

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5946766号  
(P5946766)

(45) 発行日 平成28年7月6日(2016.7.6)

(24) 登録日 平成28年6月10日(2016.6.10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K 14/16 (2006.01)	C 0 7 K 14/16
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02

請求項の数 12 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2012-518929 (P2012-518929)  
 (86) (22) 出願日 平成22年7月3日(2010.7.3)  
 (65) 公表番号 特表2012-531219 (P2012-531219A)  
 (43) 公表日 平成24年12月10日(2012.12.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/059513  
 (87) 国際公開番号 W02011/000962  
 (87) 国際公開日 平成23年1月6日(2011.1.6)  
 審査請求日 平成25年7月1日(2013.7.1)  
 (31) 優先権主張番号 09164565.5  
 (32) 優先日 平成21年7月3日(2009.7.3)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 61/223, 436  
 (32) 優先日 平成21年7月7日(2009.7.7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 512003825  
 ビオノー ル イミュノ エーエス  
 B I O N O R I M M U N O A S  
 ノルウェー、エヌー 3 7 0 2 シーエン、  
 ビー、オー、ボックス 2 8 7 0、クロ  
 ステルガタ 3 3  
 K l o s t e r g a t a 3 3, P. O  
 . B o x 2 8 7 0, N - 3 7 0 2  
 S k i e n, N O R W A Y  
 (74) 代理人 100065248  
 弁理士 野河 信太郎  
 (74) 代理人 100159385  
 弁理士 甲斐 伸二  
 (74) 代理人 100163407  
 弁理士 金子 裕輔

前置審査

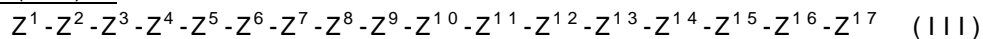
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H I V ワクチン組成物における使用又は診断手段としての使用のための H I V 関連ペプチドの組合せ又は融合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- 配列番号38の配列からなるアミノ酸配列を有する第1のペプチド、及び
- 式(III)：



(式中、 $Z^1$ はAspであり、 $Z^2$ はArgであり、 $Z^3$ はProであり、 $Z^4$ はGlu又はGlyであり、 $Z^5$ はGly又はArgであり、 $Z^6$ はIleであり、 $Z^7$ はGluであり、 $Z^8$ はGluであり、 $Z^9$ はGluであり、 $Z^{10}$ はGlyであり、 $Z^{11}$ はGlyであり、 $Z^{12}$ はGluであるか又は存在せず、 $Z^{13}$ はArg又はGlnであり、 $Z^{14}$ はAsp又はGlyであり、 $Z^{15}$ はArg又はLysであり、 $Z^{16}$ はAsp又はGlyであり、 $Z^{17}$ はArgである)

を有するか又は式(III)からの少なくとも13の連続するアミノ酸残基を有する式(III)のサブ配列を有する第2のペプチドであって、式(III)のペプチドがgp41の膜貫通ドメインに見出される対応するアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有する、第2のペプチド

を含んでなり、該第1及び第2のペプチドはリンカーを介して結合しており、HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインと結合して前記ドメイン間の結合を安定化させることができる抗体を誘導し得、かつgp120中のC5のN末端アミノ酸を欠いている、ペプチド組合せ又はその医薬的に許容される塩。

【請求項 2】

前記第1のペプチド及び前記少なくとも1つの第2のペプチドが、ビス-マレイミドリン

カー、ジスルフィドリンカー、ポリエチレングリコール(PEG)リンカー、グリシンリンカー、リジンリンカー及びアルギニンリンカーからなる群より選択されるリンカーを介して結合している、請求項 1 に記載のペプチド組合せ。

【請求項 3】

前記第 1 のペプチド及び前記少なくとも 1 つの第 2 のペプチドの少なくとも一方が N 又は C 末端修飾を含んでなる、請求項 1 又は 2 に記載のペプチド組合せ。

【請求項 4】

N 又は C 末端修飾がアミド化、アシル化又はアセチル化である、請求項 3 に記載のペプチド組合せ。

【請求項 5】

前記第 2 のペプチドが、配列番号 6、7、39、40、42、43、45若しくはそれらの少なくとも 13 アミノ酸のフラグメントからなる群より選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のペプチド組合せ。

【請求項 6】

GAKRRVVGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (配列番号38)

|  
GKGGIEEEGGRDRDRGGEQDRDR (配列番号39)、

GAKRRVVGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (配列番号38)

|  
GKGGIEEEGGERDRDRGGQDRDR (配列番号40)、

からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド組合せ。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのペプチド組合せを、医薬的に許容される希釈剤又はビヒクルと組み合わせて含んでなる、免疫原性組成物。

【請求項 8】

免疫学的アジュバントを更に含んでなる、請求項 7 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

ワクチン組成物である請求項 7 又は 8 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド組合せ。

【請求項 11】

抗レトロウイルス治療又はケモカイン療法と組み合わせるか、先行するか又は後続する医薬としての使用のための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド組合せ。

【請求項 12】

AIDSの治療若しくは予防におけるか又はHIV感染の治療における使用のための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド組合せ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、HIV感染及びAIDSの治療、診断及び予後予測のための新規な薬剤及び方法に関し、本発明は更に、該治療及び診断に有用な薬剤を同定し提供する方法に関する。

より詳細には、本発明は、或る種のHIVタンパク質中のドメイン間の複合体の安定化をもたらすことができる新規な治療剤に関し、該薬剤の存在を証明するに有用な診断剤及び予後予測剤に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

近年、AIDSが、単に慢性の細胞変性ウイルス感染の結果としてのCD4+ T-リンパ球の喪

10

20

30

40

50

失によって引き起こされるというよりむしろ、HIV-1により誘導される免疫学的疾患であるという概念を支持する大量の研究の証拠が蓄積されている。したがって、HIV-1により誘導される慢性免疫刺激もまた標的する介入を開発することが重要である。

#### 【 0 0 0 3 】

以前の研究により、HIV-1 gp120のカルボキシ末端C5ドメインに対する抗体は、より低い免疫活性化及びより遅い疾患進行に関連付けられることが示されている(Loomis-Priceら, 1998 J. Inf Dis. 178:1306-1316; Warren RQら, 1991 J. Clin Immunol 11:13-21; Lifsonら, 1991 J. Inf. Dis 163:959-965)。事実、このドメインに対する体液性(すなわち抗体)応答が喪失した場合、疾患の進行は加速することが示された(Wongら, 1993 J. Inf. Dis 168: 1523-1527)。更に、HIV感染個体の5%に相当する長期非進行個体(LTNP)は、HIV-1 gp120のカルボキシ末端C5ドメインに対する体液性応答を維持しており、或る程度のウイルス負荷を有するにも関わらず抗レトロウイルス治療なしで長年にわたり生存することができる(Lieglerら, 1998 J. Infect. Dis. 178: 669-79; Gougeonら, 1996 J. Immunol 156:3509-20; Muro-Cachoら, 1995 J. Immunol 154:5555-66; Easterbrookら, 1999 J. Infect 28:71-73)。

#### 【 0 0 0 4 】

gp120のC5ドメインは13アミノ酸長である(gp120のアミノ酸残基499～511であり、参照配列B.FR 83.HXB2 - TKAKRRVVQREKRを有する)。複数のウイルスクレードに横断的な保存を表1に示す。何らかの実質的変動を示す領域は、僅かに、該配列の500位及び507位であり、500位にはアミノ酸K、R及びEを優勢に含有し得、506位にはアミノ酸Q、Eを優勢に含有し得る。

#### 【 0 0 0 5 】

#### 【表1】

表1 (各種クレードのC5ドメイン)

C5配列 残基497-511	ウイルスクレード (%)					
	A	A1	A2	B	C	D
APT <b>K</b> AKRRVV <b>Q</b> REKR	3,1%	/	/	58.3%	0,7 %	/
APT <b>K</b> AKRRVV <b>E</b> REKR	21,9%	12.8%	/	/	23.5%	33.0%
APT <b>R</b> AKRRVV <b>Q</b> REKR	3,1%	/	/	12.4%	/	1.7%
APT <b>R</b> AKRRVV <b>E</b> REKR	15,6%	27.7%	33.3%	/	3.0%	33.3%
APT <b>E</b> AKRRVV <b>E</b> REKR	/	/	/	/	16.8%	3.3%
	<b>43.7%</b>	<b>40.5%</b>	<b>33.3%</b>	<b>70.7%</b>	<b>44.0%</b>	<b>68.3%</b>

#### 【 0 0 0 6 】

示した表は、Los Alamos HIVデータベースから2008年5月3日にダウンロードした1066配列をベースにした。

配列は下記のクレードに分類された：

A：32配列、A1：47配列、A2:10配列、B：453配列、C：464配列及びD：60配列。

#### 【 0 0 0 7 】

HIV-1 gp120のこのカルボキシ末端定常領域C5は免疫優性であり、複数のHIVサブタイプで横断的に高度に保存されている。これは、天然型gp120の3D構造、ビリオン及び細胞表面発現gp120で露出している。事実、C5ドメインは、ヒト白血球抗原(HLA)クラスI及びII分子に似ており、ペプチドに結合する能力を有し、C5ドメインの欠失によりペプチド結合が喪失する(Cadoganら, AIDS Research and Human Retorviruses (2008); Vol. 24: 845-855)。このように、C5ドメインは、ヒトHLAの活性を模倣することができる。

しかし、今日まで、C5関連免疫活性化の背後にある機序は、現時点で、ほとんど未知である。このことは、これら機序に基づいて医薬及び診断/予後予測手段を合理的に考案することは不可能であったことを意味する。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 8 】

## 発明の目的

HIV感染及びAIDSの保護及び/又は治療及び/又は診断及び/又は予後予測に使用することができる薬剤及び方法を提供することが、本発明の実施形態の1つの目的である。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 9 】

## 発明の要旨

本発明者らは、gp120のC5ドメインからのアミノ酸配列及びgp41の膜貫通ドメインからのアミノ酸配列から構成されるペプチド構築物(「ペプチド組合せ」)が、LTNP(長期非進行性)HIV感染対象者の大部分から単離された抗血清に認識される一方、HIVに感染してい

10

ない対象者からの抗血清にも非LTNP HIV感染対象者からの抗血清にも実質的に認識されないことを見出した。同様な結果が、C5及びC2由来ペプチドハイブリッドから構成されるペプチド構築物についても観察された。

より詳細には、C5ドメインのアミノ酸配列を、gp160でC5ドメインの外側に見出されるその他の種々のアミノ酸配列と組み合わせで含んでなる新規な抗原を用いた、HIV長期非進行個体(LTNP)中の抗体についての試験は、新たなものであり、驚くべき特性であると示されている。アミノ酸配列のこの組合せは、感染にも関わらず疾患進行の徴候を示さないHIV感染個体に独特な一連の抗体応答の同定に有用である。クレード間ウイルスバリエーションを組み込む同様な抗原が、長期非進行個体/選抜きの管理者(elite controller)に見出されるものと同等である広範な抗C5及び抗C5: CX(C5領域とgp41又はgp120中の非C5領域との間の結合を意味する)体液性応答を誘導するために使用される。

20

## 【 0 0 1 0 】

したがって、本明細書では、HIV感染個体の5%を特徴付けるLTNP状態は、少なくとも部分的に、C5及びTM-gp41又はC2の両方からのアミノ酸から構成される構造エピトープに対する抗体を発現するこれら感染個体の能力の結果であると結論付けられる。このような抗体は、C5及びTM-gp41又はC2の両方への結合に起因にして、C5がtm-gp41及び/又はC2と複合体化している特定コンホメーションを安定化させる。結果的に、これは、本明細書中で同定した抗体が有するものと同じ特異性を有する新規な抗体の開発及び製造の扉を開くが、C5とTM-gp41との間又はC5とC2との間の複合体形成を安定化することができる抗体を誘導し得る免疫原性薬剤の開発の扉も開く。

30

膜貫通gp41及び/又はgp120の定常ドメインC2の領域(CX)に接合体化又は複合体化したHIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120のカルボキシ末端C5ドメインに対するペプチド抗原は、HIV感染個体においてC5に関連する慢性免疫刺激を予防/抑制する抗体免疫応答を惹起するためのワクチン剤として使用することができる。これらドメインに対するペプチド抗原はまた、HIV感染個体が長期非進行性患者であり得るか又はワクチン接種についての候補者であるかを決定するために、該感染個体中の前記抗体を同定するための診断剤及び予後予測剤中で使用することもできる。この検査はまた、ワクチン接種が成功したかを決定するためにも使用し得る。

## 【 0 0 1 1 】

本発明は、C5関連免疫活性化の新規な機序を提供するので、C5とgp41及び/又はC2との相互作用を安定化して、C5関連免疫活性化を導き得る遊離C5の利用可能性を予防する、抗体以外の分子の可能性もまた強調する。

40

HIV-1 gp120のC5ドメインは、多くの様式で、免疫活性化と関連付けられ得る：

1) C5は、感染細胞の異なるHLA分子上でペプチドとして提示され得る。500位及び507位のバリエーションは、複数のHLA分子と相互作用するための可塑性を示す。

2) C5は、ペプチドと結合し、HLA分子として機能して、T細胞レセプターと相互作用することができる。TCR複合体との相互作用に関与するその他の分子は、細胞表面上に存在しているか、又はウイルス粒子中に組み込まれている(Cadoganら, 2008 AIDS Res and Hum Retroviruses 24:845-55)。

## 【 0 0 1 2 】

50

記載したように、これは、HIVがもたらす免疫活性化を標的する幾つかの新たな方法の扉を開く：

C5がgp41及び/又はC2と結合/複合体化したままであることにより安定化される場合、C5は不活性/不活動のままである。したがって、C5は、gp41との結合とC2への結合との間を揺れ動いているようである。他方、C5がgp41又はC2のいずれかから離脱すると、C5は免疫活性化を導くことができる。

したがって、(全てが本発明に従って企図される)多くの様式で、C5関連免疫活性化を遮断することができるはずである：

gp41及びC2との相互作用の状態にC5からのペプチドを含んでなるペプチド組合せは、C5とgp41又はC2との間のインビボ複合体を模倣し、天然型複合体に対する抗体応答を引き起こすことができる。これら抗体は、次に、C5を立体構造的に「ロック」することによってC5関連免疫活性化を遮断することができる。

また、(ペプチド組合せにより誘導される抗体に類似する様式で)C5の離脱を遮断し、C5をgp41又はC2と安定に維持する小分子、又は遊離のC5に結合しそのことによりC5を不活性にして免疫活性化を遮断する小分子若しくは抗体。例えば、C5と相互作用するC2及びgp41の領域に対応する小分子は、このC5関連免疫活性化を阻害するために使用することができる。

#### 【 0 0 1 3 】

gp41及び/又はC2のドメインに複合体化/接合体化したHIV-1のC5ドメインをベースにしたワクチンは、誘導される抗体が一般には非中和性であるので、HIVワクチンへの従来の抗体アプローチとは異なる。HIVワクチンへのその他のアプローチには、gp120全体、gp41又は非切断前駆体gp160について取り組まれている、より大きな抗原が含まれる。しかし、それらアプローチでは、gp41及び/又はC2と特異的に複合体化したC5ドメインの領域について取り組まれていない。

よって、本発明の第1の観点では、ヒト免疫不全ウイルスI (HIV) gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を安定化させ得る1以上の薬剤の有効量を投与することを含んでなる、HIVに感染したヒトにおいてHIVの病理学的影響を減少及び/又は遅延させる方法が提供される。

第2の観点では、ヒト免疫不全ウイルスI (HIV) gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を安定化させる抗体を誘導する1以上の免疫原の有効量を投与することを含んでなる、HIVに感染したヒトにおいてHIVの病理学的影響を減少及び/又は遅延させる方法が提供される。

#### 【 0 0 1 4 】

第3の観点では、HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を安定化させる抗体を誘導する1以上の免疫原の有効量を投与することを含んでなる、後天性免疫不全症候群(AIDS)又はHIV疾患の発症リスクを減少させる方法が提供される。

第4の観点では、HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を安定化させ得る薬剤の有効量を投与することを含んでなる、後天性免疫不全症候群(AIDS)発症のリスクを減少させる方法が提供される。

第5の観点では、

- HIV gp120のC5ドメインの、0～4のアミノ酸置換を含む13アミノ酸残基のアミノ酸配列、そのサブ配列又は前記アミノ酸配列若しくはサブ配列のインベルソ、レトロ若しくはレトロ-インベルソ形態を含んでなるアミノ酸配列を含んでなる第1のペプチド、及び
- gp41の膜貫通ドメイン若しくはgp120の定常C2ドメイン中に存在するアミノ酸ストレッチを有するか又は配列番号6～13のいずれか1つに存在するアミノ酸ストレッチを有するか又はgp41の膜貫通ドメイン若しくはgp120の定常C2ドメイン中に存在するアミノ酸ストレッチのインベルソ、レトロ又はレトロ-インベルソ形態を有する少なくとも1つの第2のペプチド

を含んでなるペプチド組合せが提供される。ここで、該ペプチド組合せは、HIV gp120のC

10

20

30

40

50

5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインと結合し、前記ドメイン間の結合を安定化させることができる抗体を誘導し得、該ペプチド組合せはgp120中のC5のN末端でアミノ酸を欠いている。

【0015】

第6の観点では、本発明のペプチド組合せを医薬的に許容される希釈剤又はビヒクル及び任意に免疫学的アジュバントと組み合わせて含んでなる免疫原性組成物が提供される。

第7の観点では、

- 本発明のペプチド組合せの第1のペプチドと同一である第1のペプチド(但し、該第1のペプチド中のアミノ酸残基はAla、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp及びTyrからなる群より選択されるL型である)と、

- 本発明のペプチド組合せの第2のペプチドと同一である少なくとも1つの第2のペプチド(但し、該第2のペプチド中のアミノ酸残基はL型である)

を含んでなるペプチド組合せをコードする核酸フラグメントが提供される。ここで、該ペプチド組合せは、HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインと結合し、前記ドメイン間の結合を安定化させることができる抗体を誘導し得、該ペプチド組合せはgp120中のC5のN末端でアミノ酸を欠いている。

【0016】

第8の観点では、本発明の核酸フラグメントを含んでなるベクターが提供される。

第9の観点では、本発明の核酸フラグメント又はベクターを医薬的に許容される希釈剤又はビヒクル及び任意に免疫学的アジュバントと組み合わせて含んでなる免疫原性組成物が提供される。

第10の観点では、gp120のC5ドメイン中のアミノ酸とgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメイン中のアミノ酸とから構成されるエピトープに結合する抗体の存在を決定する方法であって、該抗体を含んでなる可能性のあるサンプルを本発明による少なくとも1つのペプチド組合せと接触させ、該サンプル中での該少なくとも1つのペプチド組合せと該抗体との間の結合を定量的又は定性的に決定することを含んでなる方法が提供される。

【0017】

第11の観点では、gp120のC5ドメイン中のアミノ酸とgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメイン中のアミノ酸とから構成されるエピトープに結合する抗体の存在を決定するキットであって、本発明の少なくとも1つのペプチド組合せ、液体サンプルを該ペプチド組合せと反応させる手段及び抗体と該ペプチド組合せとの間の陽性又は陰性の結合反応の存在を決定する手段を含む、キットが提供される。

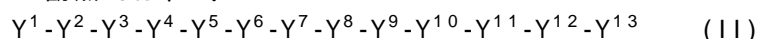
第12の観点では、HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を安定化させ得る物質を単離する方法であって、

- 前記結合を安定化させ得ることが以前に確かめられている参照薬剤を、C5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はC2ドメインとに対する安定結合から又はC5ドメインの代理物(surrogate)と前記膜貫通ドメイン及び/又はC2ドメインの代理物とに対する結合から追い出す能力について候補薬剤を試験し、前記参照薬剤を追い出し得る候補薬剤を単離するか、又は、

- C5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120のC2ドメインとの間の複合体の代理物に結合する能力について候補薬剤を試験し、該代理物との有意な結合をもたらし得る薬剤を単離することを含んでなる方法が提供される。

【0018】

第13の観点では、式II：



(式中、 $Y^1$ はThrであり、 $Y^2$ はLys、Arg、Har(ホモアルギニン)及びGluから選択され、 $Y^3$ はAla及びValから選択され、 $Y^4$ はArg、Lys、Har及びCit(シトルリン)から選択され、 $Y^5$ はArg、Lys、Har及びCitから選択され、 $Y^6$ はArg、Har、Lys及びCitから選択され、 $Y^7$ はVal、L

10

20

30

40

50

eu、Ile及びNle(ノルロイシン)から選択され、Y<sup>8</sup>はVal、Leu、Ile及びNleから選択され、Y<sup>9</sup>はGln、Glu、Asn及びAspから選択され、Y<sup>10</sup>はArg、Har及びCitから選択され、Y<sup>11</sup>はGlu及びAspから選択され、Y<sup>12</sup>はLysであり、Y<sup>13</sup>はArg、Har及びCitから選択され、ここで、Y<sup>3</sup>はValであり、及び/又は

Y<sup>4</sup>はArg、Har及びCitから選択され、及び/又は

Y<sup>5</sup>はLys及びCitから選択され、及び/又は

Y<sup>6</sup>はLys及びCitから選択され、及び/又は

Y<sup>7</sup>はLeu、Ile及びNleから選択され、及び/又は

Y<sup>8</sup>はLeu、Ile及びNleから選択され、及び/又は

Y<sup>9</sup>はGlu、Asn及びAspから選択され、及び/又は

Y<sup>10</sup>はCitであり、又はY<sup>11</sup>はAspであり、又はY<sup>13</sup>はCitである)

を有するアミノ酸配列を含んでなるか、又は式IIのアミノ酸配列の少なくとも6アミノ酸残基のサブ配列を含んでなるか、又は前記アミノ酸配列若しくはサブ配列のインベルソ、レトロ若しくはレトロ-インベルソ形態を含んでなる、gp120のC5ドメインのアナログが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1：ヒストグラム及び線グラフの組合せ。線グラフはペプチド溶液A(配列番号1単独)及びB(配列番号1及び6)について測定したOD値間の比を示し、ヒストグラムは配列番号1についての各比インターバル内での平均応答を示す。エラーバーは、stdev/(nの平方根)として算出した。詳細については実施例4を参照。

【図2】図2：異なる対象者群(LTNP、HIV陽性個体及び血液ドナー)におけるA(配列番号1単独)に対する応答とB(配列番号6と組み合わせた配列番号1)に対する応答との比較。ボックスは四分位範囲を示す。メジアン値は水平線で示す。ボックスの各端から伸びる線 = 四分位範囲の単位長さの1.5倍。十字印 = 前記線の端を越える値。

【図3】図3：異なる抗原を用いる抗体結合の阻害。使用した抗原：BI400-B、C5(BI400-015)、gp41ペプチド(BI400-201)、C2ペプチド(BI400-201d)、組換えgp41。BI301-23は、HIVに関連しない無関係なペプチドである。PBSはペプチド抗原を含まないリン酸緩衝化生理食塩水である。詳細については実施例5を参照。

【図4】図4：LTNPからの血清を用いるC5/gp41へのBI400-B抗体結合の交差競合。LTNP-プール1は、5人の規定のLTNP患者から集めた血清からなるプールである。LTNP-プール2は、他の4人の規定のLTNP患者から集めた血清からなるプールである。BDプールは、健康血液ドナーからの10血清からなるプールである。

【図5】図5：HIV感染個体における抗C5/gp41抗体の保有率はウイルス負荷により変化する。ボックスは四分位範囲を示す。メジアン値は水平線で示す。ボックスの各端から伸びる線 = 四分位範囲の単位長さの1.5倍。詳細については実施例5を参照。

【発明を実施するための形態】

【0020】

発明の詳細な開示

定義

「1(つ)の(one)」、「a」又は「an」のような用語を本開示で使用する場合、それらは、特に示さない限り、「少なくとも1つ」又は「1以上」を意味する。更に、用語「含んでなる」は「含む」を意味するものとし、よって明示されたもの以外のその他の構成要素、特徴、条件又は工程の存在を許容する。

「HIV」は、一般には、ヒト免疫不全ウイルスIを指称する。

「HIV疾患」は、しばしばインフルエンザ様感染として顕在化する急性HIV感染並びに早期及び中間期ステージの症候性疾患(皮疹、疲労、寝汗、若干の体重減少、口の潰瘍並びに皮膚及び爪の真菌感染のような幾つかの非特徴的症状を有する)を含む幾つかのステージから構成される。ほとんどのHIV感染者は、これらのようなマイルドな症状を、より重篤な病気を発症する前に経験する。一般には、最初のマイルドな症状が現れるには5～7

10

20

30

40

50

年かかると考えられている。HIV疾患が進行するにつれ、未だAIDSと診断されなくとも全く不健康になる個体もある(下記参照；HIV疾患の後期ステージ)。典型的な問題として、口又は膣の慢性皰口瘡(真菌発疹又は斑)、口(口唇ヘルペス)又は生殖器の再発性ヘルペス水疱、持続的発熱、持続性下痢及び顕著な体重増加が挙げられる。「AIDS」は、後期ステージのHIV疾患であり、免疫系の効果を進行性に低下させ、個体を日和見感染及び腫瘍に感染し易くする病的状態である。

#### 【0021】

本明細書中で使用する場合、用語「gp120」は、gp160(HIV env遺伝子の唯一の発現産物である)の酵素切断産物である約120kDaのN末端糖タンパク質を意味する。gp120は感染性HIVビリオン上に「スパイク」を形成し、gp41に非共有結合的に結合する。

10

「gp41」は、gp160の酵素切断C末端産物である約41kDaの糖タンパク質を指称する。gp41は、HIV感染細胞中又は感染性HIVビリオンのウイルスキヤプシド内に局在する。gp41は、gp120に非共有結合的に結合するN末端膜貫通ドメインを有する。この膜貫通ドメインは、本明細書中で、「gp41の膜貫通ドメイン」又は「tm-gp41」と名付けた。この用語は、その範囲に、天然に存在する変異型の配列、例えば式IIIに記載のものを包含する。

「C5」又は「C5ドメイン」は、gp120のC末端13アミノ酸残基を指称する。

「C2」又は「C2ドメイン」は、gp120中の保存領域を指称する。C2中の領域は、gp120の内部近位ドメインにおいて、C5と逆平行  $\beta$ -シートを形成する。

#### 【0022】

「HIVの病理学的影響を減少及び/又は遅延させる」は、本発明に関しては、本発明の方法の使用が、本発明に従って治療されるHIV感染個体で観察される罹患率の統計学的に有意な減少及び/又は遅延を提供することをいうものとする。すなわち、AIDSを特徴付ける疾患症状の発現時期が、非治療コントロールと比較してより遅く、及び/又は病理学的症状発現の数が、本発明の治療を受けていないコントロールに対して減少する。

20

表現「HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合」は、C5がtm-gp41及びC2の両方又は一方と非共有結合的に相互作用することができることを意味する。tm-gp41との相互作用は分子間である一方、C2との相互作用は分子内である。

#### 【0023】

HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を「安定化し得る薬剤」は、gp41との分子間結合から及び/又はC2との分子内結合からのC5の遊離を予防するか又は統計学的に減少させる組成物である。一般に、このような薬剤は、この効果を発揮し得る任意の物質であるが、重要な例は、抗体、抗体フラグメント及び抗体アナログである。しかし、C5とtm-gp41及び/又はC2との間の複合体に関して妥当な結合親和性を有するその他の分子もまた、本発明に従う薬剤である - 正確な分子形式は結合特性より重要性は低く、本発明によれば、該薬剤はレセプター又はレセプターアナログであることができ、小分子の安定化剤もまた本発明の薬剤として機能し得る。

30

用語「抗体」は、本明細書中では、最も広義に使用され、具体的には全長のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体(例えば、二特異性抗体)及び抗体フラグメントを、それらが所望の生物学的活性を示す(すなわち上記の薬剤として機能する)限りに  
40  
において含む。抗体産生に関する種々の技法が、例えばHarlowら, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988) .)に提供されている。

#### 【0024】

「抗体フラグメント又は抗体アナログ」は、全長抗体の一部、好ましくはその抗原結合領域又は可変領域を含んでなる。抗体フラグメント/アナログの例としては、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>3</sub>、Fv(代表的には、抗体の単一腕のVL及びVHドメイン)、一本鎖Fv(scFv)、dsFv、Fdフラグメント(代表的にはVH及びCH1ドメイン)及びdAb(代表的にはVHドメイン)フラグメント；VH、VL、VhH及びV-NARドメイン；ミニボディ、ダイアボディ、トリ  
50  
アボディ、テトラボディ及びカップボディ(例えば、IIIら, Protein Eng 1997;10: 949

-57を参照) ; ラクダIgG ; IgNAR ; 及び抗体フラグメントと1以上の単離CDR又は機能的パラトープとから形成される多特異性抗体フラグメント(機能的抗体フラグメントを形成するように、単離されたCDR又は抗原結合性の残基若しくはポリペプチドが結合又は連結され得る)が挙げられる。種々のタイプの抗体フラグメントが、例えば、Holliger及びHudson, Nat Biotechnol 2005; 23, 1126-1136 ; WO2005040219並びに公開された米国特許出願20050238646及び20020161201に記載又は概説されている。

用語「抗体誘導体」は、本明細書中で使用する場合、例えば第2の分子に連結するために、1以上のアミノ酸が化学的に、例えばアルキル化、PEG化、アシル化、エステル形成又はアミド形成などにより修飾されている全長抗体又は抗体のフラグメント(好ましくは、抗体の少なくとも抗原結合領域又は可変領域を含んでなる)を含んでなる。これには、PEG化抗体、システイン-PEG化抗体及びそれらの変形体が包含されるが、これらに限定されない。

#### 【0025】

「接合体」は、本明細書中で使用する場合、細胞傷害剤、検出可能な薬剤などのような第2の薬剤に結合又は連結した、抗体誘導体のような本発明に従う薬剤を含んでなる。接合体は、共有結合的に連結されたペプチドから構成され得る(接合体の例は、ペプチド結合を介して連結された2つのペプチドを含んでなる融合ペプチドであり、その結果、この場合の接合体は核酸フラグメントからの発現産物であり得る)が、接合体はまた、化学的接合を介して共有結合したペプチド組合せであることもできる(従来例は、グルタルアルデヒドを用いる接合である)。より複雑な接合の他の例は、本発明の薬剤又はペプチド組合せ又はその他の化学物質がキャリア分子に連結し、このキャリア分子が更に本発明の別の薬剤、ペプチド組合せ又はその他の化学物質とカップリングしている例(例えば、化学物質がポリ-リジンキャリア(リジン「ツリー」)に結合しているとき)である。

#### 【0026】

「ヒト化」抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するヒト/非ヒトキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト(例えば、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類)種(ドナー抗体)の超可変領域の残基で置換されている、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの場合では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基が、対応する非ヒト残基で置換されている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでなり得る。これら改変は、抗体の性能を更に洗練するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、代表的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含んでなり、該可変ドメインでは超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、FR残基の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものに相当する。ヒト化抗体はまた、任意に、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、代表的にはヒト免疫グロブリンのものを含んでなっているもよい。更なる詳細については、例えば、Jonesら, Nature 321:522-525 (1986) ; Riechmannら, Nature 332:323-329 (1988) ; 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)、WO 92/02190、米国特許出願20060073137、米国特許第6,750,325号、同第6,632,927号、同第6,639,055号、同第6,548,640号、同第6,407,213号、同第6,180,370号、同第6,054,297号、同第5,929,212号、同第5,895,205号、同第5,886,152号、同第5,877,293号、同第5,869,619号、同第5,821,337号、同第5,821,123号、同第5,770,196号、同第5,777,085号、同第5,766,886号、同第5,714,350号、同第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,530,101号、同第5,585,089号及び同第5,225,539号を参照。

#### 【0027】

参照抗体の「生物学的特徴」を有する抗体は、同じ抗原に結合するその他の抗体と区別する参照抗体の生物学的特徴の1つ以上を有するものである。

用語「ペプチド」は、本発明に関しては、2~10アミノ酸残基の短いペプチド、11~100アミノ酸残基のオリゴペプチド及び100アミノ酸残基を超えるポリペプチドのいずれをも意味するものとする。ペプチド中のアミノ酸に言及する場合、アミノ酸はその他の情報が

10

20

30

40

50

提供されていなければL-アミノ酸であるものとする。

「タンパク質」は、少なくとも1つのペプチドを含んでなる機能的生体分子を指称するものとする；少なくとも2つのペプチドを含んでなる場合、これらは複合体を形成していてもよいし、共有結合していてもよいし、又は非共有結合的に連結していてもよい。タンパク質中のポリペプチドは、グリコシル化及び/又は脂質化することができ、及び/又は補欠分子団を含んでなることもできる。

【0028】

「ペプチド組合せ」は、互いに非天然の配置で少なくとも2つのペプチドによって構成される分子を指称する。例は、そのアミノ酸のうちの少なくとも1つの側鎖を介して共有結合しているか、又は末端を介して(例えば、ペプチド結合を介して)連結しているが、天然に出現しない形状である同じタンパク質又は異なるタンパク質からのペプチドである。ペプチド組合せの代表例は、下記で詳述する。

ペプチドの「変形体」又は「アナログ」とは、参照ペプチドと、代表的には天然型又は「親」ポリペプチドと実質的に同一であるアミノ酸配列を有するペプチドをいう。ペプチド変形体は、天然型アミノ酸配列内の或る特定位置に1以上のアミノ酸置換、欠失及び/又は挿入を有していてもよい。

【0029】

「保存的」アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同様な物理化学的性質の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである。同様な側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野において公知であり、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分枝側鎖を有するアミノ酸(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。保存的アミノ酸置換の特定の形態は、遺伝子コードによってコードされる通常の20アミノ酸ではないアミノ酸での置換を含む。本発明の好適な実施形態は合成ペプチドの使用を包含するので、本明細書中に開示されたペプチドにおいてこのような「天然に存在しない」アミノ酸残基を提供することに問題はなく、よってアミノ酸残基の側鎖中の天然の飽和炭素鎖を、より短い又はより長い飽和炭素鎖と交換することが可能である - 例えば、リジンは側鎖 $-(CH_2)_nNH_3$ (式中、 $n$ は4ではない)を有するアミノ酸で置換し得、アルギニンは側鎖 $(CH_2)_nNHC(=NH_2)NH_2$ (式中、 $n$ は3ではない)を有するアミノ酸で置換し得る、など。同様に、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸及びグルタミン酸は側鎖 $-(CH_2)_nCOOH$ (式中、 $n > 2$ )を有するアミノ酸残基で置換し得る。

【0030】

ペプチドの「レトロ形態」は、N末端 C末端方向のアミノ酸の順序が反転しているペプチドの形態である。例えば、ALDFRのレトロ形態はペプチドRFDLAである。

「インベルソ」形態は、インベルソ形態中の各アミノ酸がペプチド中の対応するアミノ酸と比較して反対の立体化学構造であるという事実によって特徴付けられる。よって、ペプチドがL-アミノ酸から構成される場合、そのインベルソ形態はD-アミノ酸から構成される。

ペプチドの「レトロ-インベルソ」形態は、インベルソ形態及びレトロ形態の両方であるペプチドの形態である。L-ala - L-Arg - L-Lysのレトロ-インベルソ形態は、D-Lys - D-Arg - D-alaである。

【0031】

2つのアミノ酸配列に関して、用語「実質的に同一」は、該両配列が、最適に整列されたとき(例えばデフォルトのギャップウェイトを用いるプログラムGAP又はBESTFITにより)、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約90、少なくとも約95、少なくとも約98又は少なくとも約99パーセントの配列同一性を有する

ことを意味する。1つの実施形態において、同一でない残基位置は保存的アミノ酸置換によって異なる。配列同一性は、代表的には、配列分析ソフトウェアを使用して測定する。タンパク質分析ソフトウェアは、種々の置換、欠失及びその他の改変(保存的アミノ酸置換を含む)に割り当てられた類似性の尺度を使用して同様な配列を適合させる。例えば、公衆に利用可能なGCGソフトウェアは、デフォルトのパラメータで使用して、密接に関連するポリペプチド(例えば、異なる生物種からの相同ポリペプチド)間又は野生型タンパク質とそのムテインとの間の配列相同性又は配列同一性を決定することができる「Gap」及び「BestFit」のようなプログラムを含む。例えば、GCG Version 6.1を参照。ポリペプチド配列はまた、デフォルト又は推奨されるパラメータを適用してFASTA又はClustalWを用いて比較することができる。GCG Version 6.1.中のプログラムFASTA(例えば、FASTA2及びFASTA3)は、クエリー配列とサーチ配列との間で最良のオーバーラップ領域の整列(alignment)及びパーセント配列同一性を提供する(Pearson, Methods Enzymol. 1990;183:63-98; Pearson, Methods Mol. Biol. 2000;132:185-219)。配列を種々の生物からの多数の配列を含むデータベースと比較するとき又は推論するときには好適な別のアルゴリズムは、デフォルトパラメータを用いるコンピュータプログラムBLAST、特にblastpである。例えば、Altschulら, J. Mol. Biol. 1990;215:403-410; Altschulら, Nucleic Acids Res. 1997;25:3389-402 (1997)(参照により本明細書中に組み込む)を参照。2つの実質的に同一のアミノ酸配列中の「対応する」アミノ酸位置は、本明細書中で言及したタンパク質分析ソフトウェアのいずれかにより(代表的には、デフォルトパラメータを用いて)整列させたときの位置である。

#### 【0032】

用語「サブ配列」は、一般には、天然に存在するアミノ酸配列又は核酸配列に直接由来する少なくとも3アミノ酸又は該当する場合には少なくとも3ヌクレオチドの任意の連続ストレッチを意味する。しかし、本発明のペプチド組合せを議論する場合には、サブ配列は、1又は2アミノ酸程度の短いものであり得る。これは、本発明のペプチド組合せが、一緒になって抗体の構造エピトープを少なくとも形成する、異なるペプチドドメインからのアミノ酸を含むからである。よって、このような構造エピトープは、tm-gp41からの1又は2アミノ酸だけからではなく、C5からの4アミノ酸からも構成され得る - ここで、重要な点は、2つのドメインからのこの組合せエピトープが安定化され得ること、すなわちインビボでの該エピトープへの抗体結合がC5とtm-gp41及び/又はC2との間の形状を安定化することである。

核酸は、別の核酸配列と機能的関係に配置されている場合、「作動可能に連結している」。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関連するプレタンパク質として発現される場合、該ポリペプチドのDNAに作動可能に連結している；プロモーター又はエンハンサーは、それがコーディング配列の転写に影響する場合、該コーディング配列に作動可能に連結している；又は、リボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するように配置されている場合、該コーディング配列に作動可能に連結している。一般に、「作動可能に連結している」とは、連結しているDNA配列が連続していること、分泌リーダーの場合には連続しかつリーディングフェーズ中にあることを意味する。しかし、エンハンサーは連続している必要はない。連結は、好都合な制限部位でのライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーを従来実務に従って使用する。

#### 【0033】

「単離(した)」分子は、それが見出される組成物中で、それが属する分子クラスに関して優勢な種である(すなわち、それが該組成物中で分子タイプの少なくとも約50%を構成し、代表的には該組成物中の分子種(例えばペプチド)の少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%又はそれ以上を構成する)分子である。通常、抗体分子の組成物は、該組成物中に存在する全てのペプチド種との関連では抗体分子に関して又は提案する使用との関連では少なくとも実質的に活性なペプチド種に関して、98%~99%の同質性を示す。

本発明に関して、「治療」又は「治療すること」とは、文脈と矛盾しない限り、疾患又は障害の1以上の症状又は臨床的に関連する症状発現を予防し、緩和させ、管理し(managing)、治癒させ又は減少させることをいう。例えば、疾患又は障害の1以上の症状も臨床的に関連する症状発現も同定されていない患者の「治療」は、予防治療である一方、疾患又は障害の1以上の症状又は臨床的に関連する症状発現が同定されている患者の「治療」は、一般的には、予防治療を構成しない。

用語 抗原は、免疫系の特異的認識成分(抗体、T細胞)によって認識される物質を指称する。

#### 【0034】

用語「免疫原」は、本発明に関しては、個体において該免疫原を標的する適応免疫応答を誘導し得る物質を指称するものとする。本発明との関連では、免疫原は、該免疫原と反応する抗体を誘導する。換言すれば、免疫原は、免疫を誘導し得る抗原である。

用語「エピトープ」、「抗原決定基」及び「抗原部位」は、本明細書中で互換可能に使用され、抗原又は免疫原中の、抗体によって認識される領域(抗体結合性エピトープの場合には、「B細胞エピトープ」として知られる)又はエピトープがMHC分子と複合体化している場合にはT細胞レセプターにより認識される領域(T細胞レセプター結合性エピトープの場合には、すなわち「T細胞エピトープ」)を指称する。

用語「免疫原の有効量」は、当該分野における通常の意味を有する。すなわち、免疫原と免疫学的特徴を共有する病原因子と顕著に戦う(engage)免疫応答を誘導し得る該免疫原の量を意味する。

用語「ワクチン」は、免疫原を含んでなり、病的状態の発症リスクを減少させ得るか又は病的状態の治癒(又は少なくともその症状の緩和)に役立つ治療的に有効な免疫応答を誘導し得る免疫応答を誘導することができる組成物に使用される。

#### 【0035】

用語「医薬的に許容される」は当該分野における通常の意味を有する。すなわち、この用語は、問題の疾患の治療時にヒトに使用される医薬の一部として受容され得る物質に使用される。よって、この用語は、事実上、治療対象者の状態を改善するというよりむしろ悪化させる高度に毒性の物質の使用を排除する。

「Tヘルパーリンパ球エピトープ」( $T_H$ エピトープ)は、MHCクラスII分子に結合し、該MHCクラスII分子に結合した抗原提示細胞(APC)の表面に提示され得るペプチドである。「免疫学的キャリア」は、一般には、1つ又は多くの $T_H$ エピトープを含み、それと組み合わせられる抗原に対する免疫応答を、Tヘルパーリンパ球を確実に活性化し増殖させることによって増大させる物質である。公知の免疫学的キャリアの例は、破傷風及びジフテリア毒素並びにキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)である。

用語「アジュバント」はワクチン技術の分野における通常の意味を有する。すなわち、1)それ自体はワクチンの免疫原に対する特異的免疫応答を開始させ得ないが、2)にもかかわらず、該免疫原に対する免疫応答を増強し得る物質又は組成物である。換言すれば、アジュバント単独でのワクチン接種は免疫原に対する免疫応答を提供せず、免疫原でのワクチン接種は、該免疫原に対する免疫応答を生じさせても生じさせなくてもよいが、免疫原とアジュバントとの組合せのワクチン接種は、免疫原単独で誘導されるものより強力な免疫原に対する免疫応答を誘導する。

#### 【0036】

発明の具体的実施形態

第1及び第4の観点

本発明の第1の観点は、ヒト免疫不全ウイルスI(HIV) gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を安定化させ得る薬剤の有効量を投与することを含んでなる、HIVに感染したヒトにおいてHIVの病理学的影響を減少及び/又は遅延させる方法に関する。第4の観点は非常に類似しているが、HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を安定化させ得る薬剤の有効量を投与することを含んでなる、後天性免疫不全症候群(AIDS)の発症リスクを

10

20

30

40

50

低減させる方法に関する。

これら観点は、主として、長期非進行性のHIV感染個体に特徴的な抗体を擬態することができる本発明による薬剤で、HIV感染個体を治療することを目的とする - これは、本発明の基礎をなす知見の最も直接的な治療的使用である。第1の観点は、HIVの病理学的影響を減少させるか又はAIDS症状が発現するまでの期間を延長させることを目的とし、第4の観点は、AIDSを発症するリスクを低減させることを目的とし、したがって抗レトロウイルス療法で現在予防治療がなされている個体において使用され得る。

【0037】

1つの実施形態において、本発明の第1の観点での薬剤は、gp41の膜貫通ドメインに由来するアミノ酸配列及びC2ドメインに由来するアミノ酸配列から独立して選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含んでなる分子である。ここで、該少なくとも1つのアミノ酸配列はC5ドメインと結合し、少なくとも1つのD-アミノ酸を含んでなる；1つの特定の実施形態では、アミノ酸配列中の全てのアミノ酸がD-アミノ酸である。分子は好ましくはペプチドであり、特定の実施形態において、このペプチドは少なくとも1つのアミノ酸配列からなる。アミノ酸配列は、代表的には、最大限9、最大限8、最大限7、最大限6及び最大限5アミノ酸残基のような最大限10アミノ酸残基を含む。したがって、好適な分子は、4、5、6、7、8、9又は10アミノ酸残基のペプチドである。したがって、少なくとも1つの分子の具体的実施形態は、配列番号34、35、36、37、39、40、42、43及び45(これらは全て、部分的に又は全体的にD-アミノ酸から構成され得る)を有するか又は含んでなるペプチドである。また、式IIIを有するペプチドを含んでなる分子は、少なくとも1つの分子の興味深い実施形態である。

【0038】

1つの実施形態において、本発明の第1の観点の薬剤は、抗体、抗体フラグメント又は抗体アナログから選択される。抗体は、完全ヒト抗体、ヒト化抗体若しくはキメラ抗体、又はそれらの誘導体であり得る。代表的には、抗体は、IgA、IgD、IgG、IgE又はIgMである - 抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両方であり得る。抗体フラグメントは、代表的には、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、Fab'-SHフラグメント、F(ab)2フラグメント、F(ab')2フラグメント、Fvフラグメント、重鎖Ig(ラム又はラクダIg)、V<sub>HH</sub>フラグメント、単ドメインFv及び一本鎖抗体フラグメントから選択され、抗体アナログは、代表的には、scFv、dsFv、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、カップボディ、IgNAR、tandAb、BiTE及び多特異性抗体から選択される。

本発明の第1の観点の1つの実施形態において、薬剤は、アミノ酸ストレッチTZ<sup>1</sup>AKRRV VZ<sup>2</sup>REKR(式中、Z<sup>1</sup>はK、R又はEであり、Z<sup>2</sup>はQ又はEである)中の1以上のアミノ酸残基とgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインのアミノ酸ストレッチ中の1以上のアミノ酸残基とに結合し、該アミノ酸残基間の結合を安定化する。C5からのこのアミノ酸ストレッチは、複数の既知のHIVクレード間で高度に保存されており、したがって該薬剤によるこのストレッチとの有効な相互作用は、高度に有利であると考えられる。

【0039】

第2及び第3の観点

本発明の第2の観点は、ヒト免疫不全ウイルスI (HIV) gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を安定化する抗体を誘導する免疫原の有効量を投与することを含んでなる、HIVに感染したヒトにおいてHIVのリスクを低減させる方法又はその病理学的影響を減少及び/又は遅延させる方法に関する一方、第3の観点は同じ手段を使用する予防的方法に関する。換言すれば、第2の観点は、AIDSを含むHIV疾患の治療的能動免疫療法に関する一方、第3の観点は予防免疫療法に関する。これはHIV感染の予防をも包含する。

これら特定の観点は、平均的なHIV感染個体において、HIV LTNP個体で見出されるものと同じタイプの抗体レパトアを誘導することが可能であるという理解に基づく。C5中とtm-gp41及び/又はC2中との両方でペプチド領域を注意深く選択し、これら領域から構成されるHIV中に存在する抗体結合性エピトープを擬態するペプチド組合せを製造することによ

って、所望の免疫を誘導するワクチンを製造することが可能になる - 興味深いことに、このアプローチは、古典的意味での中和抗体を取得するためのワクチン接種を目的としていない。

#### 【 0 0 4 0 】

1つの実施形態において、免疫原は、本発明の第5の観点で議論するとき下記で詳述するペプチド組合せ、第6の観点で下記に詳述する組成物、第7の観点に関連して議論する核酸フラグメント、第8の観点として議論するウイルス又はプラスミドベクター、又は第9の観点で議論するプラスミド若しくはウイルス組成物から選択される。

観点1～4に共通していることは、全てが、標的とされたC5ドメインとC2及び/又はgp41の膜貫通ドメインとの間の結合が、配列TZ<sup>1</sup>AKRRVVZ<sup>2</sup>REKR(式中、Z<sup>1</sup>はK、R又はEであり、Z<sup>2</sup>はQ又はEである)中の少なくとも1つのアミノ酸と、gp41の膜貫通ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸又はgp120の定常C2ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸とを含む実施形態を包含していることである。上記で説明したとおり、この特定の配列は、既知のHIVクレード間で非常に十分に保存されており、したがって最も実現可能性の高い標的は、この配列とtm-gp41又はC2との間の相互作用である。

#### 【 0 0 4 1 】

##### 第5の観点

第5の観点は、ペプチドの組合せに関し、該組合せは

- HIV gp120のC5ドメインの13アミノ酸残基アミノ酸配列(0～4のアミノ酸置換を含む)、そのサブ配列、又は前記アミノ酸配列若しくはサブ配列のインベルソ、レトロ若しくは又はレトロ-インベルソ形態を含んでなるアミノ酸配列を含んでなる第1のペプチド、及び

- gp41の膜貫通ドメイン若しくはgp120の定常C2ドメイン中に存在するアミノ酸ストレッチを含んでなるか又は配列番号6～13のいずれか1つに存在するアミノ酸ストレッチを含んでなるか又はgp41の膜貫通ドメイン若しくはgp120の定常C2ドメイン中に存在するアミノ酸ストレッチのインベルソ、レトロ若しくはレトロ-インベルソ形態を含んでなる少なくとも1つの第2のペプチド

を含んでなり、ここで、該ペプチド組合せは、HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインと結合し、前記ドメイン間の結合を安定化させることができる抗体を誘導し得、かつ該ペプチド組合せは、gp120中のC5のN末端でアミノ酸を欠いている。

換言すれば、第5の観点は、一方でC5中の相互作用領域を特徴付けるエピトープと、他方でtm-gp41及び/又はC2中の相互作用領域を特徴付けるエピトープとに三次元的に類似性を有するペプチド組合せに関する。これら本発明によるペプチド組合せは、HIV LTNP個体で見出される抗体と同じ特徴を有する抗体を誘導することができる有用な免疫原であるが、該ペプチド組合せはまた、診断/予後予測ツールとしても有望である。レトロ、インベルソ及びレトロ-インベルソペプチドを包含することで、とりわけ、タンパク質分解的に安定なペプチド及びHIV対応物に匹敵する真に外来であるペプチドの製造が可能になる。

#### 【 0 0 4 2 】

ペプチド組合せの1つの実施形態において、第1のペプチドは、式I：

$$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13} \quad (I)$$

(式中、X<sup>1</sup>はThrであり、X<sup>2</sup>はLys、Arg、Har及びGluから選択され、X<sup>3</sup>はAla及びValから選択され、X<sup>4</sup>はArg、Har、Lys及びCit(シトルリン)から選択され、X<sup>5</sup>はArg、Har、Lys及びCitから選択され、X<sup>6</sup>はArg、Har、Lys及びCitから選択され、X<sup>7</sup>はVal、Leu、Ile及びNle(ノルロイシン)から選択され、X<sup>8</sup>はVal、Leu、Ile及びNleから選択され、X<sup>9</sup>はGln、Glu、Asn及びAspから選択され、X<sup>10</sup>はArg、Har及びCitから選択され、X<sup>11</sup>はGlu及びAspから選択され、X<sup>12</sup>はLysであり、X<sup>13</sup>はArg、Har及びCitから選択される)

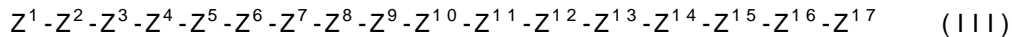
を有するアミノ酸配列を含んでなるか、又は式Iのアミノ酸配列のサブ配列を含んでなるか、又は前記アミノ酸配列若しくはサブ配列のインベルソ、レトロ若しくはレトロ-インベルソ形態を含んでなる。第1のペプチドは、式Iを有するアミノ酸配列のN末端に連結

したジペプチドAla-Proを更に含んでなり得、及び/又は第1のペプチドは、式Iを有するアミノ酸配列のC末端に連結したジペプチド $X^{14}$ - $X^{15}$ (式中、 $X^{14}$ はAla及びValから選択され、 $X^{15}$ はVal、Leu及びIleから選択される)を更に含んでなり得る。

C5に由来する特に興味深いペプチドは、実施例の序文に記載されており、本発明のペプチド組合せの第1のペプチドの実施形態を構成する。

【0043】

gp41及びgp120の天然に存在する変異体が幾つか観察されている。よって、第2のペプチドがgp41の膜貫通ドメイン中又はgp120の定常C2ドメイン中に存在するアミノ酸ストレッチを含んでなるという場合、これは、該アミノ酸ストレッチが、天然に存在する任意の形態で存在することをいうものとする。よって、少なくとも第2のペプチドは、gp41に由来するときには、特定の実施形態において、式：



(式中、 $Z^1$ はAspであり、 $Z^2$ はArgであり、 $Z^3$ はProであり、 $Z^4$ はGlu又はGlyであり、 $Z^5$ はGly又はArgであり、 $Z^6$ はIleであり、 $Z^7$ はGluであり、 $Z^8$ はGluであり、 $Z^9$ はGluであり、 $Z^{10}$ はGlyであり、 $Z^{11}$ はGlyであり、 $Z^{12}$ はGluであるか又は存在せず、 $Z^{13}$ はArg又はGlnであり、 $Z^{14}$ はAsp又はGlyであり、 $Z^{15}$ はArg又はLysであり、 $Z^{16}$ はAsp又はGlyであり、 $Z^{17}$ はArgである)

を有するアミノ酸配列を含むか、少なくとも5アミノ酸残基(例えば、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15及び少なくとも16アミノ酸残基)を有するサブ配列のような式(III)のサブ配列を含むものである。更に、第2のペプチドのこの実施形態は、gp41中に見出される対応するアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を生じるアミノ酸置換を含有し得る。

C20及びgp41に由来する特に興味深いペプチドは、実施例の序文に記載されており、本発明のペプチド組合せの第2のペプチドの実施形態を構成する。

【0044】

ペプチド組合せの特定の実施形態において、第1のペプチド及び少なくとも1つの第2のペプチドは、リンカーを介して結合している；リンカーは、グリシン、リジン又はアルギニンリンカー、ポリヒスチジニルタグ、プロテインG及びプロテインAのような任意のペプチドリンカーであることができるが、これはまた、ビス-マレイミドリンカー、ジスルフィドリンカー又はポリエチレングリコール(PEG)リンカーを使用することも可能である。実際、ペプチド化学で有用であることが判明している任意のリンカーもまた、本発明によるリンカーとして有用である。よって、本発明は、互い接合体化され又は融合された「単純な」リニアペプチドの使用を企図するが、C5及びgp120のその他の領域又はgp41に由来する個々のペプチドが、非ペプチドリンカー、例えば相補核酸、核酸誘導体又はアナログ(例えば、PNA、LNA)を介して連結しているペプチド組合せも企図する。マルチリンカータイプの使用も本発明の範囲内であり、例えば、鎖内ジスルフィドリンカーを含むリニアペプチドの使用もまた本発明の一部である。

本発明の特に興味深いペプチド組合せは実施例の序文に記載されている。

特定の実施形態において、ペプチド組合せ中の第1のペプチド及び少なくとも1つの第2のペプチドの少なくとも1つは、アミド化、アシル化又はアセチル化のようなN末端又はC末端改変を含んでなる。

【0045】

ペプチド組合せは、ワクチン剤又は診断剤として企図されるので、特定の実施形態では、免疫原性キャリアのようなキャリア分子とカップリングされる。よって、ペプチド組合せのペプチドは、その他の分子に、組換え融合体(例えば、CLIP技術を介して)として又は化学結合により配向様式(例えば、ヘテロ二官能性架橋剤を用いて)若しくは非配向様式で連結され得る。例えばジフテリア毒素、ラテックスビーズ(診断又は予後の実施形態で好都合)及び磁性ビーズ(これもまた、診断又は予後の実施形態で好都合)、ポリリジン構築物などのようなキャリア分子への連結は全て、本発明に従って可能である。

免疫原性キャリアは、好都合には、当該分野で従来使用されているもの(例えば、ジフテリア又は破傷風毒素、KLHなど)のようなキャリアタンパク質から選択されるが、集団のより大きな割合でT細胞免疫を誘導することができるより短いペプチド(Tヘルパーエпитープ)を使用することも可能である。このようなTヘルパーエпитープについての詳細は、例えば、WO 00/20027(参照により本明細書中に組み込まれる)に見出すことができる。そこで議論されている全ての免疫学的キャリア及び「無差別」(すなわち普遍的)Tヘルパーエпитープは、本発明における免疫原性キャリアとして有用である。

#### 【0046】

特定の実施形態において、キャリアは、ウイルス様粒子、すなわちビリオンの性質を有するが感染性のない粒子である。このようなウイルス様粒子は、化学的に(例えば、Jennings及びBachmann *Ann Rev Pharmacol. Toxicol.* 2009. 49:303-26 Immunodrug: Therapeutic VLP-based vaccines for chronic diseases)又は融合タンパク質を作製するクローニング技術を用いて提供され得る(例えば、Peabodyら, *J. Mol. Biol.* 2008; 380: 252-63. Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2)。その他の例は、Immune Response Corporationによって最初に作製され、放射線照射してウイルスゲノムを破壊したホルマリン不活化HIVからなるHIVワクチンたる「Remune」である。この会社は、同じ技術を使用して今日広く使用されている死滅ポリオワクチンを作製したJonas Salkによって設立された。しかし、HIVの固定に際して、ビリオン表面上でgp120が減少し、gp41のみが残る。このことが、本明細書に開示のC5由来ペプチドとRemune粒子との直接混合の可能性の扉を開く。なぜならば、C5とRemune粒子上のgp41との間の結合を得ることが依然として可能であるはずだからである。

#### 【0047】

第5の観点の実施形態はまた、第1のペプチドが、配列番号1、2、3、4及び5若しくはそれらのフラグメント、又は配列番号1、2、3、4及び5若しくはそれらのフラグメントから選択されるペプチドのインベルソ、レトロ又はレトロ-インベルソ形態からなる群より選択され、第2のペプチドが、配列番号6、7、8、9、10、11、12、13若しくは46又はそれらのフラグメント、或いは配列番号6、7、8、9、10、11、12、13若しくは46又はそれらのフラグメントから選択されるペプチドのインベルソ、レトロ又はレトロ-インベルソ形態からなる群より選択されるものを包含する。上記のように、この場合、ペプチド組合せがC5とgp41及び/又はC2との間の結合を安定化する抗体を誘導する能力を提供する限り、フラグメントは非常に短くてもよい。本発明の興味深いペプチド組合せの幾つかを実施例の序文に列挙する。

或る1つの実施形態において、本発明のペプチド組合せは、最大限69、最大限68、最大限67、最大限66、最大限65、最大限64、最大限63、最大限62、最大限61、最大限60、最大限59、最大限58、最大限57、最大限56、最大限55、最大限54、最大限53、最大限52、最大限51、最大限50、最大限49、最大限48、最大限47、最大限46、最大限45、最大限44、最大限43、最大限42、最大限41、最大限40、最大限39、最大限38、最大限37、最大限36、最大限35、最大限34、最大限33、最大限32、最大限31、最大限30、最大限29、最大限28、最大限27、最大限26、最大限25、最大限24、最大限23、最大限22、最大限21、最大限20、最大限19、最大限18、最大限17、最大限16、最大限15、最大限14、最大限13、最大限12、最大限11、最大限10、最大限9、最大限8及び最大限7アミノ酸のような最大限70アミノ酸を含んでなる。

#### 【0048】

或る1つの実施形態において、本発明のペプチド組合せは、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、少なくとも40、少なくとも41、少なくとも42、

少なくとも43、少なくとも44、少なくとも45、少なくとも46、少なくとも47、少なくとも48、少なくとも49、少なくとも50、少なくとも51、少なくとも52、少なくとも53、少なくとも54、少なくとも55、少なくとも56、少なくとも57、少なくとも58、少なくとも59、少なくとも60、少なくとも61、少なくとも62、少なくとも63、少なくとも64、少なくとも65、少なくとも66、少なくとも67、少なくとも68及び少なくとも69アミノ酸残基のような少なくとも6アミノ酸残基を含んでなる。

1つの実施形態において、本発明のペプチド組合せは、6アミノ酸残基又は7アミノ酸残基又は8アミノ酸残基又は9アミノ酸残基又は10アミノ酸残基又は11アミノ酸残基又は12アミノ酸残基又は13アミノ酸残基又は14アミノ酸残基又は15アミノ酸残基又は16アミノ酸残基又は17アミノ酸残基又は18アミノ酸残基又は19アミノ酸残基又は20アミノ酸残基又は21アミノ酸残基又は22アミノ酸残基又は23アミノ酸残基又は24アミノ酸残基又は25アミノ酸残基又は26アミノ酸残基又は27アミノ酸残基又は28アミノ酸残基又は29アミノ酸残基又は30アミノ酸残基又は31アミノ酸残基又は32アミノ酸残基又は33アミノ酸残基又は34アミノ酸残基又は35アミノ酸残基又は36アミノ酸残基又は37アミノ酸残基又は38アミノ酸残基又は39アミノ酸残基又は40アミノ酸残基又は41アミノ酸残基又は42アミノ酸残基又は43アミノ酸残基又は44アミノ酸残基又は45アミノ酸残基又は46アミノ酸残基又は47アミノ酸残基又は48アミノ酸残基又は49アミノ酸残基又は50アミノ酸残基又は51アミノ酸残基又は52アミノ酸残基又は53アミノ酸残基又は54アミノ酸残基又は55アミノ酸残基又は56アミノ酸残基又は57アミノ酸残基又は58アミノ酸残基又は59アミノ酸残基又は60アミノ酸残基又は61アミノ酸残基又は62アミノ酸残基又は63アミノ酸残基又は64アミノ酸残基又は65アミノ酸残基又は66アミノ酸残基又は67アミノ酸残基又は68アミノ酸残基又は69アミノ酸残基又は70アミノ酸残基からなる。

#### 【0049】

本発明の第6の観点

この観点は、第5の観点で記載したペプチド組合せを医薬的に許容される希釈剤又はビヒクル及び任意に免疫学的アジュバントと組み合わせて含んでなる免疫原性組成物(例えば、ワクチン組成物)に関する。

免疫原性組成物の製造には、免疫学的アジュバントのような従来技術の成分の使用が含まれる。下記で詳述するこれらアジュバントとは別に、免疫原性組成物は当該分野において一般に教示されているように製造する：

活性成分としてペプチド配列を含むワクチンの製造は、米国特許第4,608,251号；同第4,601,903号；同第4,599,231号；同第4,599,230号；同第4,596,792号；及び同第4,578,770号(参照により本明細書中に組み込まれる)に例示されているように、当該分野において広く十分に理解されている。代表的には、このようなワクチンは、液体溶液又は懸濁液としての注射可能剤として製造する；注射前の液体への溶解又は懸濁に適切な固体形態もまた製造し得る。調製物はまた乳化され得る。免疫原性活性成分は、しばしば、医薬的に許容されかつ該活性成分と相溶性である賦形剤と混合される。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど及びそれらの組合せである。加えて、所望であれば、ワクチンは、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝化剤又はワクチンの効力を増強するアジュバントのような少量の補助物質を含み得る；アジュバントについては下記で詳述する。

#### 【0050】

ワクチンは、従来のように、例えば皮下、皮内、真皮内、真皮下又は筋肉内に、注射により非経口投与する。その他の投与態様に適切な更なる製剤として、坐剤、幾つかの場合には、経口、バツカル、舌下、腹腔内、膈内、肛門、硬膜外、脊髄及び頭蓋内製剤が挙げられる。坐剤については、従来の結合剤及びキャリアとして、例えば、ポリアルキレングリコール又はトリグリセリドを挙げ得る；このような坐剤は、活性成分を0.5%~10%、好ましくは1~2%の範囲で含む混合物から形成し得る。経口製剤としては、例えば医薬グレードのマニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような通常使用される賦形剤が挙げ

られる。これら組成物は、溶液、懸濁物、タブレット、ピル、カプセル、持続放出製剤又は粉剤の形態をとり、10～95%、好ましくは25～70%の活性成分を含有する。

ペプチド及びペプチド組合せは、中性又は塩形態としてワクチンに製剤化され得る。医薬的に許容される塩としては、ペプチドの遊離アミノ基と、例えば塩酸、リン酸のような無機酸又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸と形成される酸付加塩などが挙げられる。遊離カルボキシル基と形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム又は水酸化第二鉄のような無機塩基及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインのような有機塩基などに由来し得る。

#### 【0051】

ワクチンは、剤形に適合する様式で、治療上有効であり免疫原性であるような量で投与する。投与すべき量は、治療すべき対象者(例えば、該個体の免疫系が免疫応答を開始する能力を含む)及び所望の免疫の程度に依存する。適切な投薬量の範囲は、ワクチン接種あたり活性成分数百マイクログラムのオーダーであり、好適な範囲は、約0.5 µg～1,000 µgの範囲、好ましくは1 µg～500 µgの範囲、特に約10 µg～100 µgの範囲のような約0.1 µg～2,000 µgである(ただし、1～10mgの範囲のより高い量も企図されている)。初回投与及びブースター注射の適切なレジメンも変化可能であるが、代表的には、初回投与及び後続の接種又はその他の投与である。

ペプチド及びペプチド組合せの幾つかは、ワクチン中で十分に免疫原性であるが、他の幾つかは、ワクチンが更にアジュバント物質を含んでなる場合に免疫原性が増強される。したがって、本明細書に記載の免疫原性分子は、アジュバントを用いて製剤化することができる：

#### 【0052】

組み合わせるべきアジュバントは、体液性応答を誘導することが知られており、次のものを包含する：i)塩懸濁物(例えば、アルミニウムイオン又はカルシウムイオンを含有する種々の塩)、ii)水中油エマルジョン(例えば、種々のスクアランベースの又はスクアレニベースのエマルジョン)、iii)油中水エマルジョン(例えば、Montanide ISA51又はISA720)、iv)中性リポソーム、v)カチオン性リポソーム、vi)ミクロスフェア、vii)免疫刺激性複合体(例えば、ISCOMs又はISCOMATRIX)、viii)パターン認識レセプターアゴニスト(例えば、C型レクチンレセプター(CLR)、NOD様レセプター(NLR)、RIG様ヘリカーゼ(RLH)、骨髄様細胞で発現するトリガリングレセプター(triggering receptor)(TREM)及びToll様レセプター(TLR)のアゴニスト)、ix)サポニン(すなわちシャボンノキ(*Quillaja saponaria*)又はキキョウ(*Platycodon grandiflorum*)に由来する任意のサポニン)、x)ピロゾーム/ウイルス様粒子(例えば)、xi)エンテロトキシン(すなわちコレラ毒、CTA1-DD又は大腸菌(*Escherichia coli*)易熱性エンテロトキシン)並びにそれらの組合せ。

#### 【0053】

よって、ワクチンについてアジュバント効果を達成する種々の方法は、公知である。一般的な原理及び方法は、「The Theory and Practical Application of Adjuvants」1995, Duncan E.S. Stewart-Tull(編), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6及び「Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants」1995, Gregoriadis Gら(編), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9(共に参照により本明細書中に組み込まれる)に詳述されているが、幾つかの後の刊行物もまたアジュバントを組み込む技術を扱っている：Roestenberg Mら, PLoS One. 2008;3(12):e3960. Epub 2008 Dec 18; Relyveld E及びChermann JC, Biomed Pharmacother. 1994;48(2):79-83; Hsu FJら, Blood. 1997 May 1;89(9):3129-35; Galli Gら, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 12;106(19):7962-7. Epub 2009 Apr 27; Bojang KAら, Lancet. 2001 Dec 8;358(9297):1927-34; Odunsi Kら, Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jul 31;104(31):12837-42. Epub 2007 Jul 25; Patel GB and Sprott GD; Crit Rev Biotechnol. 1999;19(4):317-57。概説; Agger EMら, PLoS One. 2008 Sep 8;3(9):e3116; Kirby DJら, J Drug Target. 2008 May;16(4):282-93; Florindo HFら, Vaccine. 2008 Aug 5;26(33):4168-77. Epub 2008 Jun 17; Sun HXら

10

20

30

40

50

, Vaccine. 2009 May 28 ; Guy B, Nat Rev Microbiol. 2007 Jul;5(7):505-17. 概説 ; Vandepapeliere Pら , Vaccine. 2008 Mar 4;26(10):1375-86. Epub 2008 Jan 14 ; Ghochiky an Aら , Vaccine. 2006 Mar 20;24(13):2275-82. Epub 2005 Dec 5 ; Xie Yら , Vaccine. 2008 Jun 25;26(27-28):3452-60. Epub 2008 May 1 ; Chung YCら , Vaccine. 2008 Mar 28 ;26(15):1855-62. Epub 2008 Feb 25 ; Maier Mら , Vaccine. 2005 Oct 25;23(44):5149-59 ; Sundling Cら , J Gen Virol. 2008 Dec;89(Pt 12):2954-64.

#### 【 0 0 5 4 】

##### 本発明の第 7 の観点

この観点は、本発明のペプチド組合せのサブセット(すなわち、原核又は真核細胞によって単一の発現産物又は 2 以上の発現産物(結合することができる)として発現され得るもの)をコードする核酸フラグメントに関する。よって、この観点によれば、ペプチド組合せをコードする核酸フラグメントが提供され、ここで、該ペプチド組合せは、

- 上記で詳述した第 1 のペプチド(但し、該第 1 のペプチド中のアミノ酸残基はAla、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp及びTyrからなる群より選択される L 型である)と、
- 上記で議論した少なくとも 1 つの第 2 のペプチド(但し、該第 2 のペプチド中のアミノ酸残基は L 型である)

を含んでなり、ここで、該ペプチド組合せは、HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインと結合し、前記ドメイン間の結合を安定化することができる抗体を誘導し得、該ペプチド組合せは、gp120中のC5の N 末端でアミノ酸を欠いている。

1 つの実施形態において、この核酸フラグメントは、コードされている第 1 のペプチドとコードされている少なくとも 1 つの第 2 のペプチドがペプチドリンカー及び/又はジスルフィドブリッジを介して結合しているものである。ペプチドリンカーは、代表的には、グリシンリンカー、リジンリンカー、グリシン-リジンリンカー及びArgリンカーからなる群より選択されるが、当該分野において公知の任意のペプチドリンカーが使用され得る。よって、用語 ペプチドリンカーはまた、ペプチド結合を介する第 1 のペプチドと第 2 のペプチドとの間のカップリングを指称するものとする。また、第 1 及び第 2 のペプチドは、鎖内ジスルフィド結合が達成されている場合のように、ペプチドリンカー及びジスルフィド結合を介して連結され得る。

#### 【 0 0 5 5 】

1 つの実施形態において、核酸フラグメントは、免疫原性キャリアのようなキャリア分子と(融合により)カップリングしているペプチド組合せをコードする；有用なキャリアは上記で議論した。

1 つの実施形態において、本発明の核酸フラグメントは、配列番号 1、2、3、4、5、28、30、38、41及び44若しくはそれらのフラグメントからなる群より選択されるペプチドをコードし、配列番号 6、7、8、9、10、11、12、13、29、31、33、37、39、40、42、43、45及び46若しくはそれらのフラグメントからなる群より選択される第 2 のペプチドをコードする。

1 つの実施形態において、核酸フラグメントは、最大限 70 アミノ酸を含んでなるペプチド組合せをコードする。1 つの実施形態において、核酸フラグメントは、少なくとも 6 アミノ酸残基を含んでなるペプチド組合せをコードする。更に別の実施形態において、本発明の核酸フラグメントは、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69及び70アミノ酸残基からなる群より選択される数のアミノ酸残基からなるペプチド組合せをコードする。

#### 【 0 0 5 6 】

##### 第 8 の観点

本発明はまた、本発明の第 7 の観点による核酸フラグメントを含んでなるベクターに関

する。本発明に関して、用語 ベクターは、遺伝情報を運搬し得、この遺伝情報を細胞中に送達することができる物質として理解される。代表的なベクターは、プラスミド、ウイルス、ファージ、コスミド及びミニ染色体からなる群より選択される。

ベクターは、クローニングベクター(すなわち、細胞中に遺伝情報を移入するために使用されるベクター(該細胞は増殖させられ、遺伝情報の存否について選択される))及び発現ベクター(すなわち、細胞においてベクターの遺伝情報の発現を可能にするに必要な遺伝子エレメントを含むベクター)の形態であることができる。よって、クローニングベクターは、代表的には、意図した細胞タイプに適合する選択マーカー及び複製起点を含む一方、発現ベクターは、意図した標的細胞で発現をもたらすに必要な調節エレメントを含む。

10

#### 【0057】

よって、本発明の核酸フラグメントは、通常、本発明の核酸フラグメントを有するクローニング又は発現ベクターを形成するために、適切なベクターに挿入される；このような新規なベクターもまた本発明の一部である。本発明のこれらベクターの構築に関する詳細は、形質転換した細胞及び微生物に関して、下記で議論する。ベクターは、適用の目的及びタイプに依存して、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ-染色体又はウイルスの形態であることができるが、或る種の細胞で一過性にのみ発現される裸のDNAもまた重要なベクターである。本発明の好適なクローニング及び発現ベクターは自律複製し得、このことにより、後のクローニングのための高レベル発現又は高レベル複製を目的とした高コピー数が可能になる。

20

概説すると、本発明の発現ベクターは、下記の特徴を5' 3'方向で作動可能な連結で含んでなる：本発明の核酸フラグメントの発現を駆動させるプロモーター、任意に、ペプチド発現産物の(細胞外相又は該当する場合には周縁質への)分泌又は膜への組込みを可能にするシグナルペプチドをコードする核酸配列、本発明の核酸フラグメント、及び任意に、ターミネーターをコードする核酸配列。産生体系又は細胞株で発現ベクターを作動させるときには、形質転換細胞の遺伝的安定性のために、ベクターは、宿主細胞中に導入されると該宿主細胞のゲノムに組み込まれることが好ましい。対照的に、動物でインビボ発現をもたらすために使用すべきベクターを扱うとき(すなわち、DNAワクチン接種にベクターを使用するとき)には、安全上の理由から、ベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得ないことが好ましい；代表的には、裸のDNA又は非組込みウイルスベクターが使用される(その選択は当業者に周知である)。

30

#### 【0058】

本発明の発現ベクターは、宿主細胞を形質転換させて本発明ペプチド組合せを製造するために使用する。このような形質転換細胞(これも本発明の一部である)は、本発明の核酸フラグメント及びベクターの増幅のために使用されるか又は本発明のペプチド組合せの組換え産生に使用される培養細胞又は細胞株であることができる。或いは、形質転換細胞は、ペプチド組合せの分泌又は細菌膜若しくは細胞壁中への組込みをもたらすように核酸フラグメント(単一コピー又は多コピー)が挿入されている適切な生ワクチン系統であることができる。

本発明の好適な形質転換細胞は、細菌(例えば、*Escherichia*種[例えば、*E.coli*]、*Bacillus*種[例えば、*Bacillus subtilis*]、*Salmonella*種又は*Mycobacterium*種[好ましくは非病原性、例えば*M. bovis* BCG])、酵母(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*)及び原生動物のような微生物である。或いは、形質転換細胞は、真菌、昆虫細胞、植物細胞又は哺乳動物細胞のような多細胞生物に由来する。ヒトに由来する細胞が最も好適である。下記の細胞株及びベクターの議論を参照。

40

クローニング及び/又は最適化された発現のためには、形質転換細胞は本発明の核酸フラグメントを複製し得ることが好ましい。本発明の実施形態で有用な核酸フラグメントを発現する細胞が好ましい；それらは、本発明のペプチド組合せの小規模又は大規模な製造に使用することができ、非病原性細菌の場合には、生ワクチン中のワクチン構成要素として使用することができる。

50

## 【 0 0 5 9 】

本発明のペプチド組合せを形質転換細胞により組換え産生するとき、発現産物は、培養培地中に輸出されるか又は形質転換細胞の表面に保有されることが好都合であるが、必須ではない。

効果的な産生体細胞が同定されている場合、それを基にして、本発明のベクターを保有し本発明の核酸フラグメントを発現する安定な細胞株を樹立することが好ましい。好ましくは、この安定細胞株はペプチド発現産物を分泌又は保有することによりその精製が容易になる。

一般には、宿主細胞と適合性である種に由来するレプリコン及び制御配列を含有するプラスミドベクターを宿主と組み合わせて使用する。ベクターは、通常、複製部位及び形質転換細胞中で表現型選択を提供し得るマーキング配列を保有する。例えば、*E. coli*は、代表的には、*E. coli*種に由来するプラスミドであるpBR322を用いて形質転換する(例えば、Bolivarら, 1977参照)。pBR322プラスミドは、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性遺伝子を含有し、よって形質転換細胞を同定する容易な手段を提供する。pBRプラスミド若しくはその他の微生物プラスミド又はファージはまた、発現用原核微生物が使用できるプロモーターを含有しているか又は含有するように改変されていなければならない。

## 【 0 0 6 0 】

組換えDNA構築に最も一般的に使用されるプロモーターとしては、 $\phi$ -ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)及びラクトースプロモーター系(Changら, 1978; Itakuraら, 1977; Goeddelら, 1979)及びトリプトファン(*trp*)プロモーター系(Goeddelら, 1979; EP-A-0 036 776)が挙げられる。これらが最も一般的に使用されるが、その他の微生物プロモーターが見出されており、利用されている。それらのヌクレオチド配列の詳細は公開されている。

原核生物に加えて、酵母培養物のような真核微生物も使用される、ここでも、プロモーターは発現を駆動し得るべきである。*Saccharomyces cerevisiae*又は一般的なパン酵母が、真核微生物の中で最も一般的に使用されるが、幾つかのその他の系統が広く入手可能である。*Saccharomyces*中の発現のためには、例えばプラスミドYRp7が広く使用される(Stinchcombら, 1979; Kingsmanら, 1979; Tschemperら, 1980)。

酵母ベクター中で適切なプロモーター配列としては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(Hitzmanら, 1980)又はその他の糖分解酵素(Hessら, 1968; Hollandら, 1978)、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼのプロモーターが挙げられる。適切な発現プラスミドの構築においては、これら遺伝子に結合した終止配列もまた、mRNAのポリアダニル化及び終止を提供するために、該発現ベクター中、発現を望まれる配列の3'に組み込まれる。

## 【 0 0 6 1 】

生育条件によって制御される転写という更なる利点を有するその他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素及び前記のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、並びにマルトース及びガラクトースの利用を担う酵素のプロモーター領域である。酵母適合性のプロモーター、複製起点及び終止配列を含有する任意のプラスミドベクターが適切である。

微生物に加えて、多細胞生物に由来する細胞の培養物もまた、宿主として使用し得る。原理上、脊椎動物の細胞培養物に由来するか又は無脊椎動物の細胞培養物に由来するかにかかわらず、このような任意の細胞培養物が機能する。このような有用な宿主細胞株の例は、VERO及びHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、W138、BHK、COS-7 293、*Spodoptera frugiperda*(SF)細胞、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)細胞株(例えば、Schneider 2(S<sub>2</sub>))及びMDCK細胞株である。

このような細胞用の発現ベクターは、通常、(必要であれば)複製起点、発現すべき遺伝子の前に位置するプロモーター(任意の必要なリボソーム結合部位と共に)、RNAプライ

10

20

30

40

50

ス部位、ポリアデニル化部位及び転写終止配列を含む。

【0062】

哺乳動物細胞での使用のためには、発現ベクターにおける制御機能は、しばしば、ウイルス材料により提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、そして最も頻繁にはシミアンウイルス40(SV40)に由来する。SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターが、共にSV40ウイルスの複製起点もまた含有するフラグメントとしてウイルスから容易に得られるので、特に有用である(Fiersら, 1978)。ウイルスの複製起点に位置するHindIII部位からBglI部位に向かって伸びる約250bp配列を含んでいれば、より小さい又はより大きいSV40フラグメントも使用し得る。更に、その制御配列が宿主細胞系と適合性であれば、所望の遺伝子配列と通常結合しているプロモーター又は制御配列を使用することも可能であり、望ましいことが多い。

10

複製起点は、SV40又はその他のウイルス(例えば、その他のポリオーマウイルス、アデノ、VSV、BPV)に由来し得るもののような外来性の起点を含むようにベクターを構築することによって提供されてもよいし、宿主細胞の染色体複製機序によって提供されてもよい。ベクターが宿主細胞の染色体に組み込まれる場合、後者で十分であることが多い。

【0063】

第9の観点

上記のように、本発明の核酸フラグメント又はベクターは、それ自体で免疫化剤(例えば、ワクチン剤)として適切であり得、すなわち本発明の核酸フラグメント又はベクターを医薬的に許容される希釈剤又はビヒクル及び任意に免疫学的アジュバントと組み合わせて含んでなる免疫原性組成物の形態で免疫化剤であり得る。

20

ペプチドベースワクチンの古典的投与の代替法として、核酸ワクチン接種(「核酸免疫化」、「遺伝免疫化」及び「遺伝子免疫化」としても知られる)の技術が多くの魅力的な特徴を提供する。

第一に、伝統的なワクチンアプローチとは対照的に、核酸ワクチン接種は、免疫原性剤の資源消費型の大規模産生(例えば、微生物の工業規模の発酵又は大規模ペプチド合成の形態)を必要としない。更に、免疫原について精製及びリフォールディングスキームを考える必要がない。そして最後に、核酸ワクチン接種は、導入した核酸の発現産物の製造をワクチン接種個体の生化学的装置に依存するので、発現産物の最適な翻訳後プロセッシングが生じると期待される。

30

【0064】

この実施形態において、導入する核酸は、好ましくは、裸のDNA、荷電又は非荷電脂質と製剤化されたDNA、リボソーム中に製剤化されたDNA、ウイルスベクター中に含まれるDNA、トランスフェクション促進タンパク質又はポリペプチドと製剤化されたDNA、標的化タンパク質又はポリペプチドと製剤化されたDNA、カルシウム沈降剤と製剤化されたDNA、不活性キャリア分子にカップリングされたDNA、ポリマー中、例えばPLGA(WO 98/31398に記載されたマイクロカプセル化技術を参照)又はキチン若しくはキトサン中にカプセル化されたDNA、及びアジュバントと製剤化されたDNAの形態であることができるDNAである。この点について、従来のワクチン製剤におけるアジュバントの使用に関する実質的に全ての考慮すべき事項が、DNAワクチンの製剤に適用される。よって、ポリペプチドベースワクチンに関するアジュバントの使用についての本明細書中の全ての開示が、核酸ワクチン接種技術におけるそれらの使用についても、必要な変更を行った上で当てはまる。

40

上記のポリペプチドベースワクチンの投与ルート及び投与スキームについて、これらは、本発明の核酸ワクチンにも適用可能であり、ポリペプチドの投与ルート及び投与スキームに関する上記の全ての議論が核酸にも必要な変更を行った上で当てはまる。加えて、核酸ワクチンはまた、静脈内及び動脈内に投与することができる。更に、核酸ワクチンがいわゆる遺伝子銃の使用により及び/又はエレクトロポレーションの使用により投与できることは当該分野において周知である。よって、これら及び等価な投与態様も本発明の一部と見なされる。

通常の下で、核酸フラグメントは、発現がウイルスプロモーターの制御下にあるべ

50

クターの形態で導入される。本発明によるベクターのより詳細な議論については、上記を参照。また、核酸ワクチンの製剤及び使用に関する詳細な開示が利用可能である。例えば、Donnelly JJら, 1997, Annu. Rev. Immunol. 15: 617-648、及びDonnelly JJら, 1997, Life Sciences 60: 163-172(これら参考文献は共に参照により本明細書中に組み込まれる)。

#### 【0065】

ペプチド免疫原又は核酸免疫原の使用の代替は、生免疫原技術の使用である。これは、本発明の核酸フラグメント又はベクターで形質転換された非病原性微生物の投与を含む。非病原性微生物は、任意の適切な減弱化細菌系統(継代により減弱化されたか、又は組換えDNA技術での病原性発現産物の除去による)、例えば、Mycobacterium bovis BCG、非病原性Streptococcus spp.、E. coli、Salmonella spp.、Vibrio cholerae、Shigellaなどであることができる。従来技術の生ワクチンの製造を扱っている概説は、例えば、Saliou P, 1995, Rev. Prat. 45: 14921496、及びWalker PD, 1992, Vaccine 10: 977990(共に、参照により本明細書中に組み込まれる)に見出すことができる。このような生ワクチンに使用される核酸フラグメント及びベクターについての詳細に関しては、下記の議論を参照。

細菌性生免疫原の代替物として、本発明の核酸フラグメントは、ワクシニア系統又は任意のその他の適切なポックスウイルスのような非毒性ウイルスのワクチンベクターに組み込むことができる。

通常、非病原性微生物又はウイルスは、対象者に1回のみ投与するが、特定の場合には、保護免疫を維持するために、微生物/ウイルスを生涯において1回より多く投与する必要がある。生又はウイルスワクチンを使用する場合、ポリペプチドワクチン接種について上記で詳述したような免疫化スキームが有用であることがなおも企図される。

或いは、生又はウイルス免疫化は、前の又は後のポリペプチド及び/又は核酸免疫化と組み合わせられる。例えば、生又はウイルスワクチンでの初回免疫に続いて、ポリペプチド又は核酸アプローチを用いる後続のブースター免疫化を行うことが可能である。

#### 【0066】

##### 第10の観点

この観点は、gp120のC5ドメイン中のアミノ酸とgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメイン中のアミノ酸とから構成されるエピトープに結合する抗体の存在を決定する方法であって、該抗体を含んでなる可能性のあるサンプルを本発明の少なくとも1つのペプチド組合せと接触させ、該サンプル中での該少なくとも1つのペプチド組合せと抗体との間の結合を定量的又は定性的に決定することを含んでなる方法に関する。この方法は、任意の好都合な形態を取ることができ、例えば、非競合的若しくは競合的ELISA、RIA又は磁性イムノアッセイ、凝集アッセイ及び表面プラズモン共鳴ベースのアッセイ(例えばBiacoreアッセイ)の形態であり得る。

この観点は診断上及び予後予測上の価値を有する：予後予測に関して、LTNP HIV感染個体をその他のHIV感染個体と識別することが可能になり、よってこれら個体の予後の知識及びこれら個体に提案すべき治療のタイプ(あれば)のガイド(すなわち診断ツール)を提供する。また、この方法により、本明細書中に教示した治療(特に、C5とtm-pg41及び/又はC2との間の複合体と反応性である抗体の産生を誘導する免疫原性剤を用いる免疫化に依拠する治療)の効力のモニタリングが可能になる。

#### 【0067】

本発明のこの観点に関連する第11の観点は、gp120のC5ドメイン中のアミノ酸とgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメイン中のアミノ酸とから構成されるエピトープに結合する抗体の存在を決定するキットであって、本発明の少なくとも1つのペプチド組合せと、液体サンプルを該ペプチド組合せと反応させる手段と、抗体と該ペプチド組合せとの間の陽性又は陰性結合反応の存在を決定する手段とを含んでなるキットに関する。

このキットの代表的フォーマットは、液体サンプルを単離及び/又は保存するための容器と、該ペプチド組合せをサンプルと接触させるための容器及び試薬と、該ペプチド組合

せと該サンプル中の構成成分との間の結合の存在を確認するための手段とを含む。このような抗体の存在を確認するために、キットは、例えば、標識二次抗ヒト抗体を使用し得る。ここで、標識は、蛍光若しくは放射性標識、酵素標識又は結合性標識(例えば、ストレプトアビジンとの結合用のビオチン標識)のような任意の適切な標識であり得る。キット中で、ペプチド組合せは固相支持体に結合していてもよく、或いは少なくとも、キットは、ペプチド組合せに結合するように構成された固相支持体を含んでいてもよい。

【 0 0 6 8 】

#### 第12の観点

この観点は、HIV gp120のC5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120の定常C2ドメインとの結合を安定化させ得る薬剤の同定及び/又は単離(すなわち、本明細書に教示の治療の幾つかにおいて有用な薬剤の同定及び/又は単離)に関し、該方法は、

- 前記結合を安定化させ得ることが以前に確かめられている参照薬剤を、C5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はC2ドメインとに対する安定結合から又はC5ドメインの代理物と前記膜貫通ドメイン及び/又はC2ドメインの代理物とに対する結合から追い出す能力について候補薬剤を試験し、前記参照薬剤を追い出し得る候補薬剤単離するか、又は、
- C5ドメインとgp41の膜貫通ドメイン及び/又はgp120のC2ドメインとの間の複合体の代理物と結合する能力について候補薬剤を試験し、該代理物への顕著な結合をもたらし得る薬剤を単離することを含んでなる

【 0 0 6 9 】

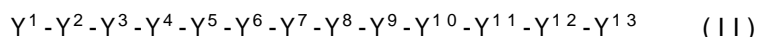
これら代替法の第1は、競合的ELISAに類似する方式(参照薬剤は抗体であってもなくてもよく、測定するシグナルは、結合からこの参照薬剤が追い出されることである)で実現し得る。用語「代理物」は、本発明に関しては、tm-gp41及び/又はC2に結合したC5と共通する少なくとも1つのエピトープを有する物質を指称する。このエピトープは、同じ結合親和性で、単離したC5にも、tm-gp41にもC2にも現れない。よって、代理物は、例えば、本発明のペプチド組合せであり得る。

上記第2の代替法と同様に、直接結合する候補薬剤の試験のための代理物の使用もまた可能である - この場合、代理物は、例えば抗体に対して、本明細書中に教示されたC5複合体と競合する能力について確証されているべきである。1つの可能なアッセイは、プラズモン表面共鳴ベースのアッセイ(これは、試験薬剤も参照薬剤も標識を必要としないという利点を有する)である。しかし、種々のクロマトグラフィー捕捉アッセイもまた使用し得る。その他のアッセイとしては、NMR及び円偏光二色性が挙げられる。これらの場合、分子のスクリーニングは、小分子と組み合わせたときC5とgp41/C2を分離するに必要な温度のシフトの実証に基づく。なぜなら、この分離が両方法で検出可能であるからである。

【 0 0 7 0 】

#### 第13の観点

この観点は、式II:



(式中、 $Y^1$ はTであり、 $Y^2$ はLys、Arg、Har及びGluから選択され、 $Y^3$ はAla及びValから選択され、 $Y^4$ はArg、Har、Lys及びCit(シトルリン)から選択され、 $Y^5$ はArg、Har、Lys及びCitから選択され、 $Y^6$ はArg、Har、Lys及びCitから選択され、 $Y^7$ はVal、Leu、Ile及びNle(ノルロイシン)から選択され、 $Y^8$ はVal、Leu、Ile及びNleから選択され、 $Y^9$ はGln、Glu、Asn及びAspから選択され、 $Y^{10}$ はArg、Har及びCitから選択され、 $Y^{11}$ はGlu及びAspから選択され、 $Y^{12}$ はLysであり、 $Y^{13}$ はArg、Har及びCitから選択され、ここで、

$Y^3$ はValであり、及び/又は

$Y^4$ はArg、Har及びCitから選択され、及び/又は

$Y^5$ はLys及びCitから選択され、及び/又は

$Y^6$ はLys及びCitから選択され、及び/又は

$Y^7$ はLeu、Ile及びNleから選択され、及び/又は

$Y^8$ はLeu、Ile及びNleから選択され、及び/又は

$Y^9$ はGlu、Asn及びAspから選択され、及び/又は

10

20

30

40

50

Y<sup>10</sup>はCitであり又はY<sup>11</sup>はAspであり又はY<sup>13</sup>はCitである)

を有するアミノ酸配列を含んでなるか、又は式IIのアミノ酸配列の少なくとも6アミノ酸残基のサブ配列を含んでなるか、又は前記アミノ酸配列若しくはサブ配列のインベルソ、レトロ若しくはレトロ-インベルソ形態を含んでなる、gp120のC5ドメインの新規アナログに関する。

#### 【0071】

これらアナログは、上記のペプチド組合せと同様に有用であると企図される。なぜなら、これらアナログが、C5に対する抗体を誘導し得、したがって、医薬的及び診断的の両方の用途のための組成物において有用であるからである。したがって、本発明のペプチド組合せの使用及び製剤に関する上記の開示の全てが、必要な変更を加えた上で、本発明のアナログに当てはまる。

10

本発明のペプチド組合せとは対照的に、誘導される抗体は、gp41又はC2からのC5の解離に関連する両領域を標的することができるが、C5の、免疫活性化を直接担う他の領域をも標的することができる。

天然型C5配列と比較して、式IIは、幾つかの実施形態において、最大限4、最大限3及び最大限2アミノ酸の置換のような最大限5アミノ酸の置換を有する。他の実施形態において、配列は、任意の天然型C5配列と比較して、正確に5又は正確に4又は正確に3又は正確に2又は正確に1のアミノ酸置換を含む。

#### 【0072】

組合せ治療

20

本明細書に開示したAIDSの治療又は予防法は、HIV陽性個体に使用される現時点で既知の治療スキームのいずれとも組み合わせ得る。特に、この方法は、抗レトロウイルス治療又はケモカイン療法と組み合わせてもよいし、これらに先行しても後続してもよい。本願方法は、感染の高リスクにある個体に対して事前曝露予防(pre-exposure prophylaxis; PREP)に置換又は寄与し得る。或いは、本方法は、事後曝露予防として抗レトロウイルス療法と組み合わせで適用し得る。本願方法はまた、Remune、シクロオキシゲナーゼインヒビター及びボマリドマイド(pomalidomide)並びにその他のアジュバントと組み合わせで使用し得る。

#### 【実施例】

#### 【0073】

30

実施例の序文

配列の概要及び略語：

C5配列：

APTKAKRRVVQREKRAV (配列番号1)

APTKAKRRVVEREKRAV (配列番号2)

APTRAKRRVVQREKRAV (配列番号3)

APTRAKRRVVEREKRAV (配列番号4)

APTEAKRRVVEREKRAV (配列番号5)

WWGCAKRRVCGGAKRRVVQREKRA (配列番号44)

40

(配列番号44中の下線を付したアミノ酸残基は、ジスルフィドリンカーを介して連結している；N末端のWは、好ましくはD-アミノ酸であり、C末端のAはアミド化されていてもよい；これら2つの改変を有するペプチドをBI450-AdjBT\_1と名付けた)。

#### 【0074】

C5複合体を形成する配列：

DRPEGIEEEGERDR (アミノ酸4はGであり得、及び/又はアミノ酸5はRであり得、及び/又はアミノ酸13はQであり得、及び/又はアミノ酸14はGであり得、及び/又はアミノ酸15はKであり得る；配列番号6)；

DRPEGIENNGGERDR (配列番号7；アミノ酸4はGであり得、及び/又はアミノ酸5はRであり得、及び/又はアミノ酸13はQであり得、及び/又はアミノ酸14はGであり得、及び/又

50

はアミノ酸15はKであり得る) ;

DRPEGIENNGGERDRDR (アミノ酸4はGであり得、及び/又はアミノ酸5はRであり得、及び/又はアミノ酸13はQであり得、及び/又はアミノ酸14はGであり得、及び/又はアミノ酸15はKであり得、及び/又はアミノ酸16はGであり得る ; 配列番号46) .

VERYLKDQQLLG (配列番号8) ;

VERYLKDEELLG (配列番号9) ;

VERYLKDNLLG (配列番号10) ;

QLLLNGSLAEEEEIVI (配列番号11、未合成)

QLLLNGSLAEEEVVIV (配列番号12、未合成)

QLLLNSLAEEEVVI (配列番号13、未合成)

GGAIVNGSLADDDIVI (配列番号37、本明細書中で204dとも名付ける)

WWGCIEEEGCGGIEEEGERDR (配列番号45 : 下線を付したアミノ酸残基は、ジスルフィドリンカーを介して連結している ; N末端のWは、好ましくはD-アミノ酸であり、C末端のRはアミド化されていてもよい ; これら2つの改変を有するペプチドをBI450-AdjBT\_2と名付けた)。

【0075】

ポリペプチドI :

$(Z-SEQ_{c5}-Z-SEQ_{c5})_n$

$n = 1、2、3、4$

ポリペプチドII :

$(Z-SEQ_{cx}-Z-SEQ_{cx})_n$

$n = 1、2、3、4$

ペプチド複合体 :

$(Z-SEQ_{c5}-Z-SEQ_{c5})_n$

|

ビス-マレイミドリンカー

|

$(Z-SEQ_{cx}-Z-SEQ_{cx})_n$

$n = 1、2、3、4$

$(Z-SEQ_{c5}-Z-SEQ_{c5})_n$

|

$(Z-SEQ_{cx}-Z-SEQ_{cx})_n$

$n = 1、2、3、4$

【0076】

ポリペプチドIの例は、下記配列であり得るがこれらに限定されない :

APTKAKRGGGAPTRAKRGGGAPTEAKR (配列番号14)

RVVEREKGGGAKRRVVGGRVVQREK (配列番号15)

GGAKRRVVGAKRRVVGQREKRAV (配列番号16)

CGGAKRRVVGAKRRVVGQREKRAV (配列番号17)

GGAKRRVVGAKRRVVGQREKR (配列番号18)

CGGAKRRVVGAKRRVVGQREKR (配列番号19)

GGAKRRVVGAKRRVV (配列番号20)

GCGAKRRVVGAKRRVV (配列番号21)

ポリペプチドIIの例は、下記配列であり得るがこれらに限定されない :

GGGDQQLLGAAEEIVGGIEEEGERDRDR (配列番号22)

CGGDQQLLGAAEEIVGGIEEEGERDRDR (配列番号23)

GGDQQLLGGAEEEEIVGGGERDR (配列番号24)  
 CGGDDQQLLGGAEEEEIVGGIEEEGG (配列番号25)  
 GGAEEEVVGGDQQLL (配列番号26)  
 CGGAEEEVVGGDQQLL (配列番号27)

ジスルフィド連結構築物の例は、下記の連結ペプチド配列であり得るがこれらに限定されない：

CGGAKRRVVGGAKRRVVGQREKRAV (配列番号28)  
 |  
 CGGDDQQLLGGAEEEEIVGGIEEEGGGERDRDR (配列番号29)

10

CGGAKRRVVGGAKRRVVGQREKR (配列番号30)  
 |  
 CGGDDQQLLGGAEEEEIVGGIEEEGG (配列番号31)

CGGAEEEVVGGDQQLL (配列番号32)  
 |  
 GCGGAKRRVVGGAKRRVV (配列番号33)

【0077】

上記ジスルフィド連結構築物は、例えば、2-ピリジンスルフェニル(SPy<sub>r</sub>)保護システイン含有ペプチドをチオール非保護ペプチドで滴定することによって合成し得る。これは、ホモダイマーの形成を防止してジスルフィド連結ペプチドヘテロダイマーを選択的に作製する優れた手順であることが証明されている(Schutz Aら, Tetrahedron, Volume 56, Issue 24, 9 June 2000, Pages 3889-3891)。配列番号28が配列番号31若しくは33にジスルフィド連結したか又は配列番号30が配列番号29若しくは33にジスルフィド連結したか又は配列番号32が配列番号29若しくは31にジスルフィド連結している類似構築物もまた、本発明の範囲内である。

20

【0078】

他の連結構築物の例は、下記の連結ペプチド配列であり得るがこれらに限定されない：

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (配列番号38)  
 |  
 GKGGIEEEGGRRDRDRGGEQDRDR (配列番号39)

30

(このペプチドは下線を付したCys及びLys残基を介して連結している；この全体構築物を本明細書中でBI400-Bと名付ける)。

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (配列番号38)  
 |  
 GKGGIEEEGGRRDRDRGGQDRDR (配列番号40)

(このペプチドは下線を付したCys及びLys残基を介して連結している；この全体構築物を本明細書中でBI400-Bu1と名付ける)。

40

GAKRRVVGGCGGAKRRVVEREKRAGQREKRA (配列番号41)  
 |  
 GKGGIEEEGGQDRDRGGRRDRDR (配列番号42)

(このペプチドは下線を付したCys及びLys残基を介して連結している；この全体構築物を本明細書中でBI400-Bu2と名付ける)。

GAKRRVVGGCGGAKRRVVEREKRAGQREKRA (配列番号41)  
 |  
 GKGGIEEEGGEQDRDRGGGERDRD (配列番号43)

50

(このペプチドは下線を付したCys及びLys残基を介して連結している；この全体構築物を本明細書中でBI400-Bu3と名付ける)。

【 0 0 7 9 】

一般に、Cys-Lysリンカーの正確な性質は、リンカーが連結構築物に望まない機能性を導入しない限り、必須ではない。Cys-Lysリンカーは、幾つかの広く公知の方法によって形成され得る。連結すべき2つのペプチドは、従来のメリフィールド固相ペプチド合成技術に従って合成する。システインの代わりに、適切なリンカーをリニア合成の一部として形成する一例として、対応するハロゲン化スルホニルを製造する。これは、次に、リジン側鎖上の一級アミンとの置換反応に参加することができる；これは、システイン残基とリジン残基との間のスルホンアミドブリッジを形成する。その他の反応は、前記2つの残基中のチオール及びアミノ基の一方又は両方の誘導体化、及び後続の2分子間の置換/排除反応を含む。

10

実施例のCys-Lys連結構築物で使用したリンカーは、一方のペプチド中の(2-オキソ-エチル)誘導体化システインと他方のペプチド中のリジンとの間のアミド結合の形態である。これらCys-Lys連結ペプチドは全て、Bachem UK Ltd.から商業ベースで得た。

配列番号38が配列番号42若しくは43にCys-Lys連結したか又は配列番号41が配列番号39若しくは40にCys-Lys連結している類似構築物もまた、本発明の範囲内である。

小分子インヒビター：

DQQLL (配列番号34)

20

AKRRVV (配列番号35)

AEEVV (配列番号36)

配列番号34～36は、好ましくは、部分的に又は完全にD-アミノ酸から構成される。

【 0 0 8 0 】

実施例 1

直鎖配列用の従来技術を使用するペプチド合成

APTKAKRRVVQREKRの製造

このペプチドは、F-moc合成の一般的説明(Athertonら, 1978 J. Chem. Soc. Chem Commun 539；これを下記では「合成の一般的説明」と呼ぶ)に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した。

30

純度(HPLC)：90%以上

質量スペクトル分析：理論的分子量：1822.2

実験的分子量：1823.0 ES+

APTKAKRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した。

純度(HPLC)：90%以上

質量スペクトル分析：理論的分子量：769.6

実験的分子量：760.7 ES+

40

APTRAKRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した。

純度(HPLC)：90%以上

質量スペクトル分析：理論的分子量：797.6

実験的分子量：797.6 ES+

APTEAKRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

50

- 。純度(HPLC)：90%以上  
質量スペクトル分析：理論的分子量：770.9  
実験的分子量：770.9 ES+

## RVVEREKの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

- 。純度(HPLC)：90%以上  
質量スペクトル分析：理論的分子量：914.1  
実験的分子量：913.9 ES+

10

## 【0081】

## RVVQREKの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

- 。純度(HPLC)：90%以上  
質量スペクトル分析：理論的分子量：913.1  
実験的分子量：913.0 ES+

## AKRRVVの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

- 。純度(HPLC)：90%以上  
質量スペクトル分析：理論的分子量：726.9  
実験的分子量：726.9 ES+

20

## DRPEGIEEEGERDRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

- 。純度(HPLC)：90%以上  
質量スペクトル分析：理論的分子量：1742.1  
実験的分子量：1742.8

30

## VERYLKDQQLLGの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

- 。純度(HPLC)：90%以上  
質量スペクトル分析：理論的分子量：1460.7  
実験的分子量：1460.1

40

## VERYLKDEELLGの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

- 。純度(HPLC)：90%以上  
質量スペクトル分析：理論的分子量：1462.6  
実験的分子量：1463.0

## 【0082】

## VERYLKDNLLGの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

- 。50

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 1432.6

#### QLLLNGSLAEEEEIVIの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 1639.9

#### QLLLNGSLAEEEVVIの製造

10

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 1625.9

#### QLLLNSLAEEEVVIの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 1568.8

20

#### APTKAKRGGGAPTRAKRGGGAPTEAKRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 2647.0

実験的分子量 : 2646.3 ES+

#### 【 0 0 8 3 】

#### RVVEREKGGGAKRRVVGGRVVQREKの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

30

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 2862.3

実験的分子量 : 2863.3 ES+

#### GGAKRRVVGAKRRVVGQREKRAV の製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 2590.1

40

#### CGGAKRRVVGAKRRVVGQREKRAVの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 2693.2

#### GGAKRRVVGAKRRVVGQREKRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

50

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 2476.9

#### CGGAKRRVVGAKRRVVGQREKRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 2580.0

【 0 0 8 4 】

#### GGAKRRVVGAKRRVVの製造

10

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 1665.0

#### GCGAKRRVVGAKRRVVの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 1768.1

20

#### GGGDQQLLGAAEEIVGGIEEEGERDRDRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 3127.2

#### CGGGDQQLLGAAEEIVGGIEEEGERDRDRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 3230.4

30

#### GGDQQLLGAAEEIVGGGERDRの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 2242.4

【 0 0 8 5 】

#### CGGGDQQLLGAAEEIVGGIEEEGGの製造

40

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 2402.5

#### GGAAEEVVGGDQQLLの製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した

。

純度 (HPLC) : 90 % 以上

質量スペクトル分析 : 理論的分子量 : 1499.6

50

## CGGAEEEVVGGDQQLL の製造

このペプチドは、合成の一般的説明に従い、対応する出発点からアミド形態で合成した。

純度(HPLC)：90%以上

質量スペクトル分析：理論的分子量：1602.7

【0086】

## 実施例2：

## 複合体化ペプチドの合成

10

CGGAKRRVVGGAKRRVVGQREKRAV

|

CGGGDQQLLGGAEEIVGGIEEEGGERDRD

## の製造

純度(HPLC)：90%以上

理論的分子量：5750.4

CGGAKRRVVGGAKRRVVGQREKR

|

CGGGDQQLLGGAEEIVGGIEEEGG

20

## の製造

純度(HPLC)：90%以上

理論的分子量：4965.6

CGGAEEEVVGGDQQLL

|

GCGGAKRRVVGGAKRRVV

## の製造

純度(HPLC)：90%以上

理論的分子量：3410.9

30

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (配列番号38)

|

GKGGIEEEGGRDRDRGGEQDRDR (配列番号39)

## の製造

純度(HPLC)：94%以上

理論的分子量：5876.93

【0087】

## 実施例3

HIV慢性感染個体、LTNP及び非感染血液ドナーからのプールしたヒト血清による配列番号

40

1単独並びに配列番号6、8及び9と組み合わせた配列番号1の認識

配列番号1単独又は配列番号6(配列DRPEGIEEEGGERDR)、8及び9と組み合わせた配列番号1に対する血清反応性は、固相支持体として磁性粒子を用いるか又は96ウェルトレイへのペプチドの付着を用いる一般的なELISA原理に従って決定した。

## 方法：

下記の系において、ペプチドは、広く認められている技法に従って、磁性粒子上にコートした。600 µgを使用した配列番号1を除いて、全てのペプチドについて300 µgを粒子にコートした。(C5由来の)配列番号1と(gp41由来の)配列番号6、8及び9とを、C5配列とgp41配列のそれぞれ及び全ての組合せとの間で相互作用が可能となるように、一晚4

50

てブレインキュベートした。次いで、確立されたプロトコルに従って、血清をペプチドコートしたビーズとインキュベートした。C5ペプチドへの抗体結合の視覚化は、異なる種からの免疫グロブリンに結合することができる、アルカリホスファターゼカップリングしたプロテイン G を使用して達成した。陽性コントロールは、C5由来配列 APTKAKRRVVQREKR (配列番号 1) で免疫したヒツジからの市販血清であった。

25人のLTNPからのプールした血清を、配列番号 1 単独と配列番号 6 (DRPEGIEEEGGERDR)、8 及び 9 のそれぞれ及び全てとの組み合わせた配列番号 1 とに対する血清反応性について試験した。12人のHIV陽性慢性感染個体からのプールした血清及び血液ドナーからの20血清もまた試験した。結果を表 A に示す：

【 0 0 8 8 】

10

【表 2】

表 A : プールした血清の、配列番号 1 及び gp41 の配列と組み合わせた配列番号 1 に対する血清反応性の結果  
陽性反応は目視で決定する。

ペプチド	血液ドナー プール	HIV慢性感染 プール	LTNP- プール	陽性 コントロール
APTKAKRRVVQREKR (= 配列番号 1 ) (600µg/ml)	+	2+	4+	>4+
ペプチド	血液ドナー プール	HIV慢性感染 プール	LTNP- プール	陽性 コントロール
APTKAKRRVVQREKE (配列番号 1) 300µg /ml + DRPEGIEEEGGERDR (配列番号 6) 300 µg /ml +VERYLKDQQLLG (配列番号 8) 300 µg /ml + VERYLKDEELLG (配列番号 9) 300µg/ml	(-)	Neg	3+	4+
APTKAKRRVVQREKE (配列番号 1) 300 µg /ml + DRPEGIEEEGGERDR (配列番号 6) 300 µg /ml	+	+	2+	4+
APTKAKRRVVQREKE (配列番号 1) 300 µg /ml + VERYLKDQQLLG (配列番号 8) 300 µg /ml	(-)	Neg	2+	4+
APTKAKRRVVQREKE (配列番号 1) 300 µg /ml + VERYLKDEELLG (配列番号 9) 300 µg /ml	+	Neg	+	4+

20

30

結果/考察のポイント：表 A の結果は、プールした LTNP 血清が概して、HIV 慢性感染患者からのプールした血清と比較して、HIV-1 からの配列番号 1 に対して強力な反応性を提供することを示す - このことは以前に報告されている。しかし、配列番号 1 と gp41 に由来する他のペプチド (例えば、全てを組み合わせたもの又は配列番号 8 単独) との組合せが、血液ドナーで観察されるバックグラウンドレベル及び慢性感染個体からのプールした血清における応答を減少させた。LTNP における応答は強力なままである。

40

【 0 0 8 9 】

#### 実施例 4

HIV 慢性感染個体、LTNP 及び血液ドナーからの個々のヒト血清による配列番号 1 及び配列番号 6 と組み合わせた配列番号 1 の認識

個々の LTNP 患者血清の配列番号 1 (16 µg) 単独及び配列番号 6 (16 µg) と組み合わせた配列番号 1 の血清反応性は、固相支持体として ELISA プレートを用いて決定した。陽性コン

50

トロールとしてヒツジ抗C5抗体を使用した。酵素反応後、アルカリホスファターゼカップリングしたプロテイン G からの280nmでの光学密度(OD)を読取値として使用した。図 1 は、LTNP患者の比率及びバックグランド(ペプチドのない培地単独)を減算したOD値を示す。

図 1 は、LTNP血清のより大きな割合が、配列番号 1 単独に対する反応性 ( $n = 6$ 、最も左の斜線を付したバー、 $< 0\%$  比)より、配列番号 6 (DRPEGIEEEGGERDR)と組み合わせたときの配列番号 1 に対する反応性 ( $n = 8$ 、最も右の 2 つ、灰色のバー；すなわち $>80\%$ の比)を有することを示す。配列番号 1 に対して低い応答しか示さなかったLTNP血清について、この効果は、配列番号 1 及び 6 を組み合わせたとき増大した。このことは、C5:gp41複合体が、C5単独からの応答が低いときでさえ、捕捉して劇的に応答を増大させる能力を有することを証明する；図 1 は、配列番号 1 に対する結合のみを示した血清サンプルにおいてODが高かったことを示す。しかし、gp41配列と組み合わせると、C5単独に対する応答は減少した。なぜならば、抗体が組合せを好んで結合したからである。

#### 【 0 0 9 0 】

図 2 は、LTNP、慢性感染患者及び血液ドナーからの個々の血清における配列番号 1 単独及び配列番号 6 (DRPEGIEEEGGERDR)と組み合わせた配列番号 1 に対する応答の大きさを示す。配列番号 1 単独及び配列番号 6 (DRPEGIEEEGGERDR)と組み合わせた配列番号 1 に対して、LTNP患者で、HIV慢性感染患者より大きな応答が存在した。LTNP及びHIV慢性感染患者の両方について、配列番号 6 との組合せでの配列番号 1 に対する結合についてのメジアンOD値が、配列番号 1 単独に対する結合についてのメジアンOD値より高い。このことは、配列番号 6 との組合せが血清反応性を改善したことを示す。血液ドナーにおける応答は、一貫して低く、この陰性コントロールでは、非常に狭い四分位範囲が存在し、C5単独又は配列番号 6 (DRPEGIEEEGGERDR)との組合せに対する血清反応性に差はない。

LTNP血清について配列番号 1 及び 6 の組合せから得られたOD値及びHIV血清について配列番号 1 及び 6 の組合せから得られたOD値で実施したWilcoxonランク検定により、真のメジアンが25%の信頼区間で異なることが示される。

#### 【 0 0 9 1 】

##### 実施例 5

##### 免疫学的研究

##### ウサギの免疫化

雌性のニュージーランドシロウサギ ( $n = 3$ ) を、0、2 及び 6 週目に、50% V/Vフロイントアジュバント(すなわち初回免疫には完全フロイントアジュバントを使用し、続いてブースター免疫には不完全フロイントアジュバントを使用した)中500  $\mu$ gのBI400-Bからなる 1 mlのBI400-Bワクチンで真皮内免疫した。ELISA用に個々の血清を単離した。

##### ヒト血清についての直接ELISA

50 ~ 100  $\mu$ lのBI400-015と201との混合物(コーティングの前に、コーティング緩衝液 - 0.05M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH9.6；CBと呼ぶ - 中で、冷温にて各ペプチドについて16  $\mu$ g/mlで1 ~ 3日間プレインキュベートした)又はCBのみ(バックグランドコントロール)を、マイクロタイタープレート中のウェルの 4 にて一晩のコーティングに使用した。次いで、マイクロタイタープレートを洗浄緩衝液(PBS + 1% v/v Triton-X100；WBと呼ぶ)で3回洗浄し、続いて200  $\mu$ l/ウェルのブロッキング緩衝液(PBS + 1% w/v BSA)で室温(RT)にて2時間ブロッキングを行った。次いで、プレートをWBで3回洗浄し、続いて50 ~ 70  $\mu$ l/ウェルの添加したヒト(希釈緩衝液(PBS + 1% v/v Triton-X100 + 1% w/v BSA；DBと呼ぶ)中1:1 ~ 1:250の範囲の系列希釈物)との37 にて1時間のインキュベーションを行った。

次いで、プレートをWBで6回洗浄し、続いて70  $\mu$ l/ウェルのアルカリホスファターゼ接合プロテイン G (DB中3  $\mu$ g/ml；Calbiochem 539305)とのRTにて1時間のインキュベーションを行った。次いで、プレートをWBで6回洗浄し、続いて100  $\mu$ l/ウェルの0.3% w/vのフェノールフタレインモノホスフェート(Sigma P-5758)との室温にて10 ~ 60分間のインキュベーションを行った。最後に、100  $\mu$ l/ウェルのクエンチ溶液(0.1M TRIS + 0.1M EDTA + 0.5M NaOH + 0.01% w/v  $\text{NaN}_3$ ；pH14)を添加してプレートを終了させ、続いてELISAリー

ダー (ASYS UVM 340) で550nmにて読み取った。

【 0 0 9 2 】

BI400-Bでの免疫化後のウサギ血清についての競合ELISA

50 ~ 100  $\mu$ l のBI400-015と201との混合物(コーティングの前に、コーティング緩衝液 - 0.05M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH9.6 ; CBと呼ぶ - 中で、冷温にて各ペプチドについて16  $\mu$ g/mlで1 ~ 3日間ブレインキュベートした)又はCBのみ(バックグランドコントロール)を、マイクロタイタープレート中のウェルの4 にて一晚のコーティングに使用した。次いで、プレートを洗浄緩衝液(PBS + 1 % v/v Triton-X100 ; WBと呼ぶ)で3回洗浄し、続いて200  $\mu$ l /ウェルのブロッキング緩衝液(PBS + 1 % w/v BSA)で室温(RT)にて2時間ブロッキングを行った。次いで、プレートをWBで3回洗浄し、続いて400-SEQ-B、BI400-015、BI400-201、BI400-204d、組換えgp41(Shin-Won Scientific, SWO 102 gp41)、BI301-23(無関係なタンパク質 ; コントロール)の系列希釈物(10 ~ 1000  $\mu$ Mの範囲の最終濃度)、ペプチドなし(すなわちPBS ; コントロール)、LTNP血清プール(1 : 10最終濃度に希釈)又は血液ドナー血清プール(1 : 10最終濃度に希釈 ; コントロール)と共にブレインキュベート(4 、一晚)した添加ウサギ血清サンプル60 ~ 100  $\mu$ l /ウェル(最終濃度1 : 10 ~ 1 : 250に希釈)との37 にて1時間のインキュベーションを行った。次いで、プレートをWBで6回洗浄し、続いて70  $\mu$ l /ウェルのアルカリホスファターゼ接合ヤギ抗ウサギIg(6  $\mu$ g/ml ; Dako D0487)とのRTにて1時間のインキュベーションを行った。次いで、プレートをWBで6回洗浄し、続いて100  $\mu$ l /ウェルの0.3 % w/vのフェノールフタレインモノホスフェート(Sigma P-5758)とのRTにて10 ~ 60分間のインキュベーションを行った。最後に、100  $\mu$ l /ウェルのクエンチ溶液(0.1M TRIS + 0.1M EDTA + 0.5M NaOH + 0.01 % w/v  $\text{NaN}_3$  ; pH14)を添加してプレートを終了させ、続いてELISAリーダー (ASYS UVM 340) で550nmにて読み取った。

【 0 0 9 3 】

結果

図3は、ワクチン抗原400 SEQ-Bで免疫したウサギからの血清が、C5/gp41(015/201)に対応するペプチドにPBSの存在下で結合したことを証明する。この結合は、組換えgp41により、C5(015)、gp41(201)及びC2(204d)に由来するペプチドにより、そして400-SEQ-B自身により阻害することができた。この結合は、無関係なペプチド(B301-23)を用いて阻害することができなかった。

図4から明かなように、BI400-B免疫ウサギからの抗C5/gp41血清は、LTNP血清プールによって競合的に阻害されるが、BDコントロール血清では阻害されない。

図5に示されるように、C5/gp41に対する抗体は、< 15000コピー/mlのウイルス負荷を有する天然のウイルス抑制個体であるHIV患者の26/43で、15000コピー/mlを上回るウイルス負荷を有するHIV患者の4 / 15で観察された。更に、15000コピー/mlを下回るウイルス負荷を有するHIV-1患者(n = 43)で、15000コピー/mlを上回るウイルス負荷を有する患者(n = 15)と比較して、有意に(Mann-Whitney検定を用いて p = 0.018)高い抗C5 IgG応答が観察された(すなわち、同じ血清希釈率で測定されたOD値に対して群分けした)。

【 0 0 9 4 】

まとめると、BI400-Bを用いる免疫研究の結果は、C5及びgp41/C2に対する抗体応答を惹起するペプチドを、個々の成分としてのみならず複合体としても作製可能であることを証明する。これら抗体応答の特異性は、特定のペプチド抗原を使用するブロッキング研究で確認されている(図3)。更に、動物モデルにおいてこれらペプチドに対して生成される抗体は、自然なHIV感染で惹起される抗体に匹敵し、長期非進行に関連している(図4)。これら結果は、これらペプチドが診断薬に及びHIVが誘導する免疫活性化を標的するワクチンの開発に適切であることを示す。BI400-Bがgp41とC5との間の複合体に結合する抗体を惹起するという知見及びこれら抗体がLTNP HIV患者において同じ複合エピトープに対する抗血清と競合するという知見は、これらエピトープに対する免疫応答を刺激することによって、自身ではHIVに対してこのタイプの抗体を生じさせない患者にLTNP様状態を引き起こすことが可能であることを示している。

【図 3】

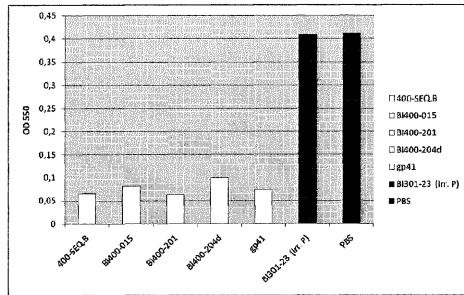
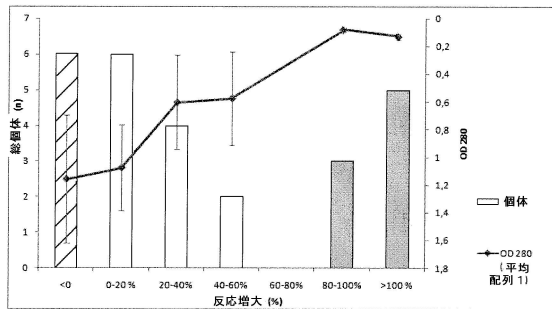
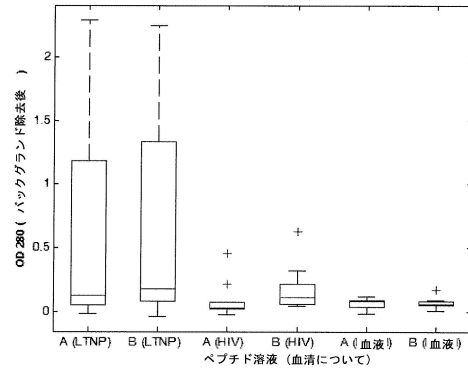


Fig. 3

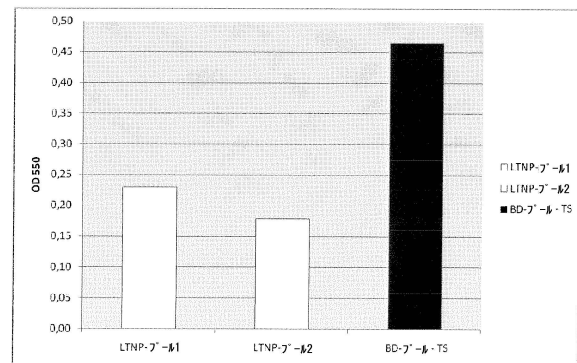
【図 1】



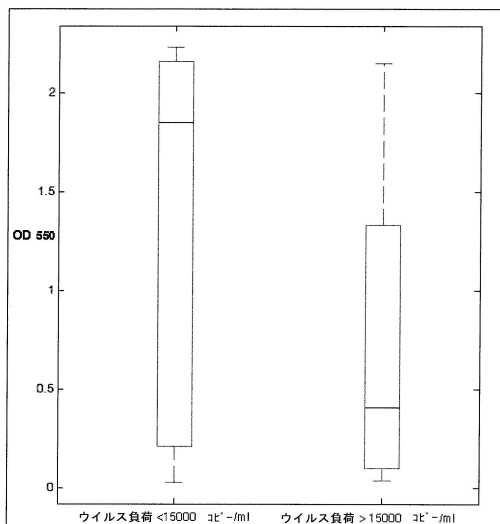
【図 2】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0005946766000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100166936  
弁理士 稲本 潔
- (74)代理人 100174883  
弁理士 富田 雅己
- (72)発明者 グロンヴォルド, マハ, ソメルフェルト  
ノルウェー、エヌ - 4 9 5 0 リセル、アクランド (番地なし)
- (72)発明者 ダルグレイス, アンガス  
イギリス、チーハム サリー エスエム2 7ピーティー、バーデン レーン、7
- (72)発明者 ランゲ, エイナー, トネス  
ノルウェー、エヌ - 3 7 4 4 シーエン、ストロンドルバケン 6
- (72)発明者 ホルンバーグ, イェンス, オロフ  
スウェーデン、エス - 2 5 4 4 1 ヘルシンボリ、ハルムシュルツガタン 1 5
- (72)発明者 ベンソン, ペール  
スウェーデン、エス - 2 1 7 7 4 マルモ、レドュンスガタン 1 2
- (72)発明者 ソレンセン, ビージャー  
ノルウェー、エヌ - 3 7 4 4 シーエン、メイヤーリア 3

審査官 松浦 安紀子

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 9 / 0 4 2 8 9 5 (WO, A 1)  
国際公開第2 0 0 9 / 0 9 9 7 7 7 (WO, A 1)  
Nature Medicine, 2 0 0 0 年, vol.6, p.207-10  
Journal of Virology, 1 9 9 9 年, vol.73, p.4009-18

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 0