGTGTCTT GG (配列番号41)
LN01 バリアント 7 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 お よび CDRL3 に下線)	DIQMTQSPSSLSASVGDK VTITCRASQSVTKYLNW YQFKTGQAPRIIYGTYT <u>LLSGVSPRFSGAGSGSLY</u> <u>TLTITNIQPEDFATYYCQQ</u> <u>AHSTPWTFGQGTHVAAN</u> (配列番号10)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC GTCCTCCCTGTCTGCCTCTGTTG GAGACAAAGTCACCATCACCTG CCGGGCCAGTCAGAGTGTACC AAATATTTAAATTGGTATCAGTTT AAGACCGGCCAAGCCCCAAGAA TCCTCATCTATGGGACTTATACTT TACTCAGTGGCGTCTCGCCTCGG TTCAGTGGCGCCGGATCTGGTTC ACTCTACACTCTGACCATCACCA ATATACAGCCTGAAGACTTCGCC ACCTATTATTGTCAACAGGCTCA CAGTACTCCCTGGACCTTCGGCC AAGGAACCCACGTGGCGGCCAA C (配列番号42)
LN01 バリアント 8 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下 線)	EVQLVESGPGLVQPWGT LSLTCRVSGDSVSNWY <u>YWAWIRQTPGRELQVIGT</u> <u>IYYSGTTYYNPSLRNRVTI</u> SLDKSVNVVSLRLGSVSA ADTAQYYCVRMPSHGF WSTSFSYWYFDLWGRGH FVAVSW (配列番号11)	GAAGTGCAGCTGGTGAATCTG GCCCTGGCCTGGTGCAGCCTTGG GGCACACTGAGCCTGACCTGTA GAGTGTCCGGCGACAGCGTGTC CAACGACTGGTACTACTGGGCCT GGATCCGGCAGACCCCGGCAG AGAACTGCAAGTGATCGGCACC ATCTACTACAGCGGCACAACCTA CTACAACCCAGCCTGCGGAAC AGAGTGACCATCAGCCTGGACA AGAGCGTGAACGTGGTGTCCCT GAGACTGGGCTCTGTGTCTGCCG CCGATAACCGCCAGTACTACTGC GTGCGGATGCCCAGCCACGGCTT

【表 4 - 3】

		CTGGTCTACCAGCTTCAGCTACT GGTACTTCGACCTGTGGGGCAG AGGCCACTTCGTGGCCGTGTCTT GG (配列番号43)
LN01 バリエント 8 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 お よび CDRL3 に下線)	DIQMTQSPSSLSASVGDK VTITCRASQSVTKYLNW YQFKTGQAPRILIYGYT <u>LLSGVSPRFSGAGSGSLY</u> TLTITNIQPEDFATYYCQQ <u>AHSTPWTF</u> GQGTHVAAN (配列番号12)	GACATCCAGATGACCCAGAGCC CCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAAAGTGACCATCACCC TGTCGGGCCAGCCAGAGCGTGA CCAAGTACCTGAACTGGTATCAG TTAAGACCGGCCAGGCCCCCA GAATCCTGATCTACGGCACCTAC ACCCTGCTGAGCGGCGTGTCCCC TAGATTCTCTGGCGCCGGAAGCG GCAGCCTGTACACCCTGACAATC ACCAACATCCAGCCCGAGGACT TCGCCACCTACTACTGCCAGCAG GCCACAGCACCCCTTGGACATT TGGCCAGGGAACACACGTGGCC GCCAAC (配列番号44)
LN01 バリエント 38 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下 線)	EVQLVESGPGLVQPWGT LSLTCRVSGDSVSNDNYY WAWIRQTPGRELQVIGTI <u>YYSGTTY</u> YNPSLRNRVTI SLDKSVNVVSLRLGSVSA ADTAQYYCVRMPSHGF <u>WSTSFSY</u> WYFDLWGRGH FVAVSW (配列番号13)	AAGTGCAGCTGGTGGGAATCTGG CCCTGGCCTGGTGCAGCCTTGGG GCACACTGAGCCTGACCTGTAG AGTGTCCGGCGACAGCGTGTCC AACGACAATACTACTGGGCCTG GATCCGGCAGACCCCCGGCAGA GAACTGCAAGTGATCGGCACCAT CTACTACAGCGGCACAACCTACT ACAACCCAGCCTGCGGAACAG AGTGACCATCAGCCTGGACAAG AGCGTGAACGTGGTGTCCCTGA GACTGGGCTCTGTGTCTGCCGCC GATACCGCCAGTACTACTGCGT GCGGATGCCAGCCACGGCTTCT GGTCTACCAGCTTCAGCTACTGG TACTTCGACCTGTGGGGCAGAG GCCACTTCGTGGCCGTGTCTTGG (配列番号45)
LN01 バリエント 38 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 お よび CDRL3 に下線)	DIQMTQSPSSLSASVGDK VTITCRASQSVTKYLNW YQFKTGQAPRILIYGYT <u>LLSGVSPRFSGAGWGS</u> LY TLTITNIQPEDFATYYCQQ <u>AHSTPWTF</u> GQGTHVAAN (配列番号14)	ACATCCAGATGACCCAGAGCCCC AGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGG GCGACAAAGTGACCATCACCTG TCGGGCCAGCCAGAGCGTGACC AAGTACCTGAACTGGTATCAGTT TAAGACCGGCCAGGCCCCCAGA ATCCTGATCTACGGCACCTACAC CCTGCTGAGCGGCGTGTCCCCTA GATTCTCTGGCGCCGGATGGGGC AGCCTGTACACCCTGACAATCAC CAACATCCAGCCCGAGGACTTC GCCACCTACTACTGCCAGCAGGC

【表 4 - 4】

		CCACAGCACCCCTTGGACATTTG GCCAGGGAACACACGTGGCCGC CAAC (配列番号46)
LN01 バリアント 41 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下 線)	EVQLVESGPGVLVQPWGT LSLTCRVSGDSVSNNFY WAWIRQTPGRELQVIGTI YYSGTTYYNPSLRNRVTI SLDKSVNVVSLRLGSVSA ADTAQYYCVRMPSHGF WSTSFSYWYFDLWGRGH FVAVSW (配列番号15)	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTG GACCTGGACTGGTGCAGCCTTG GGGCACTCTGTCTCTGACATGCC GGGTGAGCGGGGACAGCGTCTC CAACTTTAATTACTATTGGGCTTG GATCAGGCAGACACCAGGGCGC GAGCTGCAGGTCATCGGGACTAT CTACTATTCCGGAACACATACTA TAACCCCTCTCTGCGGAATAGAG TGACCATTTCTCTGGACAAGAGT GTCAACGTGGTCAGTCTGCGACT GGGATCTGTGAGTGCCGCTGATA CCGCACAGTACTATTGCGTGCGG ATGCCCTCTCACGGCTTCTGGTC AACAAGCTTTTCTACTGGTATT TCGATCTGTGGGGACGGGGCCAT TTCGTGGCCGTCTCCTGG (配列番 号47)
LN01 バリアント 41 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 お よび CDRL3 に下線)	DIQMTQSPSSLSASVGDK VTITCRASQSVTKYLNW YQFKTGQAPRILYGTYT LLSGVSPRFSGAGSGSLY TLTITNIQPEDFATYYCQQ AHSTPWTFGQGTHVAAN (配列番号16)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC GTCCTCCCTGTCTGCCTCTGTTG GAGACAAAGTCACCATCACCTG CCGGGCCAGTCAGAGTGTACC AAATATTTAAATTGGTATCAGTTT AAGACCGGCCAAGCCCCAAGAA TCCTCATCTATGGGACTTATACTT TACTCAGTGGCGTCTCGCCTCGG TTCAGTGGCGCCGGATCTGGTTC ACTCTACACTCTGACCATCACCA ATATACAGCCTGAAGACTTCGCC ACCTATTATTGTCAACAGGCTCA CAGTACTCCCTGGACCTTCGGCC AAGGAACCCACGTGGCGGCCAA C (配列番号48)
LN01 バリアント 42 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下 線)	EVQLVESGPGVLVQPWGT LSLTCRVSGDSVSNNFY WAWIRQTPGRELQVIGTI YYSGTTYYNPSLRNRVTI SLDKSVNVVSLRLGSVSA ADTAQYYCVRMPSHGF WSTSFSYWYFDLWGRGH FVAVSW (配列番号17)	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTG GACCTGGACTGGTGCAGCCTTG GGGCACTCTGTCTCTGACATGCC GGGTGAGCGGGGACAGCGTCTC CAACTACAATTACTATTGGGCTT GGATCAGGCAGACACCAGGGCG CGAGCTGCAGGTCATCGGGACTA TCTACTATTCCGGAACACATACT ATAACCCCTCTCTGCGGAATAGA GTGACCATTTCTCTGGACAAGAG TGTCAACGTGGTCAGTCTGCGAC TGGGATCTGTGAGTGCCGCTGAT ACCGCACAGTACTATTGCGTGCG

【表 4 - 5】

		GATGCCCTCTCACGGCTTCTGGT CAACAAGCTTTTCTACTGGTAT TTCGATCTGTGGGGACGGGGCCA TTTTGTGGCCGTCTCCTGG (配列 番号49)
LN01 バリアント 42 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 お よび CDRL3 に下線)	DIQMTQSPSSLSASVGDK VTITCRASQSVTKYLNW YQFKTGQAPRILIYGYT LLSGVSPRFSGAGSGSLY TLTITNIQPEDFATYYCQQ AHSTPWTFGQGTHVAAN (配列番号18)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC GTCCTCCCTGTCTGCCTCTGTTG GAGACAAAGTCACCATCACCTG CCGGGCCAGTCAGAGTGTACC AAATATTTAAATTGGTATCAGTTT AAGACCGGCCAAGCCCCAAGAA TCCTCATCTATGGGACTTATACTT TACTCAGTGGCGTCTCGCCTCGG TTCAGTGGCGCCGGATCTGGTTC ACTCTACACTCTGACCATCACCA ATATACAGCCTGAAGACTTCGCC ACCTATTATTGTCAACAGGCTCA CAGTACTCCCTGGACCTTCGGCC AAGGAACCCACGTGGCGGCCAA C (配列番号50)
LN01 バリアント 48 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下 線)	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGDSVSNWNY WAWIRQTPGRELQVIGTI YYSGTTYYNPSLRNRVTI SLDKSVNVVSLRLGSVSA ADTAQYYCVRMPSHGF WSTSFSYWYFDLWGRGT LVTVSS (配列番号19)	CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGTG GACCTGGACTGGTGAAGCCTTC AGAAACACTGAGCCTGACTTGC ACCGTGTCCGGCGACTCTGTCA TAACTGGAATTACTATTGGGCAT GGATTAGACAGACACCAGGAAG AGAGCTGCAGGTCATCGGGACA ATCTACTATAGTGAACCACATA CTATAACCCCTCACTGCGGAATA GAGTGACCATTTCCCTGGACAAA TCTGTCAACGTGGTCTCTCTGCG ACTGGGCTCAGTGAGCGCCGCT GATACTGCCCAGTACTATTGCGT GCGGATGCCAGCCACGGCTTCT GGTCCACCTCTTTTAGTTACTGG TATTTGATCTGTGGGGACGGGG CACACTGGTGACTGTCAGCTCC (配列番号51)
LN01 バリアント 48 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 お よび CDRL3 に下線)	DIQMTQSPSSLSASVGDK VTITCRASQSVTKYLNW YQFKTGQAPRILIYGYT LLSGVSPRFSGAGSGSLY TLTITNIQPEDFATYYCQQ AHSTPWTFGQGTHVAAN (配列番号20)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC GTCCTCCCTGTCTGCCTCTGTTG GAGACAAAGTCACCATCACCTG CCGGGCCAGTCAGAGTGTACC AAATATTTAAATTGGTATCAGTTT AAGACCGGCCAAGCCCCAAGAA TCCTCATCTATGGGACTTATACTT TACTCAGTGGCGTCTCGCCTCGG TTCAGTGGCGCCGGATCTGGTTC ACTCTACACTCTGACCATCACCA ATATACAGCCTGAAGACTTCGCC

【表 4 - 6】

		ACCTATTATTGTCAACAGGCTCA CAGTACTCCCTGGACCTTCGGCC AAGGAACCCACGTGGCGGCCAA C (配列番号52)
LN01 バリアント 49 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下 線)	EVQLVESGPGVLVQPWGT LSLTCRVSGDSVSNWWY YWAWIRQTPGRELQVIGT <u>IYYSGTTY</u> YNPSLRNRVTI SLDKSVNVVSLRLGSVSA ADTAQYYCVRMP SHGF <u>WSTSFSYWF</u> DLWGRGH FVAVSW (配列番号21)	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTG GACCTGGACTGGTGCAGCCTTG GGGCACTCTGTCTCTGACATGCC GGGTGAGCGGGGACAGCGTCTC CAACTGGTGGTACTATTGGGCTT GGATCAGGCAGACACCAGGGCG CGAGCTGCAGGTCATCGGGACTA TCTACTATTCCGGAACACATACT ATAACCCCTCTCTGCGGAATAGA GTGACCATTTCTCTGGACAAGAG TGCAATGTGGTCAGTCTGCGAC TGGGATCTGTGAGTGCCGCTGAT ACCGCACAGTACTATTGCGTGCG GATGCCCTCTCACGGCTTCTGGT CAACAAGCTTTTCTACTGGTAT TTCGATCTGTGGGGACGGGGCCA TTTTGTGGCCGTCTCCTGG (配列 番号53)
LN01 バリアント 49 可変軽鎖 (V <sub>L</sub> ) (CDRL1, CDRL2 お よび CDRL3 に下線)	DIQMTQSPSSLSASVGDK VTITCRASQSVTKYLNW YQFKTGQAPRIIYGYT <u>LLSGVSPR</u> FSGAGSGSLY TLTITNIQPEDFATYYCQQ <u>AHSTPWTF</u> GQGTHVAAN (配列番号22)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC GTCCTCCCTGTCTGCCTCTGTTG GAGACAAAGTCACCATCACCTG CCGGGCCAGTCAGAGTGTACC AAATATTTAAATTGGTATCAGTTT AAGACCGGCCAAGCCCCAAGAA TCCTCATCTATGGGACTTATACTT TACTCAGTGGCGTCTCGCCTCGG TTCAGTGGCGCCGGATCTGGTTC ACTCTACACTCTGACCATCACCA ATATACAGCCTGAAGACTTCGCC ACCTATTATTGTCAACAGGCTCA CAGTACTCCCTGGACCTTCGGCC AAGGAACCCACGTGGCGGCCAA C (配列番号54)
LN01 バリアント 82 可変重鎖 (V <sub>H</sub> ) (CDRH1, CDRH2 および CDRH3 に下 線)	QVQLEESGPGVLVQPWGT LSLTCRVSGGSISSSSYYW AWIRQTPGRELQVIGTIY <u>YSGTTY</u> YNPSLRNRVTIS LDKSVNVVSLRLGSVSA ADTAQYYCVRMP SHGF <u>WSTSFSYWF</u> DLWGRGH FVAVSW (配列番号23)	CAGGTGCAGCTGGAGGAATCTG GACCTGGACTGGTCCAGCCTTG GGGCACTCTGAGCCTGACCTGC CGGGTGTGAGCGGGAGCATCA GCTCCTCTAGTTACTATTGGGCTT GGATTAGGCAGACACCAGGCCG CGAGCTGCAGGTCATCGGCACTA TCTACTATAGTGGGACCACATACT ATAACCCCTCACTGCGGAATAGA GTGACCATCTCCCTGGACAAGTC TGCAACGTGGTCTCTCTGCGAC TGGGATCAGTGAGCGCCGCTGAT



10

20

30

40

従って、本開示の結合剤をコードする核酸は、配列番号 1 ~ 32 のいずれかまたは G T

Y ( L N 0 1 C D R L 2 ) および / またはこれらの誘導体をコードする、1つまたは複数の配列番号 3 3 ~ 6 4 または G G G A C T T A T、またはこれらの誘導体 (例えば、表 4 に記載されるものを含むがこれらに限定されない、例えば表 3 に記載されるように標準的な技術を用いて決定されるヌクレオチド配列によりコードされる、表 2 に記載されるように保存的に置換された配列番号 1 ~ 3 2 のいずれか) を含み得る。このような核酸配列を含む発現ベクターも本開示により企図される。結合剤が抗体である場合、その可変領域をコードするヌクレオチド配列は、発現ベクターにクローン化されたそれを発現するファージおよび / またはハイブリドーマ細胞から単離されてもよい。このような調製物を作るための方法は当該技術分野においてよく知られている。

#### 【 0 0 4 6 】

1つまたは複数の HIV 結合剤をコードする核酸分子は、ウイルスおよび / または非ウイルスベクター内に含有されてもよい。一実施形態では、1つまたは複数の HIV 結合剤をコードする核酸を患者に送達するために DNA ベクターが利用される。その際、例えば、自己複製ウイルスレプリコンの使用 (C a l e y , e t a l . 1 9 9 9 . V a c c i n e , 1 7 : 3 1 2 4 - 2 1 3 5 ; D u b e n s k y , e t a l . 2 0 0 0 . M o l . M e d . 6 : 7 2 3 - 7 3 2 ; L e i t n e r , e t a l . 2 0 0 0 . C a n c e r R e s . 6 0 : 5 1 - 5 5 )、コドン最適化 (L i u , e t a l . 2 0 0 0 . M o l . T h e r . , 1 : 4 9 7 - 5 0 0 ; D u b e n s k y , 上 記 ; H u a n g , e t a l . 2 0 0 1 . J . V i r o l . 7 5 : 4 9 4 7 - 4 9 5 1 )、インビボエレクトロポレーション (W i d e r a , e t a l . 2 0 0 0 . J . I m m u n o l . 1 6 4 : 4 6 3 5 - 3 6 4 0 )、共刺激性分子、サイトカインおよび / またはケモカインをコードする核酸の取込み (X i a n g , e t a l . 1 9 9 5 . I m m u n i t y , 2 : 1 2 9 - 1 3 5 ; K i m , e t a l . 1 9 9 8 . E u r . J . I m m u n o l . , 2 8 : 1 0 8 9 - 1 1 0 3 ; I w a s a k i , e t a l . 1 9 9 7 . J . I m m u n o l . 1 5 8 : 4 5 9 1 - 3 2 0 1 ; S h e e r l i n c k , e t a l . 2 0 0 1 . V a c c i n e , 1 9 : 2 6 4 7 - 2 6 5 6 )、C p G などの刺激性モチーフの取込み (G u r u n a t h a n , 上 記 ; L e i t n e r , 上 記 )、エンドサイトーシスまたはユビキチンプロセッシング経路のターゲティングのための配列 (T h o m s o n , e t a l . 1 9 9 8 . J . V i r o l . 7 2 : 2 2 4 6 - 2 2 5 2 ; V e l d e r s , e t a l . 2 0 0 1 . J . I m m u n o l . 1 6 6 : 5 3 6 6 - 5 3 7 3 )、プライムブーストレジメン (G u r u n a t h a n , 上 記 ; S u l l i v a n , e t a l . 2 0 0 0 . N a t u r e , 4 0 8 : 6 0 5 - 6 0 9 ; H a n k e , e t a l . 1 9 9 8 . V a c c i n e , 1 6 : 4 3 9 - 4 4 5 ; A m a r a , e t a l . 2 0 0 1 . S c i e n c e , 2 9 2 : 6 9 - 7 4 )、プロテアソーム感受性切断部位、およびサルモネラ (S a l m o n e l l a ) などの粘膜投与ベクターの使用 (D a r j i , e t a l . 1 9 9 7 . C e l l , 9 1 : 7 6 5 - 7 7 5 ; W o o , e t a l . 2 0 0 1 . V a c c i n e , 1 9 : 2 9 4 5 - 2 9 5 4 ) を含む、種々の戦略を利用してこのようなメカニズムの効率を改善することができる。当該技術分野において他の方法が知られており、そのいくつかは以下に記載される。宿主に核酸を導入するために良好に利用されている種々のウイルスベクターには、特にレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (A A V )、ヘルペスウイルス、およびボックスウイルスが含まれる。ベクターは、当業者に広く利用可能な標準組換え技術を用いて構築され得る。このような技術は、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l (S a m b r o o k , e t a l . , 1 9 8 9 , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s )、G e n e E x p r e s s i o n T e c h n o l o g y (M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , V o l . 1 8 5 , D . G o e d d e l 編、1 9 9 1 . A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C A )、および P C R P r o t o c o l s : A G u i d e t o M e t h o d s a n d A p p l i c a t i o n s (I n n i s , e t a l . 1 9 9 0 . A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , c a ) などの一般的な分子生物学の参考文献において見出すことができる。「非ウイルス」プラスミドベクターも特定の实

10

20

30

40

50

施形態において適切であり得る。好ましいプラスミドベクターは、細菌、昆虫、および / または哺乳類宿主細胞と適合性である。このようなベクターには、例えば、PCR-i i、PCR3、および p cDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA)、pBSii (Stratagene, La Jolla, CA)、pet15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-n2 (Clontech, Palo Alto, CA)、pET1 (Bluebacci, Invitrogen)、pDSR-alpha (国際公開第90/14363号) および pFASTBACdual (Gibco-BRL, Grand Island, NY)、ならびに Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数の COLe1 ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)、TAQ 増幅 PCR 産物をクローン化するために設計された PCR クローニングプラスミド (例えば、TOPO<sup>TM</sup> TA cloning (登録商標) キット、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen, Carlsbad, CA) が含まれる。細菌ベクターも使用され得る。これらのベクターには、例えば、赤痢菌 (Shigella)、サルモネラ (Salmonella)、ビブリオ・コレラエ (Vibrio cholerae)、ラクトバチルス (Lactobacillus)、カルメット・ゲラン桿菌 (Bacille Calmette-Guerin) (BCG)、および連鎖球菌 (Streptococcus) が含まれる (例えば、国際公開第88/6626号; 国際公開第90/0594号; 国際公開第91/13157号; 国際公開第92/1796号; および国際公開第92/21376号を参照されたい)。多数の他の非ウイルスプラスミド発現ベクターおよびシステムが当該技術分野で知られており、使用することができる。例えば、DNA-リガンド複合体、アデノウイルス-リガンド-DNA複合体、DNAの直接注入、CaPO<sub>4</sub> 沈殿、遺伝子銃技術、エレクトロポレーション、およびコロイド分散系を含む他の送達技術も十分であり得る。コロイド分散系は、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、および脂質ベースの系、例えば、水中油エマルション、ミセル、混合ミセル、およびリボソームを含む。好ましいコロイド系はリボソームであり、これは、インピトロおよびインピボでの送達媒体として有用な人工膜小胞である。RNA、DNA およびインタクトなビリオンは、水性内部に封入され、生物学的に活性な形態で細胞へ送達されることが可能である (Fraleigh, R., et al., 1981, Trends Biochem. Sci., 6:77)。通常、リボソームの組成は、通常、ステロイド、特にコレステロールと組み合わせた、リン脂質、特に高い相転移温度のリン脂質の組合せである。他のリン脂質または他の脂質が使用されてもよい。リボソームの物理特性は、pH、イオン強度、および二価のカチオンの存在に依存する。リボソームの製造において有用な脂質の例としては、ホスファチジル化合物、例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド、およびガングリオシドが挙げられる。特に有用なものはジアシルホスファチジルグリセロールであり、ここで、脂質部分は、14 ~ 18 個の炭素原子、特に 16 ~ 18 個の炭素原子を含有し、かつ飽和されている。実例となるリン脂質には、卵ホスファチジルコリン、ジバルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンが含まれる。

#### 【0047】

ベクターを含む培養細胞も提供される。培養細胞は、細胞が免疫原性ポリペプチドを発現する、ベクターまたは細胞の子孫がトランスフェクトされた培養細胞であり得る。適切な細胞株は当業者に知られており、例えば、American Type Culture Collection (ATCC) により市販されている。トランスフェクト細胞は、免疫原性ポリペプチドの製造方法で使用することができる。方法は、免疫原性ポリペプチドの発現を可能にする条件下において、任意選択的に発現配列の制御下でベクターを含む細胞を培養するステップを含む。免疫原性ポリペプチドは、標準的なタンパク質精製方法を用いて、細胞または培地から単離することができる。いくつかの実施形態では、本明

細書に記載される結合剤は、H I Vポリペプチドを発現し、かつ／またはH I V（および／もしくは複数の特異性を有する結合剤の場合には別の抗原）を保有している細胞集団を標的にし、かつ機能を阻害し、かつ／または除去するために活性剤に結合され得る。例えば、複製可能なH I Vを含有するC D 4<sup>+</sup> T細胞集団は、結合剤／薬物コンジュゲート（例えば、抗体－薬物コンジュゲート（A D C））を用いて標的にされ、かつ除去され得る。単一特異性および／または二特異性候補結合剤は、1つまたは複数のタイプの薬物（例えば、DNAを損傷する薬物、マイクロチューブルを標的にする薬物）と結合され得る。また、本明細書に記載される結合剤および／またはその誘導体は、インビトロおよび／またはインビボで使用するための機能性薬剤に接合および／または結合され得る。例えば、結合剤は、細胞毒性薬または毒素、および／またはこれらの活性断片、例えば、特にジフテリアA鎖、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシンなどの機能性部分に接合および／または結合され得る。また、適切な機能性部分は放射化学物質も含み得る。抗体などの結合剤は、当該技術分野で標準的な技術を用いて、1つまたは複数の機能性薬剤に接合および／または結合され得る。

10

#### 【0048】

いくつかの実施形態では、本開示は、L N 0 1（例えば、I T K W L W Y I K（配列番号72）であるが、L A S W V K Y I Q（配列番号71）および／またはI T K W I K Y I Q（配列番号73）ではない）により結合されるエピトープと、少なくとも1つの他の二次抗原（例えば、細胞表面タンパク質）とが単一の結合剤により結合され得るように、多特異性を有する結合剤を提供する。いくつかの実施形態では、二次抗原は、感染性病原体に感染した細胞により発現されるものであり得る。例えば、例示的な二次抗原は、g p 4 1以外のH I V E n v抗原であり得る。本明細書に記載されるアッセイを用いて決定され得るように、このような結合剤は二次抗原に結合することができ、かつ／または感染性病原体を中和する役割を果たし得る。結合剤、例えば本明細書に記載される1つまたは複数と、当業者に利用可能な別のものとの組合せも本明細書で企図される。例えば、いくつかの実施形態では、組合せは、1つまたは複数の結合剤のみを使用し、他のものを使用しない場合に得られる結果（例えば、中和アッセイ）との統計的に有意な違いを提供するように同定され得る。いくつかの実施形態では、組合せは、例えば、H I Vの相乗的な中和を示す。いくつかの実施形態では、組合せは、L N 0 1（例えば、I g G 1 L N 0 1など）の特徴を有し、かつ／あるいは配列番号1～32のいずれか1つもしくは複数（および／もしくは表1に記載されるもの）、ならびに／またはこれらの誘導体を含む第1の結合剤と、米国特許第5,087,557号明細書；米国特許第5,298,419号明細書；米国特許第5,459,060号明細書；米国特許第5,693,752号明細書；米国特許第5,731,189号明細書；米国特許第5,753,503号明細書；米国特許第5,756,674号明細書；米国特許第5,777,074号明細書；米国特許第5,804,440号明細書；米国特許第5,831,034号明細書；米国特許第6,008,044号明細書；米国特許第7,774,887B2号明細書；米国特許出願公開第2003/0118985A1号明細書、同第2007/0292390A1号明細書、または同第2014/0205612A1号明細書；国際公開第2002/032452A1号（例えば、g p 4 1エピトープE L D K W A、E L E K W A、E L N K W A、E L D E W Aを結合）；欧州特許第0335134B1号明細書U S 176077（例えば、そこに記載されるマウスm A bのヒト化バージョン）；独国特許出願公開第3932461A1号明細書（エピトープA r g - I l e - L e u - A l a - V a l - G l u - A r g - L e u - L y s - T r y - A s p - G l n - G l n - L e u - L e u - G l y - I l e - T r p - G l y - C y s - S e rに対するm A b）；E v a n s , e t a l . J . I m m u n o l . 140 (3) : 941 - 3 (1988) ; G o r n e y , e t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 86 : 1624 - 28 (1989) ; T e e u w s e n , e t a l . (1990) A I D S R e s . H u m . R e t r o v i r u s e s 6 , 381 - 392 ; E a r l , e t a l . J . V i r o l . 71 (4) : 2674 - 2684 (1997) ; J i a n g , e t a l . J . V i r o l

20

30

40

50

. 72 (12) : 10213 - 17 (1998) ; Zwick , et al . J . Vir  
ol . 75 (22) : 10892 - 10905 (2001) ; Eckert et al  
. PNAS USA , 98 (20) : 11187 - 11192 (2001) ; Louis  
, et al . J . Biol . Chem . 278 (22) : 20278 - 20285 (2  
003) ; および / または Pietzsch , et al . J . Virol . 84 (10  
) : 5032 - 42 (2010) (これらは全て、その全体が本明細書に援用される) の  
いずれか1つまたは複数に記載される抗体のいずれか1つまたは複数とを含み得る。例え  
ば、本明細書に記載される結合剤のいずれかは、特に2F5、4E10および / またはZ  
13e1、および / またはこれらの誘導体として一般的に知られている1つまたは複数の  
抗体と組み合わせることができる (すなわち、単一の組成物としておよび / またはこれら  
と共に使用される)。このような組成物の結合剤は、異なる実体、例えば2つ以上の異なる  
モノクローナル抗体もしくはその誘導体であってもよく、または二機能性抗体 (複数の  
結合特異性を含む単一の抗体もしくはその誘導体) などの同一の実体上に見出されてもよ  
い。本明細書に記載されるような組合せは、免疫細胞機能をもたらし得る1つまたは複数の  
他の薬剤、例えばCTLA-4に対する抗体などと組み合わせることもできる。当業者  
は、多数のこのような組合せが本明細書に記載されるような使用に適し得ることを認識す  
るであろう。

10

#### 【0049】

上記のように、本明細書に記載されるHIV結合剤は、HIVによる感染の症状を処置  
、および / または予防、および / または改善するために使用され得る。当該技術分野で周  
知であるように、HIV単離物は、現在、別個の遺伝的サブタイプに分類されている。H  
IV-1は、少なくとも10のサブタイプ (A1、A2、A3、A4、B、C、D、E、  
F1、F2、G、H、JおよびK) を含むことが知られている (Taylor et al  
, NEJM , 359 (18) : 1965 - 1966 (2008))。HIV-2は、少  
なくとも5つのサブタイプ (A、B、C、D、およびE) を含むことが知られている。サ  
ブタイプBは、世界中で男性同性愛者および静注薬物使用者におけるHIVの流行に関連  
している。大部分のHIV-1免疫原、実験室適応単離物、試薬およびマッピングされた  
エピトープは、サブタイプBに属する。新しいHIV感染の発生率が高い地域であるサハ  
ラ以南のアフリカ、インドおよび中国では、HIV-1サブタイプBは感染のごく少数を  
占めるのみであり、サブタイプHIV-1 Cが最も一般的な感染性サブタイプであると  
思われる。これらのタイプの単離物のいずれも、本明細書に記載される結合剤を用いて対  
処され得る。また、1つまたは複数の結合剤は、例えば、プロテアーゼ阻害薬、HIV侵  
入阻害薬、逆転写酵素阻害薬、および / または抗レトロウイルスヌクレオシド類似体など  
、HIVを予防、処置および / または改善するために使用される1つまたは複数の薬剤と  
共にまたは併せて投与されてもよい。適切な化合物は、例えば、Agenerase (ア  
ンプレナビル)、Combivir (Retrovir / EpiVir)、Crixivan (インジナビル)、Emtriva (エムトリシタピン)、EpiVir (3tc /  
ラミブジン)、Epzicom、Fortovase / Invirase (サキナビル)  
、Fuzeon (エンフビルチド)、Hivid (ddc / ザルシタピン)、Kaletra (ロピナビル)、Lexiva (ホスアンプレナビル)、Norvir (リトナビル)  
、Rescriptor (デラビルジン)、Retrovir / AZT (ジドブジン)  
、Reyatax (アタザナビル、BMS-232632)、Sustiva (エファビ  
レンツ)、Trizivir (アバカビル / ジドブジン / ラミブジン)、Truvada  
(エムトリシタピン / テノホビルDF)、Videx (ddI / ジダノシン)、Vide  
x EC (ddI、ジダノシン)、Viracept (ネビラピン)、Viread (フ  
マル酸テノホビルジソプロキシル)、Zerit (d4T / スタブジン)、およびZia  
gen (アバカビル) を含み、これらが利用され得る。他の適切な薬剤は当業者に知られ  
ており、本明細書に記載されるような使用に適し得る。このような薬剤は、本明細書に記  
載される結合剤の投与および / または方法の使用前、その間、その後のいずれかで使用さ  
れ得る。

20

30

40

50

## 【 0 0 5 0 】

当業者は、本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体）を使用して、それに結合するタンパク質を含有する生体サンプルを同定するための多数の適切な技術を有する。例えば、抗体は、例えば、免疫沈降または他の捕獲型アッセイを用いて、H I V、またはH I Vを含有し、かつ／またはH I V抗原を発現する細胞を単離するために利用され得る。この周知の技術は、抗体を固相担体またはクロマトグラフィー材料（例えば、タンパク質A、タンパク質Gおよび／またはタンパク質Lでコートされたビーズ）に取り付けることにより実施される。結合した抗体は、次に、H I V抗原（例えば、H I V感染細胞）を含有するか、または含有すると考えられる溶液中に導入される。H I V抗原は、次に抗体に結合することができ、非結合材料は、H I V抗原が抗体に結合したままである条件下で洗い流される。結合タンパク質は、次に抗体から分離され、必要に応じて分析され得る。抗体を用いてタンパク質を単離するための同様の方法は、当該技術分野で周知である。また、結合剤（例えば、抗体）は、生体サンプル内のH I VまたはH I V抗原を検出するためにも利用され得る。例えば、抗体は、例えば、フローサイトメトリー分析、E L I S A、イムノプロット（例えば、ウエスタンブロット）、その場検出、免疫細胞化学、および／または免疫組織化学などのアッセイで使用され得る。このようなアッセイの実行方法は、当該技術分野で周知である。いくつかの実施形態では、結合剤は、1つまたは複数の検出可能な標識に接合および／または結合され得る。例えば、適切な検出可能な標識は、例えば、フルオレセイン（例えば、D y l i g h t、C y 3、C y 5、F I T C、H i l y t e F l u o r 5 5 5、H i l y t e F l u o r 6 4 7；5 - カルボキシ - 2，7 - ジクロロフルオレセイン；5 - カルボキシフルオレセイン（5 - F A M）；5 - H A T（ヒドロキシトリブタミン）；5 - ヒドロキシトリブタミン（H A T）；6 - J O E；6 - カルボキシフルオレセイン（6 - F A M）；F I T C；6 - カルボキシ - 1，4 - ジクロロ - 2'，7' - ジクロロフルオレセイン（T E T）；6 - カルボキシ - 1，4 - ジクロロ - 2'，4'，5'，7' - テトラクロロフルオレセイン（H E X）；6 - カルボキシ - 4'，5' - ジクロロ - 2'，7' - ジメトキシフルオレセイン（J O E）；A l e x a f l u o r s（例えば、3 5 0、4 0 5、4 3 0、4 8 8、5 0 0、5 1 4、5 3 2、5 4 6、5 5 5、5 6 8、5 9 4、6 1 0、6 3 3、6 3 5、6 4 7、6 6 0、6 8 0、7 0 0、7 5 0）；B O D I P Yフルオロフォア（例えば、4 9 2 / 5 1 5、4 9 3 / 5 0 3、5 0 0 / 5 1 0、5 0 5 / 5 1 5、5 3 0 / 5 5 0、5 4 2 / 5 6 3、5 5 8 / 5 6 8、5 6 4 / 5 7 0、5 7 6 / 5 8 9、5 8 1 / 5 9 1、6 3 0 / 6 5 0 - X、6 5 0 / 6 6 5 - X、6 6 5 / 6 7 6、F L、F L A T P、F I - セラミド、R 6 G S E、T M R、T M R - Xコンジュゲート、T M R - X、S E、T R、T R A T P、T R - X S E）、ローダミン（例えば、1 1 0、1 2 3、B、B 2 0 0、B B、B G、Bエクストラ、5 - カルボキシテトラメチルローダミン（5 - T A M R A）、5 G L D、6 - カルボキシローダミン6 G、リサミン、リサミンローダミンB、ファリシジン（P h a l l i c i d i n e）、ファロイジン、レッド、R h o d - 2、R O X（6 - カルボキシ - X - ローダミン）、5 - R O X（カルボキシ - X - ローダミン）、スルホローダミンB c a n C、スルホローダミンGエクストラ、T A M R A（6 - カルボキシテトラメチルローダミン）、テトラメチルローダミン（T R I T C）、W T）、T e x a s R e d、および／またはT e x a s R e d - Xを含み得る。また、当該技術分野で知られている他の検出可能な標識も使用に適し得る。抗体などの結合剤は、当該技術分野において標準的な技術を用いて、1つまたは複数の検出可能な標識に接合および／または結合され得る。

## 【 0 0 5 1 】

また、本明細書に記載される結合剤は、患者の病状の存在を決定するため、予後を予測するため、または化学療法的もしくは他の処置計画の有効性を決定するためにも使用され得る。本明細書に記載されるように、または他に当該技術分野において知られているように実施される発現プロファイルアッセイは、例えば、細胞内のH I Vの発現の相対レベルを決定するために使用され得る。発現のレベルは、次に、特定の疾患が患者に存在するか

どうか、患者の予後、または特定の処置計画が有効であるかどうかを決定するために、基準（例えば、対照）レベルと相関され得る。例えば、患者が特定の抗感染計画で処置されている場合、患者の組織（例えば、血漿）中のHIVの発現レベルの上昇または低下は、その計画がその宿主におけるHIVの負荷を悪化または改善していることを示すことができる。発現の上昇または低下は、その計画が所望の効果を有するかまたは有さず、従って別の治療方法が選択され得ることを示すことができる。

#### 【0052】

また、例えば、新しい薬物候補を試験するための薬物スクリーニングアッセイにおける試薬として、本明細書に記載される結合剤を使用することも可能である。試薬は、細胞株、または患者の細胞もしくは組織における免疫原性標的の発現に対する薬物候補の効果を10  
確認するために使用され得る。発現プロファイリング技術は、有用な化合物の迅速な同定を可能にし、薬物候補による処置の有効性をモニターするために、高処理のスクリーニング技術と組み合わせることができる（例えば、Zlokarnik, et al., Science 279, 84-8 (1998)を参照されたい）。薬物候補は、天然に存在するかまたは合成的に誘導されるかにかかわらず、化学化合物、核酸、タンパク質、抗体、またはこれらの誘導体であり得る。このようにして同定された薬物候補は、特に患者に投与するための医薬組成物として、またはさらなるスクリーニングアッセイでの使用のために利用され得る。

#### 【0053】

いくつかの実施形態では、結合剤は、精製された形態である。「精製」結合剤（例えば、抗体）は、（例えば、モノクローナル抗体の場合、ハイブリドーマ上清または腹水調製物の一部として）最初に見出されたタンパク質および/または他の成分の少なくとも約50%から分離されたものであり得る。精製結合剤（例えば、抗体）は、最初に見出されたタンパク質および/または他の成分の少なくとも約50%、60%、75%、90%、または95%から分離されたものであり得る。20

#### 【0054】

また、本明細書に記載されるポリペプチドおよび核酸は、宿主への投与前に1つまたは複数の薬学的に許容可能な担体と組み合わせることもできる。薬学的に許容可能な担体は、生物学的または他の点で好ましい材料であり、例えば、材料は、任意の望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、またはそれが含有される医薬組成物の他の成分のいずれかと有害な方法で相互作用をすることなく対象に投与され得る。担体は、当然ながら、当業者に周知であるように、活性成分の分解を最小限にし、対象における任意の有害な副作用を最小限にするように選択されるであろう。適切な医薬担体およびその製剤は、例えば、Remington's: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005)に記載されている。通常、製剤を等張性にするために、適切な量の薬学的に許容可能な塩が製剤において使用される。薬学的に許容可能な担体の例としては、滅菌水、生理食塩水、リンゲル溶液のような緩衝溶液、およびデキストロス溶液が挙げられるが、これらに限定されない。溶液のpHは、一般に、約5～約8または約7～約7.5である。他の担体には、ポリペプチドまたはその断片を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスなどの持続放出調製物が含まれる。マトリックスは、成形物品、例えば、フィルム、リボソームまたは微小粒子の形態であり得る。例えば、投与の経路および投与される組成物の濃度に応じて、特定の担体がより好ましいことがあり得ることは当業者に明らかであろう。担体は、ポリペプチドおよび/またはその断片をヒトまたは他の対象に投与するのに適したものである。また、医薬組成物は、免疫原性ポリペプチドに加えて、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝剤、保存剤、界面活性剤、補助剤、免疫賦活薬も含み得る。また、医薬組成物は、抗菌薬、抗炎症薬および麻酔薬などの1つまたは複数の活性成分も含み得る。医薬組成物は、従来の薬学的に許容可能な担体、補助剤、および媒体を含有する投与単位製剤において、経口的に、非経口的に（parentally）、吸入噴霧により、経直腸的に、結節内に（40  
50

intranasally)、または局所的に投与され得る。本明細書で使用される「薬学的に許容可能な担体」または「生理学的に許容可能な担体」という用語は、核酸、ポリペプチド、またはペプチドの医薬組成物としての送達を達成または増強するのに適した1つまたは複数の製剤材料を指す。「医薬組成物」は、治療的に有効な量の核酸またはポリペプチドを含む組成物である。「有効量」および「治療的に有効な量」という用語は、それぞれ所望の治療効果（例えば、HIVの除去）を観察するために使用される結合剤、核酸などの量を指す。

#### 【0055】

少なくとも1回または複数回の有効用量の、本明細書に記載される1つまたは複数の結合剤（および/またはその誘導体）を哺乳類に投与するステップを含む、哺乳類宿主の1つまたは複数の疾患状態（例えば、HIVまたは癌）を処置するための方法も提供される。いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号1~32および/または表1に示される配列の1つまたは複数を含むモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体である。1つまたは複数の結合剤は、約1~約50mg/kg、約1~約30mg/kg、または約5~約30mg/kg（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、または40mg/kgのいずれか）の投与量で投与され得る。特定の実施形態では、1つまたは複数の結合剤は、約10mg/kgで1回または複数回、哺乳類に（例えば、皮内に、静脈内に、経口的に、経直腸的に）投与され得る。複数回の投与が行われる場合、投与は、各投与においてほぼ同一または異なる量の結合剤を含み得る。また、投与は、同一または異なる間隔で互いに時間的に隔てられていてもよい。例えば、投与は、約6時間、12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、または96時間、1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、1.5年、2年、3年、4年、5年のいずれか、またはこれらの期間のいずれかの前、後、および/または間の任意の期間だけ隔てられ得る。いくつかの実施形態では、結合剤は、他の薬剤（例えば、抗感染症薬および/または化学療法剤）と共に投与され得る。このような他の薬剤は、結合剤とほぼ同時にまたは異なる時点および/もしくは頻度で投与され得る。当業者により容易に決定され得るように、このような方法の他の実施形態も適切であり得る。

#### 【0056】

当業者が本明細書に記載される抗体などの結合剤を使用することを促進するために、結合剤は、キット形式で提供されてもよい。このような結合剤の1つまたは複数と、任意選択的に、それを用いてHIVを発現する細胞を検出するために必要な他の成分とを含むキットも提供される。キットの結合剤は、凍結、凍結乾燥を含む任意の適切な形態で、またはTBSもしくはPBSなどの薬学的に許容可能な緩衝剤中で提供され得る。また、キットは、インビトロまたはインビボでの結合剤の利用に必要とされる他の試薬、例えば、緩衝剤（例えば、TBS、PBS）、遮断薬（脱脂粉乳、正常な血清、Tween-20洗浄剤、BSA、またはカゼインを含む溶液）、および/または検出試薬（例えば、ヤギ抗マウスIgGビオチン、ストレプトアビジン-HRPコンジュゲート、アロフィコシアニン、B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン、ペルオキシダーゼ、検出可能な標識、ならびに他の標識および/または染色キット（例えば、ABC Staining Kit, Pierce））も含み得る。また、キットは、例えば、フローサイトメトリー分析、ELISA、イムノブロットング（例えば、ウェスタンブロット）、その場検出、免疫細胞化学、免疫組織化学などの上記の一般的に利用されるアッセイにおいて抗体を使用するための他の試薬および/または説明書も含み得る。一実施形態では、キットは、精製形態の結合剤を提供する。別の実施形態では、結合剤は、単独でまたはアビジン結合検出試薬（例えば、抗体）と共にビオチン化形態で提供され得る。別の実施形態では、キットは、HIVを直接検出するために使用され得る1つまたは複数の検出可能な標識を含む結合剤を含む。これらの系のいずれかを使用するために必要とされる緩衝剤などは、当該



技術分野で周知であり、かつ／もしくは最終使用者により調製されてもよく、またはキットの成分として提供されてもよい。また、キットは、正および負の対照タンパク質および／または組織サンプルを含有する固相担体を含むこともできる。例えば、スポットティングまたはウエスタンブロットタイプのアッセイを実施するためのキットは、S D S - P A G Eで使用するための対照細胞または組織ライセート、または実験サンプルのための付加的な空間と共に前固定された対照サンプルを含有するナイロンもしくは他の膜を含むこともできる。スライド上の細胞内のH I Vの可視化のためのキットは、実験サンプルのための付加的な空間と共に対照細胞または組織サンプルを含有するフォーマット済のスライドを含み得る。当業者により理解され得るように、キットの他の実施形態も本明細書で企図される。

10

#### 【0057】

従って、本開示は、H I Vに対する特異性を有するL N 0 1抗体などの結合剤を提供する。いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号1～32からなる群から選択されかつ／または表1に示される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドである。いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号1～32の1つまたは複数の組合せを含むポリペプチドである。いくつかの実施形態では、結合剤は抗体である。いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号1～3からなる群から選択される重鎖C D Rアミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号4～7からなる群から選択される軽鎖C D Rアミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号7 (L N 0 1)、配列番号9 (L N 0 1バリエーション7)、配列番号11 (L N 0 1バリエーション8)、配列番号13 (L N 0 1バリエーション38)、配列番号15 (L N 0 1バリエーション41)、配列番号17 (L N 0 1バリエーション42)、配列番号19 (L N 0 1バリエーション48)、配列番号21 (L N 0 1バリエーション49)、または配列番号23 (L N 0 1バリエーション82)のV<sub>H</sub>アミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号8 (L N 0 1)、配列番号10 (L N 0 1バリエーション7)、配列番号12 (L N 0 1バリエーション8)、配列番号14 (L N 0 1バリエーション38)、配列番号16 (L N 0 1バリエーション41)、配列番号18 (L N 0 1バリエーション42)、配列番号20 (L N 0 1バリエーション48)、配列番号22 (L N 0 1バリエーション49)、または配列番号28 (L N 0 1バリエーション24)のV<sub>L</sub>アミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。いくつかの実施形態では、結合剤は、表1に示されるC D R (配列番号1～6またはG N T (L N 0 1 C D R L 1))および／または可変領域 (配列番号7および8；配列番号9および10；配列番号11および12；配列番号13および14；配列番号15および16；配列番号17および18；配列番号19および20；配列番号21および22；もしくは配列番号23および24；またはこれらの保存的置換バリエーション)の組合せを含む。

20

30

#### 【0058】

いくつかの実施形態では、結合剤は、配列番号68のアミノ酸残基L 6 7 9、W 6 8 0およびK 6 8 3、ならびに／または配列番号69のアミノ酸残基L 1 6 8、W 1 6 9およびK 1 7 2を含むエピトープに対する特異性を有する。いくつかの実施形態では、結合剤は、アミノ酸配列I T K W L W Y I K (配列番号66)を発現するH I Vに結合しかつ／または中和する能力を示す。いくつかの実施形態では、結合剤は、アミノ酸配列I T K W L W Y I K (配列番号66)を発現するが、L A S W V K Y I Q (配列番号65)および／またはI T K W I K Y I Q (配列番号67)を発現しないH I Vに結合しかつ／または中和する能力を示す。いくつかの実施形態では、本開示の結合剤は、上記の中和特徴 (すなわち、 $10^2 \sim 10^0 \mu\text{g/ml}$ または $10^0 \sim 10^1 \mu\text{g/ml}$ の濃度で少なくとも約50%までH I V - 1偽型ウイルスB J O X (C R F 0 7 \_\_ B C)、C E 1 1 7 6、T R O . 1 1 (B)、X 1 6 3 2 (G)、C H 1 1 9 (C R F 0 7 \_\_ B C)、C N E 5 5 (C R F 0 1 \_\_ A E)、2 5 7 1 0 (C)、C D 0 2 1 7 (C)を中和するが、対照ウイルスS V A - M L Vを中和しないこと、および／または25未満のI C<sub>50</sub>で図4に記載される118個のH I V - 1偽型ウイルスの大部分を中和できること)と共に、これらの結

40

50

合特異性のいずれか 1 つまたは複数を含み得る。いくつかの実施形態では、このような結合剤をコードする核酸はまた、表 4 のように提供される。

#### 【0059】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ヒト抗体、ヒト Ig G、ヒト Ig G 1、ヒト Ig G 2、ヒト Ig G 2 a、ヒト Ig G 2 b、ヒト Ig G 3、ヒト Ig G 4、ヒト Ig M、ヒト Ig A、ヒト Ig A 1、ヒト Ig A 2、ヒト Ig D、ヒト Ig E、イヌ抗体、イヌ Ig G A、イヌ Ig G B、イヌ Ig G C、イヌ Ig G D、ニワトリ抗体、ニワトリ Ig A、ニワトリ Ig D、ニワトリ Ig E、ニワトリ Ig G、ニワトリ Ig M、ニワトリ Ig Y、ヤギ抗体、ヤギ Ig G、マウス抗体、マウス Ig G、ブタ抗体、および / もしくはラット抗体、ならびに / またはこれらの誘導体に (例えば、配列または誘導によって) 由来するかまたは関連する。いくつかの実施形態では、誘導体は、F<sub>a b</sub>、F<sub>a b 2</sub>、F<sub>a b</sub>' 単鎖抗体、F<sub>v</sub>、単鎖、単一特異性抗体、二特異性抗体、三量体抗体、多特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌ - ヒトキメラ抗体、イヌ - マウスキメラ抗体、イヌ F<sub>c</sub> を含む抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、イヌ化抗体、CDR 移植抗体、サメ抗体、ナノボディ、および / またはラクダ科抗体からなる群から選択され得る。いくつかの実施形態では、結合剤は、少なくとも第 1 および第 2 の特異性を含み、第 1 の特異性は、H I V g p 4 1 に対するものであり、および第 2 の特異性は、異なる抗原 (例えば、H I V (例えば、e n v) などの感染性病原体の抗原、および / または腫瘍抗原) に対するものである。いくつかの実施形態では、結合剤および / またはその誘導体は、固定可能に取り付けられた検出可能な標識を含み得る。いくつかの実施形態では、いずれか 1 つの結合剤および / またはその誘導体は、固定可能に取り付けられたエフェクター部分 (例えば、細胞毒性薬、毒素、ジフテリア A 鎖、外毒素 A 鎖、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシン、および放射化学物質) を含む。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の結合剤をコードするポリヌクレオチドも提供される (例えば、発現ベクターとして)。このようなポリヌクレオチドのポリペプチド産物を含みかつ / または発現する宿主細胞も提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの結合剤もしくは誘導体 ; 少なくとも 1 つの単離ポリヌクレオチド ; 少なくとも 1 つの発現ベクター ; および / または少なくとも 1 つの宿主細胞 ; あるいはこれらの組合せと、薬学的に許容可能な担体とを含む組成物も提供される。

#### 【0060】

また、本開示は、細胞上の H I V を検出するための方法も提供し、本方法は、試験生体サンプルを、本明細書に記載される結合剤または誘導体と接触させるステップと、生体サンプルまたはその成分に結合された結合剤を検出するステップとを含む。このような方法は、インビボ方法またはインビトロ方法であり得る。いくつかの実施形態では、本方法は、試験生体サンプルまたはその成分への結合量を、対照生体サンプルまたはその成分への結合量と比較するステップを含むことができ、ここで、対照生体サンプルまたはその成分と比べて増大した試験生体サンプルまたはその成分への結合は、試験生体サンプル (例えば、哺乳類血液) 中における H I V ポリペプチドを発現する細胞の存在を示す。いくつかの実施形態では、細胞内または細胞上の H I V の発現を検出するためのキットであり、本キットは、結合剤またはその誘導体および使用説明書を含む。いくつかの実施形態では、結合剤および / またはその誘導体は、凍結乾燥形態である。いくつかの実施形態では、本開示は、哺乳類の感染症、癌および / または自己免疫を処置、予防および / または改善するための方法を提供し、本方法は、少なくとも 1 回の有効用量の、結合剤またはその誘導体を含む医薬組成物を哺乳類へ投与するステップを含む。いくつかの実施形態では、感染症はヒト免疫不全ウイルス (H I V) である。いくつかの実施形態では、動物に複数回の投与が行われる。いくつかの実施形態では、結合剤および / またはその誘導体は、約 1 ~ 50 mg / kg の投与量で投与され得る。

#### 【0061】

「約」、「およそ」などの用語は、数値のリストまたは範囲に先行される場合、そのリストまたは範囲内の個々の値がその用語によってそれぞれ直接先行されるかのように、そ

のリストまたは範囲内の個々の値を独立して指す。これらの用語は、それが示す値が、正確にその値であるか、その値に近いが、またはその値と同様であることを意味する。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用される場合、対象または宿主は、個体であることを意味する。対象は、ネコおよびイヌ、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、およびヤギ）などの飼育動物、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット）、ならびに鳥類を含むことができる。1つの態様では、対象は、霊長類またはヒトなどの哺乳類である。

【 0 0 6 3 】

任意選択なまたは任意選択的にとは、その後に記載される事象または状況が起こり得るかまたは起こり得ないこと、およびその記載が、その事象または状況が起こる場合および起こらない場合を含むことを意味する。例えば、「任意選択的に組成物が組合せを含み得る」という語句は、その組成物が異なる分子の組合せを含み得るかまたは組合せを含み得ないことを意味し、従って、その記載は、その組合せおよびその組合せ（すなわちその組合せの個々のメンバー）の非存在の両方を含む。

10

【 0 0 6 4 】

範囲は、本明細書では、およそ1つの特定の値から、および/またはおよそ別の特定の値までとして表され得る。このような範囲が表される場合、別の態様は、1つの特定の値から、および/または他の特定の値までを含む。同様に、先行詞の約またはおよその使用によって値が近似値として表される場合、特定の値が別の態様を形成することが理解されるであろう。範囲の各端点は、他の端点と関連しても、かつ他の端点から独立しても有意であることがさらに理解されるであろう。範囲（例えば、90～100%）は、各値が個々に記載されたかのように、その範囲自体およびその範囲内の個々の値のそれぞれを含むことを意味する。

20

【 0 0 6 5 】

「組み合わせられる」、または「組み合わせる」、または「併せて」という用語は、特定の疾患を処置、予防および/または改善するための計画（例えば、別々に、物理的に、および/または時間内に投与される）において、一緒に投与される薬剤の物理的な組合せまたは2つ以上の薬剤の使用を指すことができる。

【 0 0 6 6 】

処置、予防、および/もしくは改善という用語またはその派生語が、所与の状態のための所与の処置（例えば、HIVによる癌感染の予防）に関連して本明細書で使用される場合、それは、処置された患者が臨床的に観察可能なレベルのその状態を全く発症しないか、またはその患者が処置を受けなかった場合よりも緩慢におよび/または低い程度で発症することを伝えることを意味する。これらの用語は、患者がその状態のいかなる態様も全く経験しない状況のみに限定されない。例えば、処置は、その状態の所与の兆候を生じることが予想され得る刺激への患者の暴露中に与えられ、そうでない場合に予想されるよりも少ないおよび/または軽いその状態の症状を患者が経験するという結果をもたらす場合、その状態を予防したと言われるであろう。例えば、処置は、患者が感染の明らかな症状を軽度のみ示すという結果をもたらすことにより感染を「予防する」ことができ、これは、感染微生物による任意の細胞への侵入が全く存在してはならないことを意味するものではない。

30

40

【 0 0 6 7 】

同様に、低減する、低減している、および低減は、特定の処置による所与の状態の予防、処置および/または改善に関連して本明細書で使用される場合、対象が、処置（例えば、1つまたは複数のHIV結合剤の投与）を受けない場合に感染を発症する対照または基準レベルと比べてより緩慢にまたはより低い程度で感染を発症することを指す。感染のリスクの低減は、患者が感染の明らかな症状を軽度のみ示すか、または感染の症状の遅延を示すという結果をもたらすことができ、これは、感染微生物による任意の細胞への侵入が全く存在してはならないことを意味するものではない。

【 0 0 6 8 】

50

本開示において引用される全ての参考文献は、参照によってその全体が本明細書に援用される。特定の実施形態は、以下の実施例においてさらに記載される。これらの実施形態は、単に例として提供されるのみであり、特許請求の範囲を限定することは決して意図されない。

#### 【実施例】

#### 【0069】

#### 実施例 1

#### リンパ節ドナー

#### 広域中和抗体の単離のための HIV - 1 リンパ節ドナーの選択

マルチクレード HIV - 1 単離物を広域に中和することができる広域中和抗体を単離するために、抗レトロウイルス療法を受けていない慢性感染患者からの 70 の血漿サンプルを、HIV - 1 参照株の包括的パネルからの 9 個の HIV - 1 偽型ウイルスのパネルを中和することができる高力価の抗体の存在についてスクリーニングした (DeCamp, A. et al. Global panel of HIV - 1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine - elicited neutralizing antibodies. J Virol 88, 2489 - 2507 (2014))。この分析は、その後の強力な広域中和抗体の単離および特徴付けのためのリンパ節ドナーとして、7 人の患者の同定をもたらした (図 1)。特に、試験した 9 個の単離物のうちの 8 個を中和することが見出された高レベルの抗体の存在 (負の対照 MLV 偽型ウイルスに対するバックグラウンド活性の欠乏) についてドナー SA003 を選択した。注目すべきことに、SA003 ドナーは、血漿 1 ml 当たり 50 未満の HIV RNA コピーのウイルス血症を有するエリートコントローラーである (クレード B HIV - 1 に感染)。

#### 実施例 2

#### 強力な HIV - 1 広域中和抗体の単離および特徴付け

ドナー SA003 からの胚中心および記憶 IgG B 細胞を IgG (すなわち IgA および IgM 陰性細胞)、CD19 および CD38 発現 (胚中心 B 細胞は CD38 陽性) に従って別々に選別し (図 2)、HIV - 1 中和抗体の産生について調べた。特に、エプスタイン - バーウイルス (EBV) (記憶 B 細胞もポリクローナルに刺激する) と、TLR9 アゴニスト CpG - 2006、IL - 2 (1000 IU/ml)、IL - 6 (10 ng/ml)、IL - 21 (10 ng/ml)、および抗 BCR ヤギ抗体 (BCR を誘発) で構成される混合物との存在下において、高純度の IgG 記憶 B 細胞および IgG 胚細胞をヒトフィーダー細胞における単一細胞マイクロ培養として別々のプレートに播種した。次に、384 ウェルベースの HIV - 1 偽型ウイルス中和アッセイ (クレード C および CRF07 の代表である 2 つの株、CE1176 および BJOX2000 を並行して使用) を用いて、14 日目の培養物からの上清を一次スクリーニングにおいて試験した。中和アッセイは、TZM - b1 細胞において行った。384 ウェルプレートにおいて、50 ~ 100 × 10<sup>4</sup> 相対光単位 (RLU) の出力をもたらす HIV - 1 偽型ウイルスを B 細胞培養物の上清と共に 37 % (5 % CO<sub>2</sub>) で 1 時間インキュベートした後、3000 の TZM - b1 細胞を添加した。これらをさらに 72 時間インキュベートし、その後、上清を除去し、15 μl の Steadylite 試薬 (Perkin Elmer) を添加した。Synergy マイクロプレートルミノメーター (BioTek) においてプレートを読み取るにより、5 分後にルシフェラーゼ活性を検出した。胚中心 B 細胞の 2 つの培養物から得られた上清は、CE1176 および BJOX2000 株の両方を交差中和できることが見出された。これらの 2 つの培養物からの上清をさらに収集し、4 個の偽型ウイルス (CE1176、BJOX2000、X1632 および 25710) を中和するその能力について試験した。注目すべきことに、2 つの上清の 1 つは、4 つの偽型ウイルスを全て中和した。その可変領域 (表 1 および 5) およびその中の相補性決定領域 (CDR) のアミノ酸およびヌクレオチド配列を決定することにより、中和培養物から得られた抗体を特徴付けし、「LN01」と名付けた。従って、「LN01」と呼ばれる結合剤は、表 1 およ

び2において上記で示されるようなCDR、VHおよびVL配列を有するIgG3型完全ヒトモノクローナル抗体である。この抗体は、IGHV4-39\*07およびIGKV1-39\*01生殖系列遺伝子に由来し、生殖系列と比較して重鎖(28%)およびカッパ軽鎖(27%)の両方の可変遺伝子において体細胞性に高度に突然変異されていた。また、LN01抗体は、20個のアミノ酸で構成される長い重鎖相補性決定3領域(CDRH3)ループも有した。LN01 VHおよびVL遺伝子をIgG1発現ベクターにクローン化し、Exp i 293 F細胞をトランスフェクトすることにより組換えIgG1 LN01抗体を作製した。次に、組換えプロテインAカラム(GE-Healthcare)を用いて、全長IgG1 LN01抗体を精製した。

#### 【0070】

次に、組換えで産生されたIgG1 LN01抗体を、TZM-bl細胞において9個のHIV-1参照偽型ウイルスの包括的パネルに対して試験した。顕著に、IgG1 LN01抗体は、0.03~1.6 µg/mlの範囲のIC<sub>50</sub>値で、9個のうちの8個のHIV-1偽型ウイルスを中和し(図3)、負の対照MLV偽型ウイルスを中和しなかった。続いて、クレードA、クレードB、クレードC、クレードD、クレードG、循環組換え形態CRF10\_\_CD、CRF01\_\_AE、CRF02\_\_AGおよびCRF07\_\_BC、ならびに非循環組換え体ACおよびACD株を含む118個のHIV-1偽型ウイルスの拡張パネルにおいてIgG1 LN01抗体を試験した。IgG1 LN01抗体は、25 µg/ml未満のIC<sub>50</sub>で118個のうちの109個のウイルス(すなわち試験したウイルスの92%)を広域に中和し、IC<sub>50</sub>の中央値は1.1 µg/mlであった(図4および5)。中和されたウイルスの分析により、LN01の中和活性はクレードに依存しないことが示された。

#### 実施例3

##### LN01中和活性に対するFc受容体の効果

IgG1 LN01抗体を、親TZM-bl細胞、およびFc-ガンマ受容体I(CD64)を発現するTZM-bl細胞において、9個のHIV-1参照偽型ウイルスの包括的パネルに対して試験した(Perez, L.G., Costa, M.R., Todd, C.A., Haynes, B.F. & Montefiori, D.C. Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. J Virol 83, 7397-7410 (2009))。注目すべきことに、IgG1 LN01抗体の中和活性は、Fc-ガンマ受容体Iを発現するTZM-bl細胞において100倍増強された(図6)。加えて、IgG1 LN01抗体は、Fc-ガンマ受容体Iを発現するTZM-bl細胞を用いて、TZM-bl細胞においてIgG1 LN01抗体により中和されなかった株CE0217に対して強力な中和を示した(IC<sub>50</sub> > 25 µg/ml)。これらの結果は、IgG1 LN01抗体を細胞表面に予め配置することにより、Fc-ガンマ受容体がAbにウイルス阻害のための動力的利点を与え得ることを示唆する。この動力的利点は、抗体に特有である可能性があり、そのエピトープは、アクセスすることが困難であるか、または融合の初期段階中にEnvタンパク質の中間構造においてごく短時間暴露されると考えられる。Fc-ガンマ受容体が潜在的にHIV-1中和を促進し得る別のメカニズムは食作用である。TZM-bl細胞株を構築したHeLa細胞は、ノンプロフェッショナルな食細胞の特性を示すことが知られている。従って、その表面にFc-ガンマ受容体を導入することにより、TZM-bl細胞がプロフェッショナルな食細胞に変換された可能性がある。HIV-1中和抗体に対する任意のFc-ガンマ受容体媒介性抗ウイルス薬の効果は、侵入阻害によるか食作用によるかにかかわらず、ワクチン設定においていくつかの細胞型に有益であり得る。Fc-ガンマ受容体はCD4+リンパ球上でめったに発現されず、いくつかの付加的なHIV-1感受性細胞型は複数のFc-ガンマ受容体を発現し、性感染と、長寿命のウイルスリザーバー

の早期確立とに關与する。特に、マクロファージは、粘膜暴露後にウイルスが遭遇する最初の感染感受性細胞の1つであり、これらは、慢性感染において、長寿命のウイルスリザーバーとしての機能を果たすと考えられる。マクロファージは、単球および樹状細胞の特定のサブセットと同様に、複数のFc-ガンマ受容体を発現することがよく知られている。また、Fc-ガンマ受容体が、抗原取込み、抗原提示、細胞活性化およびB細胞寛容を促進することにより、適応免疫および末梢寛容の調節に關与することに言及することも重要である。

#### 実施例 4

##### LN01の特異性

IgG1 LN01抗体の特異性をよりよく定義するために、本発明者らは、親HIV-2/7312A内にHIV-1 MPERの種々のセグメントを含有するHIV-2/HIV-1キメラ偽型ウイルスのパネルを使用した。IgG1 LN01抗体は、親HIV-2 7312A株を中和しなかった。注目すべきことに、IgG1 LN01抗体は、HIV-1からの6個の残基のみをHIV-2 MPER領域において置換した(LASWVKYIQ(配列番号65)をITKWLYYIK(配列番号66)に置換した)キメラウイルス7312A.C4を強力に中和するが、同じ領域の3個の残基のみを置換した(LASWVKYIQ(配列番号65)をITKWIKYIQ(配列番号67)に置換した)キメラウイルス7312A.C6を中和しないことが見出された(図7)。7312A.C4と同じ6個の突然変異を、N末端領域における付加的な7個の突然変異と組み合わせたキメラウイルス7312A.C1Cを用いて同様の知見が得られた。これらの結果は、gp41 MPERC末端領域の残基(L679、W680およびK683)がIgG1 LN01抗体の結合に關与することを示す。

##### 【0071】

LN01の特異性をよりよく定義するために、本発明者らは、クレードA、B、C、D、グループM、CRF01\_AEおよびCRF02\_AGのコンセンサスHIV-1 Env gp160配列の全長をカバーする、12個のアミノ酸により重複する1423の15-merペプチドによって形成されるペプチドマイクロアレイを使用した。ペプチドを3D-エポキシガラススライド上に印刷し、GenePix 4000Bスキャナーを用いて分析した(Tomaras, G.D. et al. Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals. J Virol 85, 11502-11519 (2011))。7B2と呼ばれる対照抗体(gp41の免疫優性領域に特異的である)と並行して、ペプチドマイクロアレイへの結合についてLN01を20 µg/mlで試験した。LN01および7B2の結合は、DyLight 649標識化ヤギ抗ヒトIgGとのインキュベーションにより検出した。蛍光強度は、GenePix 4000Bスキャナーを用いて測定し、GenePixソフトウェアにより分析した(図8)。注目すべきことに、IgG1 LN01抗体は、このライブラリー内のペプチドのいずれとも明白に反応しなかったが、7B2は、gp41免疫優性領域にわたる190~195のペプチドと強力に反応した。これらの結果は、IgG1 LN01抗体がHIV-1 Envの直鎖エピトープを認識しないことを示す。

##### 【0072】

また、IgG1 LN01抗体は、サブタイプA伝達(transmitted)/創始(founder)株、BG505に基づく可溶性の切断型SOSIP.664 gp140トリマーへの結合についても試験した。これらのトリマーは非常に安定し、同種であり、かつネガティブ染色電子顕微鏡法(EM)により可視化したときに天然のウイルススパイクによく類似している(Sanders, R.W. et al. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing bu

t not non-neutralizing antibodies. PLoS Pathog. 9, e1003618 (2013)). HIV-1 Env上の複数の中和エピトープに対する全ての広域中和抗体は、4エピトープ抗体(CH01、PG9、PG16およびPGT145)を含む、BG505 SOSIP.664 gp140トリマーと非常によく反応した。反対に、CD4結合部位、CD4誘発性エピトープまたはgp41外部ドメインに対する非NAbsは、そのエピトープがEnvのより簡単な形態(例えば、gp120モノマーまたは解離gp41サブユニット)上に存在する場合でもトリマーと反応しなかった。また、トリマーの可溶性を改善し、凝集体の形成を低減するために、MPERを欠失させた。IgG1 LN01抗体、PGT145(V1-V2グリカン特異的)、PGT151(gp120とgp41との間の界面の部位に結合)および17b(CD4結合誘発部位に結合)抗体を、可溶性CD4(sCD4)の存在下または非存在下において、表面プラズモン共鳴(SPR)により、BG505 SOSIP.664 gp140トリマーへの結合について試験した。PGT145およびPGT151抗体は、sCD4の存在下または非存在下において、BG505 SOSIP.664 gp140トリマーに強く反応し; 17bは、sCD4の存在下においてのみBG505 SOSIP.664 gp140トリマーに反応した。LN01は、sCD4の存在下でも非存在下でもBG505 SOSIP.664 gp140トリマーと反応しなかった(図9)。

#### 【0073】

MPER特異的10E8抗体(Huang, J. et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. Nature 491, 406-412 (2012))と並行して、IgG1 LN01抗体を、ELISAにより、HIV-1抗原のパネル(ConsB、コンセンサスクレードB gp140、426c、クレードC gp140、426c-NLGS、426c gp140(N結合グリコシル化部位が除去された)、426cコア、gp140(Vループが除去された)、UG37 gp140、クレードAおよびgp41、gp41の組換え細胞外ドメイン、HxB2株からのアミノ酸541~682、Vybiion)に対しても試験した。ELISAにより、試験抗原のいずれもIgG1 LN01抗体により認識されなかった(図10)。反対に、10E8抗体はgp41の組換え細胞外ドメインに反応した。これらの結果は、IgG1 LN01抗体が、10E8と異なってgp41のMPERのエピトープを認識し得ることを示す。

#### 【0074】

最後に、IgG1 LN01抗体を、gp41intと呼ばれる融合中間体gp41および非コートプレート(PBS)に対して試験した(Lai, R. P. J. et al. A fusion intermediate gp41 immunogen elicits neutralizing antibodies to HIV-1. J Biol Chem 289, 29912-29926 (2014))。gp41int抗原は、MPER抗体4E10、2F5および10E8により高親和性で認識される。10E8はELISAによりgp41intに反応したが、IgG1 LN01抗体は反応しなかった(図11)。これらの結果は、IgG1 LN01抗体が、恐らくMPER領域において、試験される抗原のいずれにおいても容易に提示されない保存エピトープを認識することを示す。本発明者らは、IgG1 LN01抗体が、融合前(prefusion)天然Env立体構造において提示される場合、MPER領域のC末端領域においてその同族立体構造エピトープを認識すると仮定し得る。

#### 実施例 5

##### LN01のMPERペプチドへの高親和性結合の欠乏

IgG1 LN01抗体の特異性をよりよく定義するために、本発明者らは、ELISAにより、MPER特異的抗体10E8を共結晶化するために使用された28アミノ酸長さのペプチドに対するその結合を試験した(Huang et al. Nature 2

012)。このペプチドは、全28残基のgp41 MPER(残基656~683)(配列RRR-NEQEELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIRRRR(配列番号81)を包含する。10E8は、このMPERペプチドに貪欲に反応するが、IgG1LN01抗体は非常にわずかにのみ反応する(図12)。これらの結果は、IgG1LN01抗体が、恐らくMPER領域において、MPER gp41領域全体を包含する直鎖ペプチドにおいて容易に提示されない保存エピトープを認識することを示す。

#### 実施例6

##### 改善された中和活性を有するLN01バリエーション

LN01抗体の効力を改善するために、本発明者らは、点突然変異がLN01VH(25のバリエーション)またはVL(15のバリエーション)に導入されたバリエーションのセットを作製した(図13A)。これらの置換は、元の残基をWまたはAで置換することにより予測される表面暴露に基づいて選択した。変異VHまたはVLをそれぞれ親のVLまたはVHと組み合わせることにより、40のLN01バリエーションを組換えで作製した。これらのバリエーションを、3つのHIV-1株(CH119、X1632;BJOXおよび対照ウイルスSVA-MLV)の最初のパネルに対して試験した。いくつかのLN01バリエーションは部分的または完全に中和活性を失い(バリエーション13、14、21、18、19、20、22、23、24、32および33)、これは、抗原認識における元の残基の重要な役割を示す(特にVHのFR3、VHのCDR3内の残基、およびVLのCDR1の残基)。注目すべきことに、3つのバリエーションは、3倍(3x)を超える中和効力の増大を示した:バリエーション7(D32W、VHのCDR1における突然変異)、バリエーション8(VHのCDR1におけるN33W)およびバリエーション38(VLのFR3におけるS67W)(図13Bおよび13C)。顕著に、LN01バリエーション7は、親LN01抗体と比較して39倍の効力の増大を示した。これらの結果は、LN01バリエーション7、8および38を、親LN01抗体と並行して、8個のウイルスのマルチクレードパネルに対して試験したときに確認された(図14A~K)。この第2の試験において、LN01バリエーション7、8および38について観察された効力の増大は、それぞれ平均して4.7、2.3および2.7倍であった。

##### 【0075】

これらの結果に基づいて、付加的なLN01バリエーション(バリエーション41、42、43、44、48および50)を合成し、7個のHIV-1株のパネルに対して試験した(図15A~B)。バリエーション(v)41、42、43および44では、VHのCDR1のD32残基をF(v41)、Y(v42)、L(v43)またはI(v44)のいずれかに変異させた。興味深いことに、これらの4つの突然変異のいずれも、バリエーション7におけるWの導入で観察されたものと同じ効力の増大を付与しなかった。加えて、芳香族残基(すなわちFまたはY)の導入のみがLN01活性を改善し、Y(v42)は、平均して3.7倍の最も著しい改善を付与した(図15B)。同じ位置における疎水性残基の導入は、中和活性に関する利益を一切付与しなかった。バリエーション7で使用したD32W突然変異の存在下(バリエーション48)または非存在下(バリエーション50)において、FR1およびFR4における体細胞突然変異を生殖系列配置に戻した2つのバリエーションも試験した。VHのフレームワーク(FR)1およびFR4における体細胞突然変異の除去は、LN01中和活性を有意に変更しなかった。バリエーション50の骨格におけるD32Wの導入は、より強力な中和活性(親LN01抗体よりも平均して4.7倍良好)を付与した。しかしながら、VHの生殖系列FRとの関連でのD32Wが、完全変異された親LN01抗体(すなわちバリエーション7)の骨格上の同じ突然変異で観察されるものと同じレベルの効力の改善を達成しなかったことは注目に値する。

##### 【0076】

バリエーション7および8に導入された突然変異(D32WおよびN33W)の組合せも、49と呼ばれる新しいバリエーションにおいて、7ウイルスのパネルに対して試験し、これは、親LN01抗体と比較して平均8.1倍の高い効力を示した(図16A~B)。この結果は、LN01バリエーション49が非常に強力なLN01バリエーション7抗体と同等であるか、

10

20

30

40

50



それよりも優れていることを示す。

【 0 0 7 7 】

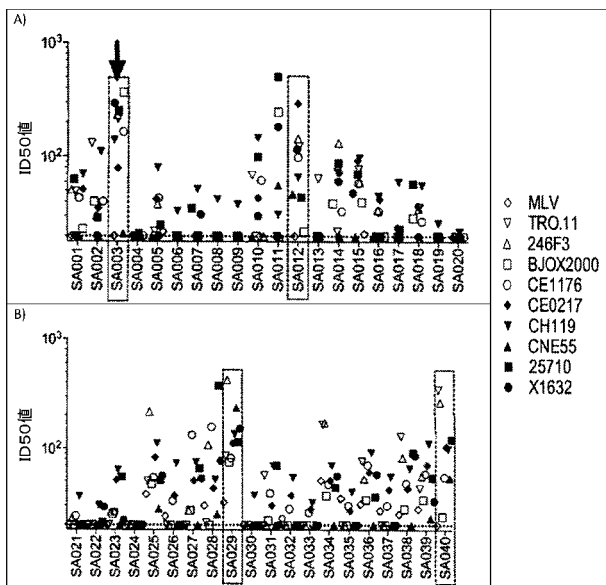
最後に、本発明者らは、5つのCDR1体細胞突然変異を生殖系列配置に戻した別のLN01バリエーションを試験した。突然変異CDR1配列D S V S N D N Y Y（配列番号82；下線を引いた5つのCDR1体細胞突然変異を含む）を、G S I S S S S Y Y（配列番号32；生殖系列CDR1）に戻して、LN01バリエーション82を作製した。驚くべきことに、LN01バリエーション82は、親LN01抗体よりも2.9倍高い効力を示した（図17）。この結果は、VH CDR1がLN01中和活性において重要な役割を果たすことを示す。

【 0 0 7 8 】

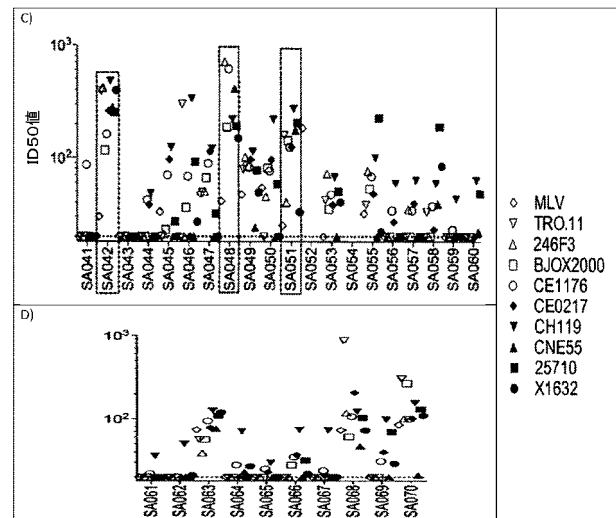
好ましい実施形態に関して特定の実施形態が記載されたが、変更形態および修正形態が当業者に想到されるであろうことは理解される。従って、以下の特許請求の範囲の範囲内に含まれるこのような均等な変更形態の全ては、特許請求の範囲により包含されることが意図される。

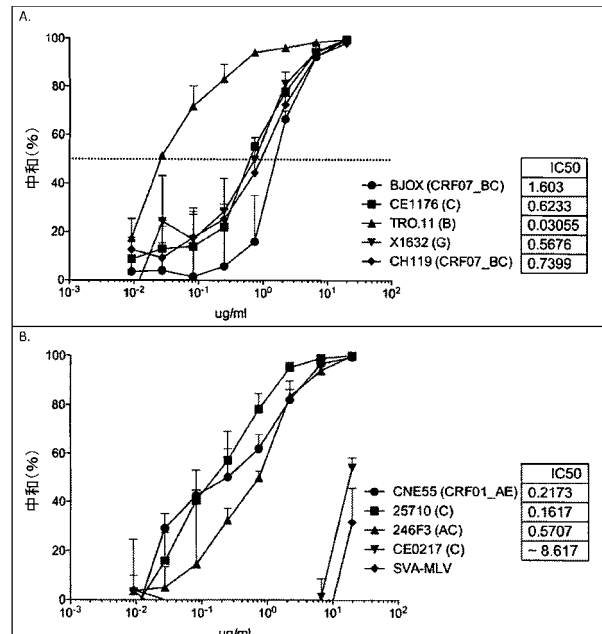
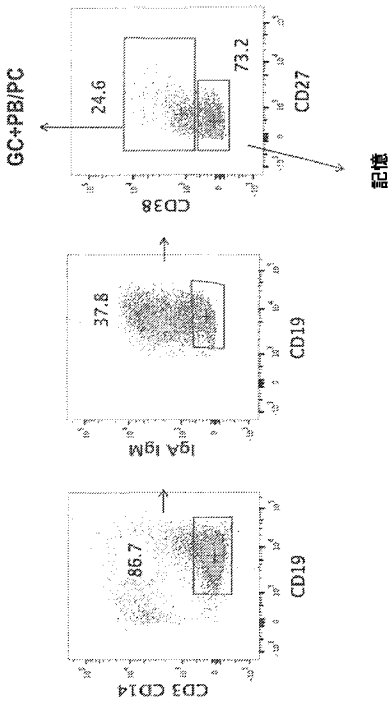
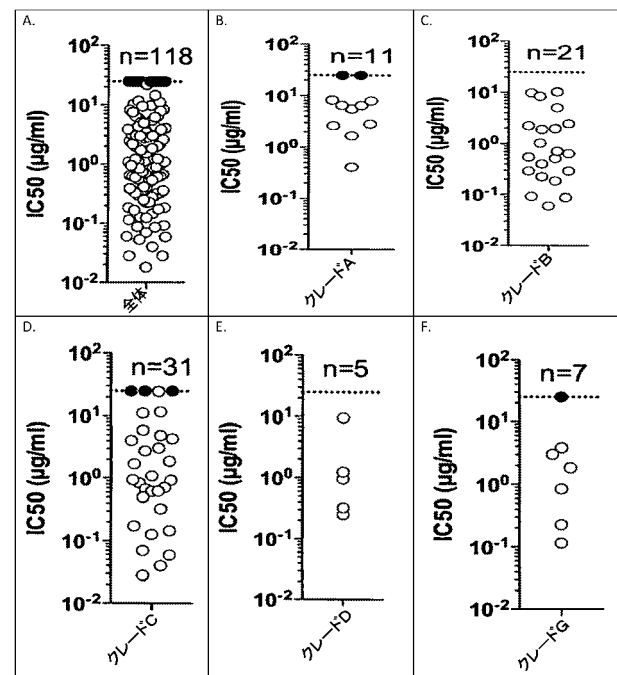
10

【 図 1 - 1 】

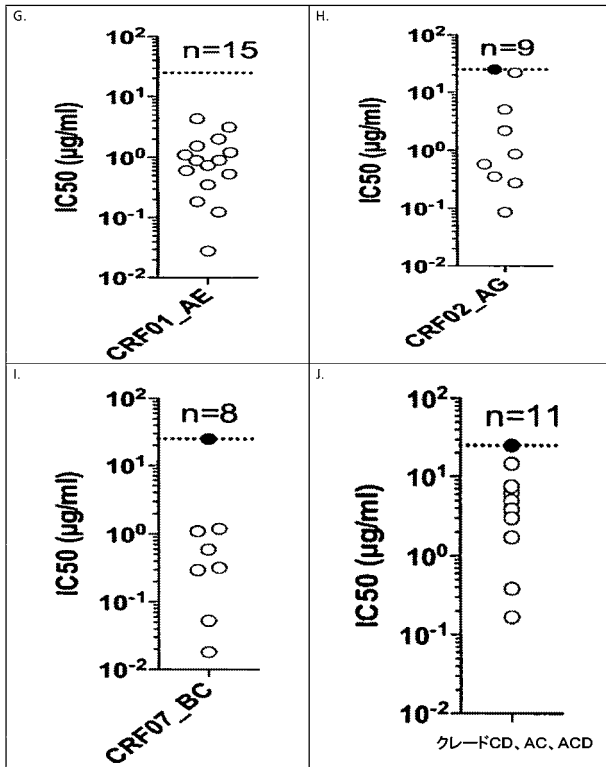


【 図 1 - 2 】

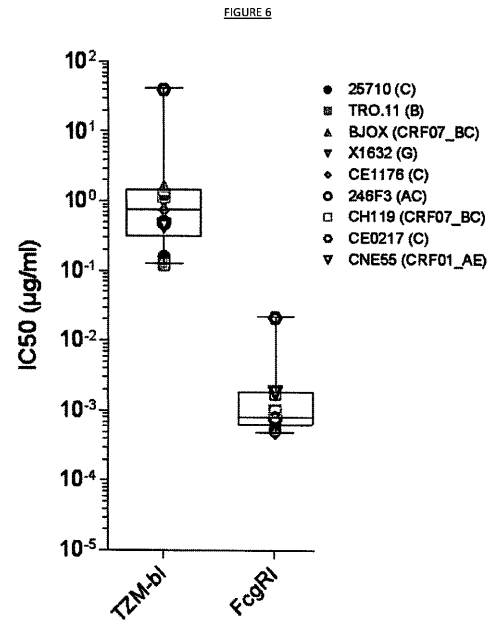


[illegible]

【図 5 - 2】



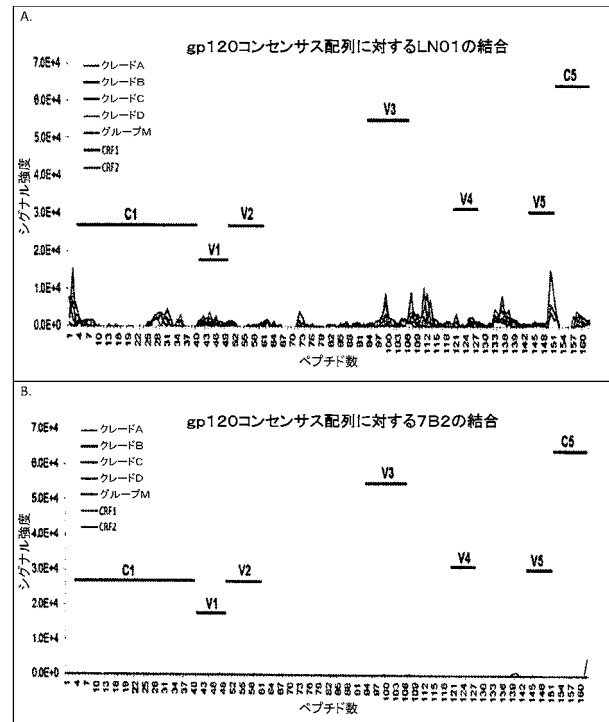
【図 6】



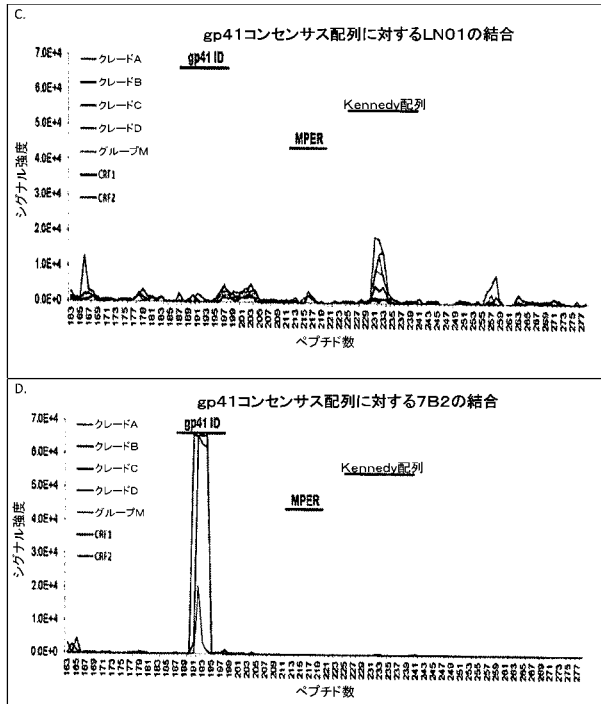
【図 7】

T2M-bi細胞におけるIC <sub>50</sub> (μg/ml)		ウイルス	クレード
		LN01	
		NEQELLALDKWASLWNWFDITKWLWYIKIFIMIV	
HIV-2/7312A	>25	NMYELQKLSWDVFGNWFDLASWVKYIQYGVYIV	
HIV-2/7312A.C1C	<0.011	-----LA-D--KNLW-----ITK-LW--K-----	
HIV-2/7312A.C3	>25	-----LA-DK-ASLW-----	
HIV-2/7312A.C4	<0.011	-----ITK-LW--K-----	
HIV-2/7312A.C6	>25	-----IT--I-----	
HIV-2/7312A.C7	>25	-----A-DKWA-----	
HIV-2/7312A.C8	<0.011	-----SLW-----ITK-LW--K-----	

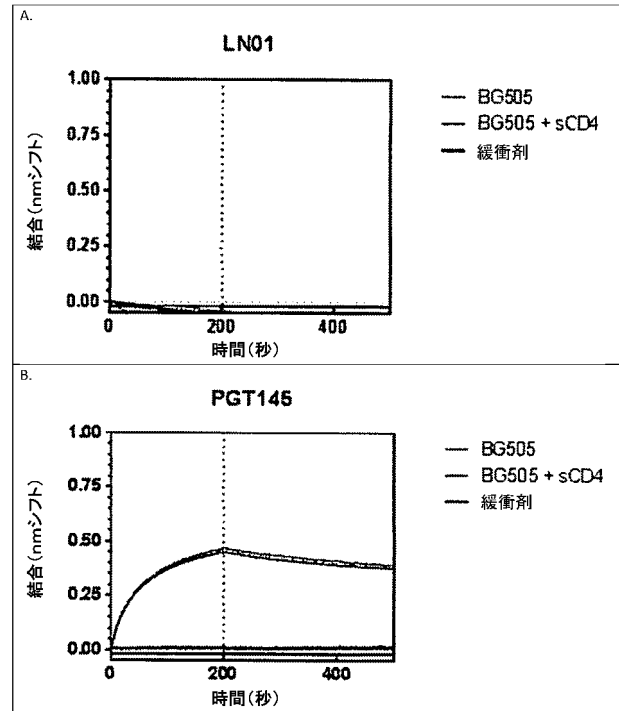
【図 8 - 1】



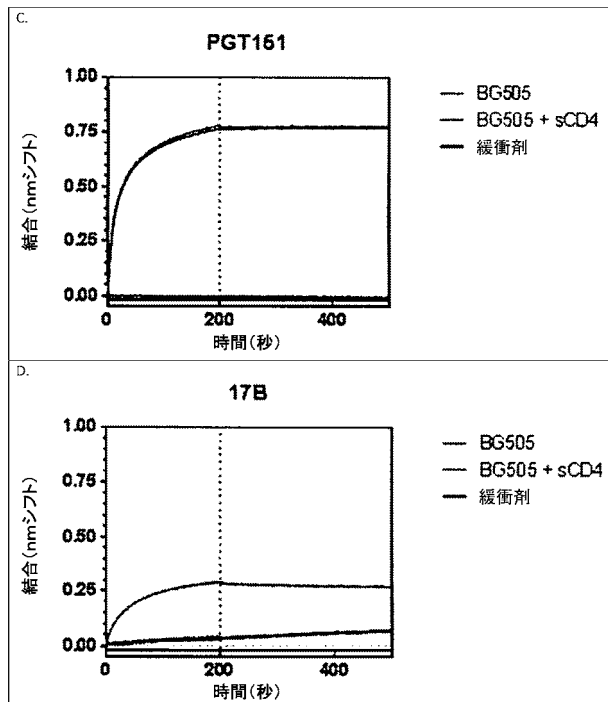
【図 8 - 2】



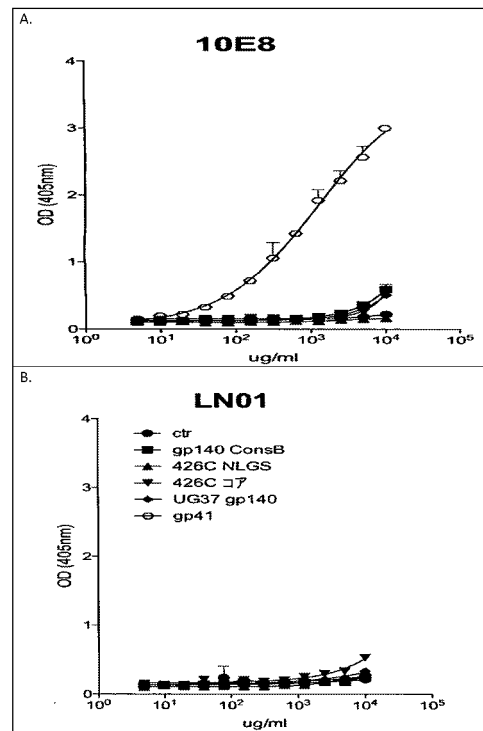
【図 9 - 1】



【図 9 - 2】

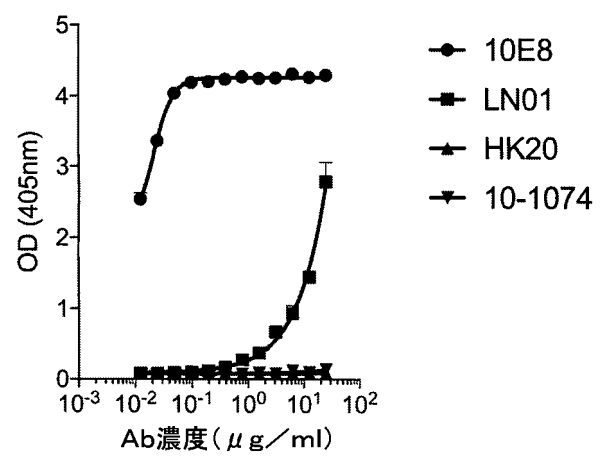


【図 10】



【 図 1 2 】

**PEP-0706 (28 aa)**



【 図 1 3 - 2 】

**B.**

IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )

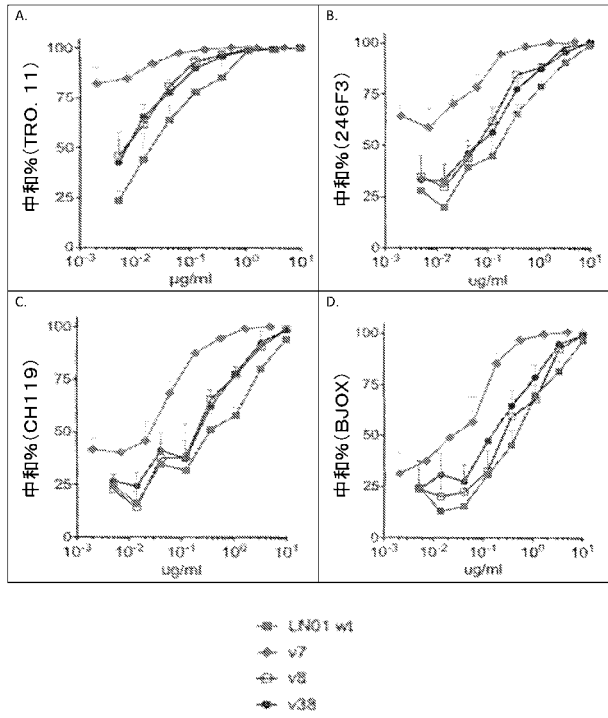
\* SVA-MLV  
■ X1632  
○ CH119  
◇ BJOX

LN01

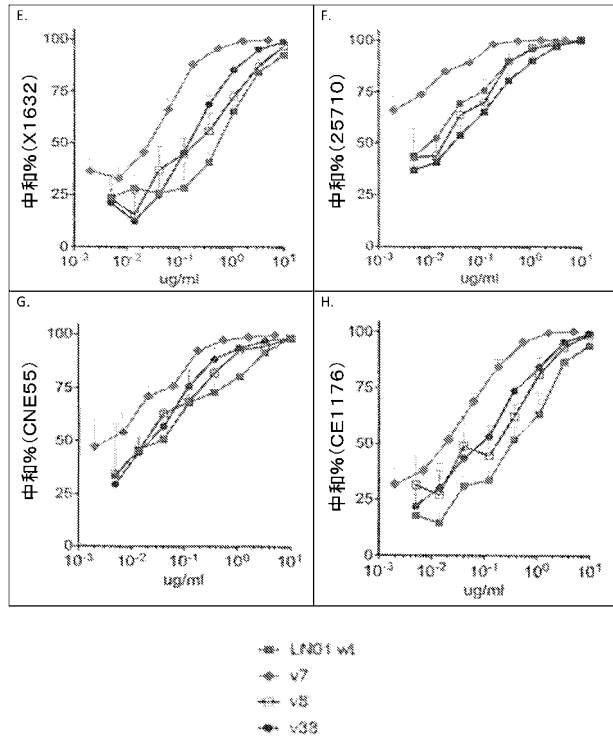
**C.**

IC<sub>50</sub> 比  
(IC<sub>50</sub> LN01 wt / IC<sub>50</sub> LN01 var.)

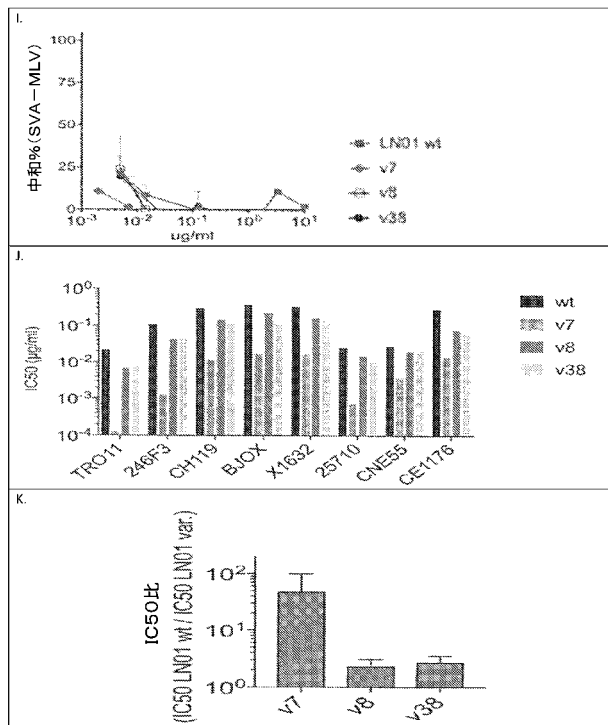
【図 14 - 1】



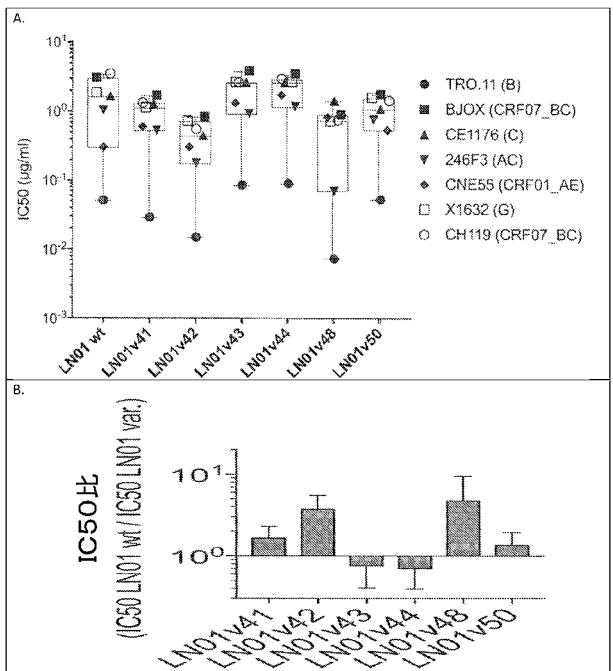
【図 14 - 2】



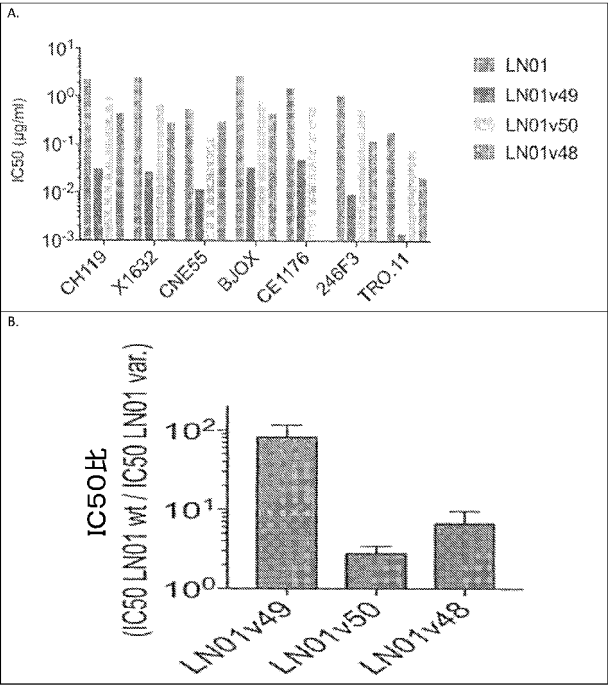
【図 14 - 3】



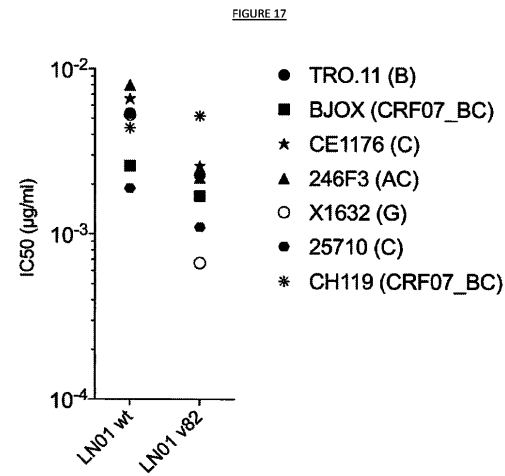
【図 15】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 配 列 表 】

2019509046000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2016/057367

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/10 ADD.		
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) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/046623 A2 (UNIV DUKE [US]; CAPRISA CT FOR THE AIDS PROGRAMME OF RES IN SOUTH AFRI) 21 April 2011 (2011-04-21) The whole document, in particular, Example 1, Table 4 -----	1-41
Y	WO 2013/070776 A1 (US HEALTH [US]) 16 May 2013 (2013-05-16) The whole document, in particular, SEQ ID NO:15 and the examples -----	1-41
Y	WO 01/24810 A1 (EPIMMUNE INC [US]; SETTE ALESSANDRO [US]; SIDNEY JOHN [US]; SOUTHWOOD) 12 April 2001 (2001-04-12) The whole document, in particular SEQ ID NO:8548, p.281 -----	1-41
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 March 2017		28/03/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Chapman, Rob



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB2016/057367**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 1-41(partially)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/IB2016/057367

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-41(partially)

The present claims are directed to HIV neutralising agents, without further technical features which would allow the skilled person to identify such agents.

Claim 1 lacks clarity as the meaning of 'the binding agent at least one amino acid sequence'. Does this mean comprises, consists, or binds? Furthermore, according to Rule 6.2(a) PCT, claims shall not rely, in respect of technical features of the invention, on references to the description or drawings (see also claim 10). According to Rule 6.3(a) PCT, the definition of the matter for which protection is sought shall be in terms of the technical features of the invention. Claim 4 does not refer to technical features, rather seeks to disclaim certain structural components. The ISA is only in a position to search for the presence of technical features, and not their absence (see also claim 7).

The application relates to sequence combinations which may or may not generate an antibody with defined technical properties. The examiner is unable to search the millions of combinations claimed without undue burden, furthermore, it is apparent that such a search would not be useful, since only an antibody defined by at least 6 CDRs (HCDR1-3, LCDR1-3) has any defined technical properties of binding. It is furthermore unlikely that CDRs composed of 'conservatively substituted variants' of defined sequences have the same properties of binding. In the present case, the target of binding is not even defined in the independent claim.

In the interests of clarity and for the purposes of an incomplete search, the applicant was requested to identify the subject-matter to be searched in more detail, for example, with reference to fully defined antibodies disclosed in the application and claims. However, the applicant did not respond within the prescribed time.

The search of the application has thus been restricted to embodiments which can be searched, i.e. antibodies to HIV, in particular HIV gp41, and an antibody comprising 6 CDRs corresponding to SEQ ID NO:1-6.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2016/057367

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011046623 A2	21-04-2011	US 2012269821 A1 WO 2011046623 A2	25-10-2012 21-04-2011
WO 2013070776 A1	16-05-2013	CN 104080805 A EP 2776463 A1 RU 2014118462 A US 2014342407 A1 US 2014348785 A1 US 2016333076 A1 WO 2013070776 A1	01-10-2014 17-09-2014 20-12-2015 20-11-2014 27-11-2014 17-11-2016 16-05-2013
WO 0124810 A1	12-04-2001	AU 1075001 A CA 2386499 A1 EP 1225907 A1 JP 4873810 B2 JP 2003510099 A WO 0124810 A1	10-05-2001 12-04-2001 31-07-2002 08-02-2012 18-03-2003 12-04-2001

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	
<b>C 1 2 Q 1/04 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/04	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	S
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	L
<b>A 6 1 P 31/18 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>G 0 1 N 33/569 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/18	
	G 0 1 N 33/569	H

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(71)出願人 511017287

インスティテュート・フォー・リサーチ・イン・バイオメディシン

INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE

スイス国 6 5 0 0 ベッリンツォーナ ヴィア ヴィンチェンツォ ヴェラ 6

(74)代理人 100073184

弁理士 柳田 征史

(74)代理人 100123652

弁理士 坂野 博行

(74)代理人 100175042

弁理士 高橋 秀明

(72)発明者 パンタレオ, ジュゼッペ

スイス国 1 0 1 1 ローザンヌ リュ ドゥ ビュニヨン 2 1 ケアオブ サントル オスピ  
タリエ ユニヴェルシテール ヴォドア

(72)発明者 ランザヴェッキア, アントニオ

スイス国 6 5 0 0 ベッリンツォーナ ヴィア ヴィンチェンツォ ヴェラ 6 ケアオブ イ  
ンスティテュート フォー リサーチ イン バイオメディシン

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ10 QS33

4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C084 AA13 MA52 MA55 MA59 MA66 NA14 ZB33

4C085 AA14 AA16 AA25 AA27 BB36 CC23 DD62 DD63 EE01 GG01

GG08 GG10

4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA29 EA53 FA74