

(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2013-505201

(P2013-505201A)

(43) 公表日 平成25年2月14日(2013.2.14)

(51) Int.Cl.

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)

F 1

A 61 K 9/127
A 61 K 37/66
A 61 K 39/00
A 61 K 39/39
A 61 K 47/28

テーマコード(参考)

4 C 076
4 C 084
4 C 085
4 H 045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-503432 (P2012-503432)
(86) (22) 出願日 平成22年4月5日 (2010.4.5)
(85) 翻訳文提出日 平成23年12月5日 (2011.12.5)
(86) 國際出願番号 PCT/US2010/001017
(87) 國際公開番号 WO2010/114628
(87) 國際公開日 平成22年10月7日 (2010.10.7)
(31) 優先権主張番号 61/166,625
(32) 優先日 平成21年4月3日 (2009.4.3)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 511043965
デューク ユニバーシティー
DUKE UNIVERSITY
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
7708-0083, ダーラム, ピー.オ
ー. ボックス 90083
(74) 代理人 100140109
弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74) 代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男
(74) 代理人 100096013
弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】広域反応性中和抗HIV抗体を誘導するための配合物

(57) 【要約】

本発明は、一般的に、抗HIV-1抗体を誘導する際に使用するのに適した配合物に、そして特に、広域反応性である抗HIV-1抗体の誘導のためのHIV-1 gp41膜近位外部領域(MPER)ペプチド-リボソーム・コンジュゲートとともにTLR1様受容体(TLR)アゴニストを含む配合物に関する。本発明はまた、こうした配合物を用いて中和抗HIV-1抗体を誘導する方法にも関する。

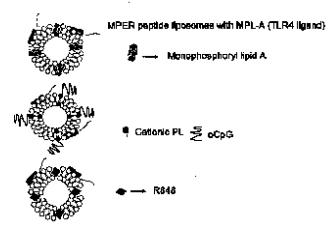
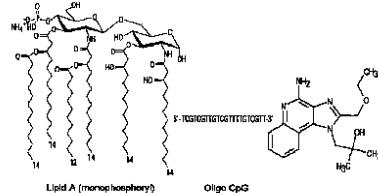


Fig. 9

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体において、抗HIV-1抗体の産生を誘導する方法であって、前記被験体に、前記誘導を達成するのに十分な量のリポソーム-ペプチド・コンジュゲートを投与する工程を含み、前記ペプチドが、前記リポソーム表面上に提示される膜近位外部領域(MPER)エピトープを含み、そして前記コンジュゲートがToll様受容体(TLR)リガンドを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記ペプチドが疎水性リンカーをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記リンカーが、前記MPERエピトープに対してC末端である、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

前記リンカーがGTH1である、請求項2記載の方法。

【請求項 5】

前記エピトープが配列ELDKWAまたはNWFNITを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

前記エピトープが配列QQEKNEQELLELDKWASSLWNを含む、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

前記エピトープが配列QQEKNEQELLELDKWAASSWNを含む、請求項5記載の方法。

【請求項 8】

前記エピトープが配列NEQEELLLELDKWASSLWNWFNITNWLWYIKを含む、請求項5記載の方法。

【請求項 9】

前記エピトープが配列NEQEELLLELDKWAASSWNWFNITNWLWYIKを含む、請求項5記載の方法。

【請求項 10】

前記TRLリガンドがTRL9リガンドである、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

前記TRL9リガンドがオリゴCpGである、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

前記TRLリガンドがTRL7/8リガンドである、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

前記TRL7/8リガンドがR848である、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

前記TRLリガンドがTRL4リガンドである、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

前記TRL4リガンドがモノホスホリルリピドAである、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

前記コンジュゲートがTRL9リガンドおよびTRL7/8リガンドを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

前記TRL9リガンドがオリゴCpGであり、そして前記TRL7/8リガンドがR-848である、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

前記コンジュゲートがTRL9リガンドおよびTRL4リガンドを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

前記TRL9リガンドがオリゴCpGであり、そして前記TRL4リガンドがR-848である、請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記コンジュゲートがさらに、被包されたインターフェロン- γ を含む、請求項1記載の方法。

【請求項21】

前記コンジュゲートがプライムまたはブーストとして投与される、請求項1記載の方法。

【請求項22】

リポソーム表面上に提示されるMPERエピトープ、および前記リポソームにコンジュゲート化された少なくとも1つのTRLリガンドを含む、免疫原。 10

【請求項23】

前記リポソーム内に被包されたインターフェロン- γ をさらに含む、請求項22記載の免疫原。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全内容が本明細書に援用される、2009年4月3日出願の米国仮出願第61/166,625号に優先権を請求する。

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号第A1067854号のもとに米国政府の援助を受けて作成された。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。 20

【0002】

技術分野

本発明は、一般的に、抗HIV-1抗体を誘導する際に使用するのに適した配合物に、そして特に、広域(broadly)反応性抗HIV-1抗体の誘導のためのHIV-1gp41膜近位外部領域(MPER)ペプチド・リポソーム・コンジュゲートとともにToll様受容体(TLR)アゴニストを含む配合物に関する。本発明はまた、こうした配合物を用いて中和抗HIV-1抗体を誘導する方法にも関する。

【背景技術】

【0003】

HIV-1ワクチン開発に対する主要な課題の1つは、免疫原が、広域(broadly)中和抗体(nAb)を誘導不能であることであった。nAbは、HIV-1感染中に生成される。しかし、生成されるnAbの大部分は、自己ウイルスまたは近縁関連株のみを中和する(Moogら, J. Virology 71:3734-3741(1997)、Grayら, J. Virology 81:6187-6196(2007))。HIVエンベロープ(Env)は、常に突然変異して、存在するnAb反応からエスケープする(Albertら, AIDS 4:107-112(1990)、Weiら, Nature 422:307-312(2003))。nAb反応は、HIV感染経過に渡って発展はする。しかし、HIV-1ウイルスの突然変異能のため、中和抗体反応は常に、ウイルス進化に「遅れを取っている」ように見える(Weiら, Nature 422:307-312(2003)、Richmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:4144-4149(2003)、Geffinら, Virology 310:207-215(2003))。 40

【0004】

徹底的な研究の後、HIVに対する広域中和モノクローナル抗体(mAb)がいくつか同定されてきている(Buchacherら, AIDS Res. Hum. Retroviruses 10:359-369(1994)、Zwickら, J. Virology 75:10892-10895(2001)、Burtonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137(1995)、

10

20

30

40

50

91)）。2つのこうした抗体、2F5および4E10は、HIVの保存される膜近位外部領域(MPER)をターゲティングし、広範囲の中和を有し(Binleyら, J. Virol. 78:13232-13252(2004))、そして新規に伝染したウイルスの、それぞれ80%および100%を中和することが示されてきている(Mehandruら, J. Virol. 78:14039-14042(2004))。いくつかの他の広域中和モノクローナル抗体と組み合わせて受動的に投与されると、2G12、2F5および4E10で構成されるmAbのカクテルは、動物モデルにおいて、ウイルス感染から宿主を防御するのに成功する(Babala, Nat. Med. 6:200-206(2000)、Ferrantelliら, J. Infect. Dis. 189:2167-2173(2004)、Mascolaら, Nat. Med. 6:207-210(2000)、Ruprechtら, Vaccine 21:3370-3373(2003))か、または抗レトロウイルス療法休止後のウイルスリバウンドを遅延させた(Trkolaら, Nat. Med. 11:615-622(2005))。

【0005】

HIV感染患者が2F5および4E10抗体を自発的に発展させることは稀であり(Dhillonら, J. Virol. 81:6548-6562(2007))、そしてワクチン接種によって、2F5および4E10様抗体の誘導が成功したことではない(Kimら, Vaccine 25:5102-5114(2006)、Coeffierら, Vaccine 19:684-693(2000)、Joyceら, J. Biol. Chem. 277:45811-45820(2002)、Hoら, Vaccine 23:1559-1573(2005)、Zhangら, Immunobiology 210:639-645(2005))という事実のため、HIV感染を防止するための2F5および4E10使用の潜在能力は、非常に損なわれる。天然HIV-1感染中に2F5または4E10様抗体を発展させる被験体を同定し、そしてこれらの広域中和抗体の機構またはこれに対する妨害を理解することは、AIDSワクチン設計に重要である。

【0006】

本発明は、少なくとも部分的に、2F5および4E10 mAbに対する中和感受性の増加と関連する、HIV-1 MPER領域中の稀なEnv突然変異の同定および性質決定から生じる。本発明はまた、B細胞寛容を調節し、そして免疫原性が劣っているHIV-1 gp41 MPERエピトープに対する抗体反応を増進することが可能な構築物の発展からも生じている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Moogら, J. Virol. 71:3734-3741(1997)

【非特許文献2】Grayら, J. Virol. 81:6187-6196(2007)

【非特許文献3】Albertら, AIDS 4:107-112(1990)

【非特許文献4】Weiら, Nature 422:307-312(2003)

【非特許文献5】Richmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:4144-4149(2003)

【非特許文献6】Geffinら, Virology 310:207-215(2003)

【非特許文献7】Buchacherら, AIDS Res. Hum. Retroviruses 10:359-369(1994)

【非特許文献8】Zwickら, J. Virol. 75:10892-10895(2001)

10

20

30

40

50

【非特許文献 9】Burtonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 888: 10134 - 10137 (1991)

【非特許文献 10】Binleyら, J. Virol. 78: 13232 - 13252 (2004)

【非特許文献 11】Mehandruら, J. Virol. 78: 14039 - 14042 (2004)

【非特許文献 12】Babaら, Nat. Med. 6: 200 - 206 (2000)

【非特許文献 13】Ferrantelliら, J. Infect. Dis. 189: 2167 - 2173 (2004)

10

【非特許文献 14】Mascolaら, Nat. Med. 6: 207 - 210 (2000)

【非特許文献 15】Ruprechtら, Vaccine 21: 3370 - 3373 (2003)

【非特許文献 16】Trkolaら, Nat. Med. 11: 615 - 622 (2005)

【非特許文献 17】Dhillonら, J. Virol. 81: 6548 - 6562 (2007)

【非特許文献 18】Kimら, Vaccine 25: 5102 - 5114 (2006)

20

【非特許文献 19】Coffierら, Vaccine 19: 684 - 693 (2000)

【非特許文献 20】Joyceら, J. Biol. Chem. 277: 45811 - 45820 (2002)

【非特許文献 21】Hoら, Vaccine 23: 1559 - 1573 (2005)

【非特許文献 22】Zhangら, Immunobiology 210: 639 - 645 (2005)

【発明の概要】

【0008】

一般的に、本発明は、抗HIV-1抗体を誘導する際に使用するのに適した配合物に関する。より具体的には、本発明は、HIV-1 gp41 MPERペプチド・リポソーム・コンジュゲートとともにTLRアゴニストを含む配合物に、そして該配合物を用いて、広域反応性中和抗HIV-1抗体を誘導する方法に関する。

【0009】

本発明の目的および利点は、以下の説明から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】自己および異種血清 / 抗体によるTND_669SおよびTND_669L_Env - 偽ウイルスの中和感受性。SC42 - 15ヶ月、SC42 - 27ヶ月およびSC42 - 5年は、感染15ヶ月、27ヶ月、および65ヶ月後の自己血清であり；SC03 - TT29はトリニダード・コホート由来の異種血清であり；IBBJT、BDは陽性対照として用いたHIV+患者血清であり；HIVIGはHIV+患者血清由来の精製ブールIgGである。試料の入手可能性が限定されているため、すべての試料を1回より多く試験したわけではない。1回より多く試験した試料に関しては、バーは平均力値に相当し、そしてエラーバーは標準誤差に相当する。

【図2】選択したSC42_Env配列の部分的整列。TND_669S、TND_669Lおよび7534 - xx (「xx」は図2に示す通りである)は、感染15ヶ月後の血漿由来の配列である；示す他の配列は感染後第0週(2661 - x)、第1週(00SC42 - xx)および60ヶ月(95SC42 - xx) (「x」および「xx」は図2に示す通りである)の血漿由来の選択した配列である。2F5および4E10のコンセンサス

40

50

・エピトープ配列を、それぞれ、青および緑の囲みで強調する。

【図3】図3Aおよび3B。多様なモノクローナル抗体および進入阻害剤T20によるTND_669SおよびTND_669LEnv-偽ウイルスの中和。2つの株に対する各試薬の平均IC50を、標準誤差を示すエラーバーとともに図3Aに示す。TND_669SおよびTND_669Lに対する各中和抗体強度のIC50値および倍相違を図3Bに示す。各IC50を少なくとも2回の独立の試験から得た。2F5、4E10、TriMab、1b12、および2G12に関するデータにはまた、Montefiori博士の研究室(デューク大学)が行った試験由来のデータの1セットも含まれる。TND_669SおよびTND_669Lに対する各mAbのIC50間の倍相違(TND_669S: TND_669L)を表の最後の列に列挙し、そしてTND_669Sの感受性における有意な増加を伴うものを黄色で強調する(そして

【0011】

【化1】

✓

【0012】

で示す)。

【図4】図4Aおよび4B。ペプチド吸収中和アッセイ。異なる用量の2F5ペプチドを用いて、mAb 2F5によるTND_669S Env-偽ウイルスの中和を試験した。突然変異体ペプチド(L669突然変異を含む2F5エピトープを含有する、2F5₅₆₋₆₇₀/L669S)による2F5 mAb中和の阻害を図4Aに示す。コンセンサス・ペプチドを含有するペプチド(コンセンサス・ペプチド)によって生成される阻害曲線は同様である。IC50データを図4B中の表に要約する。TND_669Lウイルスに対してもまた同様の試験を行った。同様の傾向が観察されたが、2F5 mAbに対するTND_669Lの感受性が低いため、TND_669L偽ウイルスを用いて生成されるデータは、定量的ではなかった。

【図5】図5Aおよび5B。mAb 2F5に対するF5mut(図5A)およびF5con(図5B)ペプチドの結合アビディティーに関するBIAcore SPRアッセイ。

【図6】図6Aおよび6B。ペプチド-リポソーム・コンジュゲートに対する2F5 mAbの結合。図6A。2F5ペプチド-リポソーム(破線)およびL669S突然変異体ペプチド-リポソーム(実線)に対する2F5 mAbの標準化特異的結合反応の比較。挿入図は、2F5 mAb相互作用の解離期(120~400s)の拡大図を示す。図6B。2F5 mAb-ペプチド-リポソーム相互作用の遭遇-ドッキングモデル、ならびに会合および解離工程の概算される速度定数。

【図7】PBM Cにおける二重感染適合度アッセイ。9:1(TND_669S: TND_669L)の投入比での試験を示す。相対適合度値 $1+S = 1.86$ 。 $(1+S = \exp(d) = \exp\{1n[(TM(t2) \times TL(t1)) / (TL(t2) \times TM(t1))]\} / t\}$ 。異なるウイルス投入比を用いた3回の個々の試験は、すべて、1.80~1.90の1+S値を生じた。

【図8】2つの広域中和抗体2F5および4E10のエピトープを含むHIV-1 gp41 MPERペプチド。合成リポソームにコンジュゲート化可能なgp41 MPERペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図9】リポソームとともに配合されたTLRアゴニストの構造。免疫原設計の模式図は、アジュバントとして異なるTLRアゴニストを含有するペプチド・リポソームを示す; TLR4(リピドA); TLR9(oCpG)およびTLR7(R848)。

【図10】図10A~10C。TLRアジュバントにコンジュゲート化されたMPERペプチド-リポソームと2F5 mAbの相互作用。図10Aは、リピドA(200 μg用量当量)を含むgp41 MPERリポソーム構築物への2F5 mAbの強い結合を示す。図10Bは、oCpG(50 μg用量当量)コンジュゲート化gp41 MPERリポソームへの2F5 mAbの結合を示す。図10Cは、R848コンジュゲート化gp

10

20

30

40

50

41 M P E R 含有リポソームに対する 2 F 5 m A b の結合を示す。T L R アジュvant のみを含む対照リポソームに比較して、g p 4 1 M P E R - アジュvant・リポソーム構築物各々に対する、強い 2 F 5 m A b 結合が観察された。

【図 11】I FN 被包 M P E R ペプチド・リポソーム。

【図 12】複数の T L R リガンドを伴う I FN 被包リポソーム。これらの構築物は、二重 T L R 誘発によって、B 細胞反応において相乗作用を提供する潜在能力を有する。

【図 13】2 F 5 (Ofekら, J. Virology 78: 10724 (2004)) および 4 E 10 (Cardosoら, Immunity 22: 163-173 (2005)) の結晶構造、ならびに脂質および H I V - 1 ウィルス膜への結合を排除するための C D R H 3 ループ中の突然変異設計。

【図 14 A】図 14 A および 14 B。4 E 10 (図 14 A) および 2 F 5 (図 14 B) C D R H 3 の疎水性残基を置換すると、脂質結合が妨害され、そして両 m A b が H I V - 1 を中和する能力が抑止される。

【図 14 B】図 14 A および 14 B。4 E 10 (図 14 A) および 2 F 5 (図 14 B) C D R H 3 の疎水性残基を置換すると、脂質結合が妨害され、そして両 m A b が H I V - 1 を中和する能力が抑止される。

【図 15】2 F 5 m A b による Q Z 4 7 3 4 および Q Z 4 7 3 4 / L 6 6 9 S 偽型化ウイルスの中和 (T Z M - b 1 細胞に対して試験)。Q Z 4 7 3 4 エンベロープ内に L 6 6 9 S 単一突然変異を導入することによって、Q Z 4 7 3 4 / L 6 6 9 S を生成した。曲線脇の数値は I C 5 0 値を示す。

【図 16】2 F 5 および TriMab (2 F 5、4 E 10 および 2 G 1 2 の 1 : 1 : 1 の組み合わせ) による、T N D _ 6 6 9 S および同じ血漿試料 (感染後 15 ヶ月) から単離された 2 つの他の株 (7 5 3 4 . 2 および 7 5 3 4 . 1 1) の中和。各バー上の数値は I C 5 0 値を示す。T Z M - b 1 細胞に対して試験を行った。

【図 17】M P E R リポソーム免疫原で免疫したモルモット (guinea pig) における、g p 4 1 M P E R 特異的抗体反応の誘導。

【図 18】M P E R リポソーム免疫原で免疫した非ヒト靈長類 (N H P) における、g p 4 1 M P E R 特異的抗体反応の誘導。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 3】

本発明は、T L R リガンドおよび H I V - 1 g p 4 1 中和抗原を提示する、リポソームに基づくアジュvant・コンジュゲートに、そして該コンジュゲートを用いて、被験体 (例えばヒト被験体) において、中和抗 H I V - 1 抗体を誘導する方法に関する。適切な中和抗原には、g p 4 1 M P E R エピトープ・ペプチド (Armbrusterら, J. Antimicrob. Chemother. 54: 915-920 (2004)、Stieglitz および Katinger, J. Antimicrob. Chemother. 512: 757-759 (2003)、Zwickら, Journal of Virology 79: 1252-1261 (2005)、Purtscherら, AIDS 10: 587 (1996)) およびその変異体、例えば M P E R Mab、2 F 5 および 4 E 10 に対してより高い中和感受性を与える変異体が含まれる。好ましい態様において、変異体は、M P E R m A b、2 F 5 および 4 E 10 に対して、より高い中和感受性を与える L 6 6 9 S 突然変異を持つ M P E R エピトープ・ペプチドである (Shenら, J. Virology 83: 3617-25 (2009))。

【0 0 1 4】

本発明で使用するのに適したリポソームには、限定されるわけではないが、P O P C、P O P E、D M P A (またはスフィンゴミエリン (S M))、リソホスホリルコリン、ホスファチジルセリン、およびコレステロール (C h) を含むものが含まれる。最適比を当業者が決定することも可能であるが、例には、4 5 : 2 5 : 2 0 : 1 0 の比の P O P C : P O P E (または P O P S) : S M : C h、あるいは P O P C : P O P E (または P O P

10

20

30

40

50

S) : D M P A : C h が含まれる。使用可能なリポソームの別の配合物には、9 : 7 . 5 : 1 のモル比で配合された D M P C (1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン) (またはリソホスホリルコリン)、コレステロール (C h) および D M P G (1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - r a c - (1 - グリセロール) が含まれる (Wasssefla, Immunomethods 4 : 217 - 222 (1994); Alvingら, G. Gregoriadis (監修), Liposome technology 第2版, vol. 111 CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1993); Richardsら, Infect. Immun. 66 (6) : 285902865 (1998))。上記脂質組成物をリピドAと複合体形成させて、そして免疫原として用いて、リン脂質に対する抗体反応を誘導してもよい (Schusterら, J. Immunol. 122 : 900 - 905 (1979))。好ましい配合物は、Schusterら, J. Immunol. 122 : 900 - 905 (1979) にしたがって、リピドAと複合体形成させた、60 : 30 : 10 の比の P O P C : P O P S : C h を含む。

10

【0015】

本発明にしたがって、免疫反応増進性 T L R リガンド、例えばモノホスホリルリピドA (M P L - A、T L R 4 リガンド)、オリゴC p G (T L R 9 リガンド) および R - 8 4 8 (T L R 7 / 8 リガンド) を、個々に、または組み合わせて、H I V - 1 g p 4 1 M P E R ペプチド免疫原とコンジュゲート化されたリポソーム内に配合する。T L R アゴニストの好ましい組み合わせは、o C p G (T L R 9) (Hemniら, Nature 408 : 740 - 745 (2004)) および R 8 4 8 (T L R 7 / 8) (Hemniら, Nat. Immunol. 3 : 196 - 200 (2002)) を含む。

20

【0016】

本発明の構築物のさらなる設計には、サイトカイン、インターフェロン (I F N) - が被包され、そして被包されたかまたは膜結合性の C D 4 0 リガンドを含む M P E R ペプチド - リポソームが含まれる。2つの広域中和 g p 4 1 M P E R 抗体 (2 F 5、4 E 1 0) は、こうした T L R リガンド・アジュバントが会合したリポソーム構築物に高いアフィニティで結合する。これらの構築物を用いて、B 細胞寛容を調節し、広域反応性中和抗体を作製可能な特定の B 細胞集団に対してリポソームを向け、そして免疫原性が劣った H I V - 1 g p 4 1 M P E R エピトープに対する抗体反応を増進することも可能である。

30

【0017】

自己反応性 B 細胞は、B 細胞受容体 (B C R) および T L R の二重会合に依存する機構を通じて、T L R リガンドによって活性化可能である (Leadbetterら, Nature 416 : 603 (2002); Marshak-Rothsteinら, Annu. Rev. Immunol. 25 : 419 - 41 (2007)、Herlandら, Immunity 29 : 249 - 260 (2008)、Schlomchik, Immunity 28 : 18 - 28 (2008))。本発明の好ましい免疫原設計において、可溶性 I F N - は、M P E R 6 5 6 または M P E R 6 5 6 - L 6 6 9 S ペプチドなどの M P E R ペプチドにコンジュゲート化されたリポソーム内に被包される。I F N - は、B C R 活性化閾値を低下させることによって、自己反応性 B 細胞に対する選択性を調節し、そして緩和すると報告されてきている (Uccelliniら, J. Immunol. 181 : 5875 - 5884 (2008))。免疫原設計は、膜結合性 M P E R エピトープへの結合および H I V - 1 の中和の両方に、g p 4 1 M P E R 抗体の脂質反応性が必要であるという観察から生じる。

40

【0018】

リポソームがターゲティング可能な B 細胞サブセットには、脂質および M P E R の g p 4 1 エピトープの両方と反応する多重反応性抗体を作製可能であるいかなる B 細胞サブセットも含まれる。これらの B 細胞サブセットには、限定されるわけではないが、辺縁帯 I g M + C D 2 7 + B 細胞サブセット (Weillら, Annu. Rev. Im

50

munol. 27:267-85 (2009)、Liら, J. Exp. Med. 195:181-188 (2002)、ヒトB細胞の移行性集団 (Simsら, Blood 105:4390-4398 (2005))、およびマウス免疫グロブリン (Ig) 軽鎖ラムダXのヒト同等物を発現するB細胞のヒト同等物 (Liら, Proc. Natl. Acad. Sci. 103:11264-11269 (2006)、Witschら, J. Exp. Med. 203:1761-1772 (2006)) が含まれる。これらのB細胞サブセットはすべて、多重反応性抗体を作製する能力を有し、そしてしたがって、脂質およびHIV-1 gp41の両方と反応する特性を有する抗体を作製する能力を有する。リポソームがその内部に脂質およびgp41の両方を有する特性を有する結果、これらの免疫原は関心対象のB細胞を選択的にターゲティングするはずである。これらのリポソームを用いて、B細胞の寛容を一過性に破壊するか、または稀なB細胞サブセットをターゲティングすることも可能であるため、以下に記載されるものなどの脱グリコシル化エンベロープ調製物などの他のHIV-1エンベロープ免疫原を、TLR4アゴニスト、TLR7/8アゴニストおよびIFNを含有するリポソーム中で配合してもよいことがわかる。

10

【0019】

脱グリコシル化JRF_L gp140 Envタンパク質およびCD4結合部位突然変異体gp140 (JRF_L APA) が以前の出願に記載されてきている (例えばWO 2008/033500を参照されたい)。膜貫通ドメインを取り込むことによって、脱グリコシル化envおよび免疫抑制性でないようにCD4に結合しないよう突然変異させたEnvを、リポソーム中に係留してもよく、そして界面活性剤中で可溶化した後、合成リポソーム内に再構成してもよい。あるいは、Env gp140のHisタグ化 (c末端)型を、HIV-1のgp41中間体型 (gp41中間体) に関して記載されるように、リポソーム内に係留してもよい。

20

【0020】

多重反応性抗体を作製可能な多くのB細胞サブセットが、哺乳動物DNAにも結合することを考慮すると、リポソームへのDNAの添加を用いて、免疫原を反応性B細胞にターゲティングすることも可能である。

【0021】

本発明のリポソーム含有配合物を、例えば筋内、静脈内、腹腔内または皮下注射によって投与してもよい。さらに、配合物を鼻内経路によって、あるいは座薬様ビヒクリルとして直腸内または膣に投与してもよい。一般的に、リポソームを生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水pH 7.0などの水溶液中に懸濁する。最適投薬措置は、当業者によって容易に決定可能である。

30

【0022】

本発明の特定の側面が、以下の限定しない実施例に、より詳細に記載されうる。公開PCT出願第WO 2006/110831号および第WO 2008/127651号、米国公開出願第2008/0031890号および第2008/0057075号、米国仮出願第60/960,413号、ならびに米国出願第11/918,219号もまた参考されたい (また、2009年4月3日出願の "Formulation" と題される関連出願 (代理人整理番号01579-1430) および2009年4月3日出願の "Mouse Model" と題される関連出願 (代理人整理番号01579-1431) もまた参考されたい)。

40

【実施例】

【0023】

実施例1

実験詳細

被験体

トリニダード血清転換コホートが先に記載された (Blattnerら, J. Infect. Dis. 189:1793-1801 (2004))。簡潔には、性行為

50

感染症（STD）クリニック由来の患者をHIV感染に関して監視し、そして血清転換に際して登録した。感染は、異性との性的接触を通じて起こり、そしてサブタイプBウイルスがすべての感染の原因であった。本研究における関心対象の患者、SC42は、感染までの5年間、抗ウイルス療法に関して未処置であった。

【0024】

全長エンベロープの分子クローニング

全長gp160のクローニング戦略が先に記載されてきている（Weilら、Nature 422:307-312 (2003)、Liら、J. Virol. 79:10108-10125 (2005)）。簡潔には、QIAampウイルスRNAミニキット（Qiagen、カリフォルニア州バレンシア）を用いて患者血漿試料からウイルスRNAを抽出し、そして続いて、SuperScript II (Invitrogen Corp.、カリフォルニア州カールスバッド) およびランダム六量体プライマーを用いて、cDNAに逆転写した。以下のプライマーとともに、入れ子PCRによって、全長エンベロープ配列を生成した：第1周期プライマー 5' OUT 5' - TAGAGCCCT GGAAAGCATTCCAGGAAG-3'、nt 5852-5876および3' OUT 5' - TTGCTACTTGTGATTGCTCCATG T-3' nt 8912-8935；ならびに第二周期プライマー、5' Intopo 5' - CACCTAGGCATCTCCATGGCAGGAAGA AG-3'、nt 5957-5982および3' IN 5' - GTCTCGAGATACTGCTCCCCACCC-3'、nt 8881-8903。PCR産物を精製し、そして次いで、製造者の指示にしたがって、定方向クローニングベクターpcDNA 3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen) 内に直接連結した。このpcDNA 3.1D/V5-His-TOPOベクターは、サイトメガロウイルス・プロモーターを含有し、該プロモーターは、続く偽ウイルス産生のためのエンベロープタンパク質発現を可能にする。

【0025】

单一突然変異導入のための突然変異誘発

製造者の指示にしたがってQuickChange XL部位特異的突然変異誘発キット（Invitrogen Corp.）を用いて、HS-MPER内にS669L突然変異を導入して、HS-MPER/S669Lを生成し、そしてHS-MPER内にK665N突然変異を導入して、HS-MPER/K665Nを生成した。HS-MPER内にS669L突然変異を導入するためのプライマーは：fN-MPER_S669L (5' - GGATAAGTGGGCAAGTTGTGGAATTGGTTGAC-3') およびr7534.5_S669L (5' - GTCAAAACCAATTCCACAAACTTGCCCCACTTATCC-3') であり；HS-MPER内にK665Nを導入するためのプライマーは：fHS-MPER_K665N (5' - gaattatttagaatttggataaacgtggcaagttcgtagg-3') およびr7534.5_K665N (5' - CCACGAACTTGGCCAGTTATCCAATTCTAAATAATTCC-3') であった。

【0026】

env-偽ウイルスの產生および力価決定

マイナーな修飾を伴い、先に記載される方法（Liら、J. Virol. 79:10108-10125 (2005)）から修飾した方法にしたがって、env-偽ウイルスの產生および力価決定を行った。FUGENE（登録商標）HDトランスフェクション試薬（Roche Applied Science、スイス・バーゼル）を用い、env欠損HIV-1骨格（pSG3 env）とともに、pcDNA3.1D/V5-His-TOPOベクター中の全長envクローンを293T細胞内に同時トランスフェクションした。インキュベーション24~36時間後に組織培養液を採取し、そして新鮮なウシ胎児血清をウイルスストックに添加して、最終濃度20%を作製した。

【0027】

先に記載されるように（Liら、J. Virol. 79:10108-1012

10

20

30

40

50

5 (2 0 0 5)) 、 J C 5 3 - B L 細胞に対して、各ウイルス調製物の 5 0 % 細胞培養感染用量 (T C I D 5 0) を決定した。簡潔には、連続希釈ウイルスストックを用いて、96 ウェル平底プレート上の J C 5 3 - B L 細胞を 4 8 時間感染させた。次いで、細胞を溶解し、そして B r i t e L i t e TM アッセイ系 (P e r k i n E l m e r , I n c . 、マサチューセッツ州ウォルトン) によって相対発光単位 (R L U) を決定した。細胞のみの対照のものの 2 . 5 倍を超えるルシフェラーゼ発光を示したウェルを、ウイルス感染に関して陽性と見なした。R e e d - M u e n c h 式を用いて、T C I D 5 0 を計算した。

【 0 0 2 8 】

中和アッセイ

先に記載されるように (L i l a , J . V i r o l . 7 9 : 1 0 1 0 8 - 1 0 1 2 5 (2 0 0 5)) 、 96 ウェル平底プレート上の J C 5 3 - B L 細胞に対して、偽ウイルスに関する中和アッセイを行った。簡潔には、連続希釈血清試料または精製 A b を試験ウイルスとインキュベーションした後、J C 5 3 - B L 細胞を添加した。B r i t e L i t e TM アッセイ系で各ウェルの相対発光単位 (R L U) を測定し、そしてウイルス対照に比較してウイルス感染を 5 0 % 阻害可能である血清の最高希釈として (血清試料の場合) または A b の最低濃度として (精製 A b の場合) I C 5 0 を決定した。

【 0 0 2 9 】

ペプチド吸収中和アッセイ

中和アッセイからペプチド吸収中和アッセイを修飾した。ウイルス添加前に 1 時間、適切に希釈したペプチドと連続希釈血清試料または精製 A b をブレインキュベーションした後、通常の中和アッセイを行った。

【 0 0 3 0 】

表面プラズモン共鳴 (S P R) アッセイ

先に記載されるように (A l a m l a , J . I m m u n o l . 1 7 8 : 4 4 2 4 - 4 4 3 5 (2 0 0 7)) 、 2 0 で維持した B I A c o r e 3 0 0 0 (B I A c o r e I n c 、 ニュージャージー州ピスカタウェイ) 上で S P R 結合アッセイを行った。記載されるように (A l a m l a , J . I m m u n o l . 1 7 8 : 4 4 2 4 - 4 4 3 5 (2 0 0 7) 、 A l a m l a , A I D S R e s . H u m . R e t r o v i r u s e s 2 0 : 8 3 6 - 8 4 5 (2 0 0 4)) 、 S P 6 2 ペプチド - g p 4 6 5 2 - 6 7 1

【 0 0 3 1 】

【 化 2 】

I (Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N)

【 0 0 3 2 】

および S P 6 2 - L 6 6 9 S (g p 4 1 6 5 2 - 6 7 1)

【 0 0 3 3 】

【 化 3 】

(Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S S W N)

【 0 0 3 4 】

ならびにスクランブル化配列を持つ対照ペプチド (2 F 5 6 5 6 - 6 7 0 スクランブル化および 2 F 5 6 5 6 - 6 7 0 / L 6 6 9 S スクランブル化) のビオチン化型を個々に、B I A c o r e S A センサーチップ上に係留した。ストレプトアビシンへの 1 0 0 ~ 1 5 0 反応単位 (R U) の結合が観察されるまで、各ペプチドを注入した。スクランブル化 2 F 5 ペプチド表面上の非特異的結合を減じた後、m A b 結合の特異的結合反応を得た。二価分析物モデル (二価 I g 分子のアビディティーを説明する) を用いて、速度定数を測定し、そして m A b 2 F 5 に関して 0 . 0 1 ~ 1 1 9 n M の範囲の 2 F 5 力価決定から、結合曲線への全範囲曲線適合を得た。m A b 2 F 5 を 3 0 μ L / 分で 2 ~ 6 分間注入し、そしてグリシン - H C 1 p H 2 . 0 およびサーファクタント P 2 0 (0 . 0 1 %) を

10

20

30

40

50

再生緩衝液として用いた。

【0035】

リポソーム係留ペプチドを用いたSPRアッセイを、上記と同様の様式で行った。用いたペプチドは、SP62(gp41 652-671)-GTH1(QQEKEKNEQELLELDKWASLWNKYKRWILGLNKIVRMYS-ビオチン、コンセンサス2F5エピトープを含有する)およびSP62-L669S(gp41 652-671)-GTH1(

【0036】

【化4】

QQEKEKNEQELLELDKWASLWNKYKRWILGLNKIVRMYS -ビオチン

10

【0037】

L669S置換を伴う2F5エピトープを含有する)である。

適合度アッセイ

重要でない修飾を伴って、先に記載されるように(Luら, J. Virol. 78: 4628-4637(2004))、二重感染適合度アッセイを行った。env PCR産物、およびレポーター遺伝子を含むNL4-3バックグラウンドベクターを同時トランسفエクションすることによって、TND_669SまたはTND_669L envおよびマーカー配列(ネズミチフス菌(Salmonella enterica serovar Typhimurium)ヒスチジノール・デヒドロゲナーゼ[hisD]遺伝子またはヒト胎盤熱安定性アルカリホスファターゼ[PLAP]遺伝子のいずれか)を含有するHIV-1感染性キメラウイルスを生成した。二重感染適合度アッセイにおいて、特定の投入比(レポーター遺伝子のリアルタイムPCRによって決定されるようなものの2つのキメラウイルスを用いて、PBMCを同時感染させた(MOI=0.001))。リアルタイムRT-PCRを用いて、対応するマーカー(hisDまたはPLAP)によって、培養中の2つのEnv種を含むウイルスの相対産生を測定した。特定の時点(第4日、第7日および第10日)で、総ウイルス集団中の個々のウイルスの割合を計算することによって、二重感染中の個々のウイルスの産生を決定した。先に記載されるように(Wuら, J. Virol. 80: 2380-2389(2006))、以下の等式によって、個々のウイルスの相対適合度値(1+S)を決定した:

$$(1+S = \exp(d) = \exp\{\ln[(TM(t_2) \times TL(t_1)) / (TL(t_2) \times TM(t_1))]\} / t\}$$

1+S = exp、ここでSは選択係数であり; M_t、M₀、L₁、およびL₀は、それぞれ、接種物中の時点tでの、より適合した変異体またはより適合しない変異体の比率、および最初の比率(0)である。

【0038】

結果

TND_669Sエンベロープの同定

SC42の血漿試料から複数の長期Envクローンを得て、EnvクローンからNL4-3Env-偽型化ウイルスを作製し、そして自己血清および異種血清に対する、選択したEnvクローンの中和感受性を試験した。自己血清による中和に非常に感受性であるエンベロープ株を同定した。慢性感染HIV+被験体から得たエンベロープ・クローンであるTND_669Sは、自己および異種血清の両方による中和に対して、予期されない高感受度を示した。TND_669Sは、同時期のおよび27ヶ月(登録後)自己血清によって、それぞれ、845および1,353の力値で中和され、一方、その中和感受性が同じ時点(登録15ヶ月後)から得られたエンベロープ・クローンに典型的であり、そしてそのエンベロープ配列に基づいて比較のために遡及的に選択された別の単離体であるTND_669Lは、同時期の自己血清中和に感受性でなく、そして登録27ヶ月後の自己血清によって、わずか26の力値でしか中和されなかつた(図1)。次いで、TND_669SおよびTND_669L Env-偽ウイルスを異種患者血清パネル、ならびに陽性

20

30

40

50

対照として用いるいくつかのHIV+血清/Abに対して試験した。TND_669S Env-偽ウイルスは、トリニダード・コホート内で、異種血清による中和に、最大47倍より感受性であることが示された。試験した14人の患者血清の中で、7つは、TND_669L偽ウイルスよりも10倍より効率的にTND_669S偽ウイルスを中和した(図1)。

【0039】

L669S突然変異の同定

TND_669Sエンベロープの中和感受性増加の原因となる遺伝子変動に関して、TND_669SおよびTND_669L gp160のタンパク質およびDNA配列を調べた。2つのenv DNA配列間には6ヌクレオチドの相違がある。しかし、これらのうち5つは同義の(synonymous)突然変異であり、TND_669SおよびTND_669L Env間に単一のアミノ酸相違を生じる。単一アミノ酸相違は、MPER中、2F5エピトープのC末端近傍および4E10エピトープの2aa上流である、669位に位置する(図2)。TND_669Lは2F5コンセンサス配列を含有し、一方、TND_669SはL669S突然変異を含有する。患者SC42の登録15ヶ月後の血漿から得られる10のクローンのうち3つは、この突然変異を含有し、一方、この突然変異は、登録1週間後の血漿または登録5年後の血漿のいずれにも見られなかった。興味深いことに、LANLデータベース中、ほぼ1000の全長Env配列のうちわずか1つがこのL669S突然変異を含有する。

10

20

【0040】

モノクローナル抗体に対するL669S突然変異体の感受性

L669S突然変異の位置に基づいて、2F5および4E10 mAbに対するTND_669SおよびTND_669Lの感受性を試験した。驚くべきことではないが、TND_669Sは2F5 mAbに非常に感受性であり、一方、TND_669Lは中程度にしか感受性でなかった(図3)。興味深いことに、TND_669Sはまた、TND_669Lに比較して、4E10 mAbによる中和に非常に感受性である。図3に示すように、TND_669S Env-偽ウイルスに対する2F5および4E10 mAbのIC₅₀は、TND_669L Env-偽ウイルスに対するものより、それぞれ、279倍および275倍低かった。TND_669SおよびTND_669Lの平均IC₅₀は、2F5に関して、それぞれ0.014(±0.0056)および3.92(±1.52)μg/mlであり、そして4E10に関して、それぞれ0.031(±0.012)および8.49(±1.29)μg/mlであった。

30

【0041】

グリカン依存性mAb 52Dおよび進入阻害剤T20を含む、いくつかの他の中和剤に対するTND_669SおよびTND_669L偽ウイルスの感受性もまた試験した(図3)。TND_669S偽ウイルスに関しては、2G12およびT20に対する感受性の有意な相違はまったく観察されず、そして17bおよび1b12に対する感受性のわずかな増加のみ(それぞれ~2倍および4倍)が観察され、あるとしても、エンベロープ中の大きな変化が、TND_669Sエンベロープに関して観察される中和感受性の劇的な増進を説明することは不可能であることが示された。1.7B、23E、およびE51に対する2つの株の感受性の相違は定量化不能であり、これはTND_669Lがこれらの抗体による中和に対して十分に感受性でないためである。興味深いことに、TND_669Lエンベロープはまた、447-52D中和に感受性ではなく、一方、TND_669Lエンベロープは、0.31μg/mlのIC₅₀で中和され、L669S突然変異と関連する447-52D感受性の>161倍の増進が示された。

40

【0042】

単一のL669S突然変異が、表現型変化を説明する

L669S突然変異が単独で、表現型変化の原因であることを確認するため、部位特異的突然変異誘発によって、TND_669S内に、S669L突然変異を導入した。生じたTND_669S/S669Lは、2F5に対して、TND_669Lのものと匹敵す

50

る、中程度の感受性しか示さず、TND_669SにおけるL669S突然変異が単独で、中和に対する感受性増加に寄与していることが確認された。次に、L669S突然変異と関連する表現型変化におけるウイルス骨格の役割を調べた。別の初代単離体、QZ4734のエンベロープ内に、L669S突然変異を導入した。L669S突然変異は、QZ4734 Env-偽ウイルスを、2F5 mAbによる中和に対して、2対数規模より高く感受性にした(図15)。さらに、L669S突然変異を共有する他の2つのクローンは、2F5に対する類似の度合いの感受性増加を示した(図16)。これらの発見によって、L669Sが、ウイルス骨格に関わらず、MPER抗体による中和に対するHIV-1エンベロープの感受性を増加させうることが示唆される。

【0043】

10

TND_669Sエンベロープの中和は、その慣用的エピトープに対する2F5結合によって仲介される

2F5耐性Env変異体の性質決定によって、DKWコア領域中のK665N突然変異が2F5結合を抑止し、そして2F5耐性を生じることが示されてきている(Purtscherら, AIDS 10:587-593(1996))。これによって、2F5エピトープEQELLEDKWASLWNのコア領域中のDKWが2F5結合に必須であることが示唆される。2F5によるTND_669Sエンベロープの強力な中和もまた、慣用的な2F5エピトープのコアアミノ酸への2F5 mAbの結合によって仲介されるかどうかを試験するため、TND_669S/K665N突然変異体を作製し、そして2F5および4E10 mAbに対するその感受性を試験した。TND_669Sエンベロープ内にK665N突然変異を導入すると、完全な2F5耐性表現型が生じ、一方、4E10に対するエンベロープの感受性は影響を受けなかった。

20

【0044】

30

2F5ペプチドが2F5 mAbの中和活性を吸収する能力

L669S置換がMPER中和感受性を増加させる能力に関するありうる機構を調べるため、コンセンサス2F5エピトープ(2F5₆₅₆₋₆₇₀)またはL669S置換を含む2F5エピトープ(2F5₆₅₆₋₆₇₀/L669S)のいずれかを含有するペプチドを合成し、そして続いて、これらが2F5 mAb中和活性を吸収する能力に関して試験した。中和アッセイ前に、2F5 mAbをF5conまたはF5mutペプチドのいずれかであらかじめ吸収した。驚くべきことに、F5mutは、2F5 mAb中和をF5conより強力には阻害しなかった。図6Aおよび6Bに示すように、どちらのペプチドも、用量依存性方式で、TND_669S Env偽ウイルスの2F5中和を阻害した。しかし、3μMのF5mut(2F5 mAbのIC₅₀を0.951μg/mlまで減少させた)および0.3μMのF5con(2F5 mAbのIC₅₀を0.911μg/mlまで減少させた)によって達成される阻害が匹敵するレベルであることによって明らかであるように、F5conは、2F5中和を阻害する際、より効率的である(図4B)。

30

【0045】

40

L669S突然変異は、そのエピトープに対する2F5 mAbの結合アビディティーを増加させなかった

L669S突然変異が2F5 mAbに対する2F5エピトープのアビディティーを増進する可能性を調べるため、コンセンサス2F5エピトープ(2F5₆₅₆₋₆₇₀)またはL669S突然変異を含む2F5エピトープ(2F5₆₅₆₋₆₇₀/L669S)のいずれかを含有するペプチドを、各ペプチドのスクランブル化型とともに、2F5結合熱力学に関して、BIAcore SPR(表面プラズモン共鳴)において試験した。F5conおよびF5mutペプチドに関する平衡解離定数(KD)は、それぞれ11.0および28.1nMであり(図5)、F5conがF5mutよりもわずかに高いアビディティーで2F5に結合するが、この2.7倍の相違が有意な相違ではないことが示される。結合ELISAデータによってもまた、2F5 mAbによる2つのペプチドの結合間に有意な相違がないことが確認された(図5)。これによって、MPER配列の示差的

50

な感受性には、中和抗体のこの領域の曝露を改変する、M P E R におけるコンホメーション変化などの、他の要因が関与している可能性が示唆される。

【0046】

脂質環境における 2 F 5 m A b へのペプチドの結合

H I V - 1 ウィルスにおいて、M P E R はエンベロープ脂質二重層に極近接している。直接結合 S P R アッセイは、2 F 5 m A b が F 5 c o n および F 5 c o n ペプチドに匹敵するアビディティーで結合することを示した。脂質環境において、エピトープへの 2 F 5 m A b の結合に対する L 6 6 9 S 置換のありうる影響をさらに調べるために、リン脂質含有リポソームに係留されたペプチドを用いて、S P R 結合アッセイを行った。図 6 に示すように、L 6 6 9 S 置換を含有するペプチドは、注入を停止した 10 秒後、6 1 6 . 7 の反応単位（バックグラウンドを減じたもの）で 2 F 5 m A b に結合する一方、コンセンサス 2 F 5 エピトープは、4 9 4 . 6 の反応単位で 2 F 5 に結合し、脂質環境において、L 6 6 9 S 置換を含む 2 F 5 ペプチドが、コンセンサス 2 F 5 m A b よりも強く、2 F 5 m A b に結合することが示された。

10

【0047】

T N D _ 6 6 9 S ウィルスの適合度は非常に損なわれている

M P E R 構造における改変が適合度欠損を生じるかどうかを決定するため、N L 4 - 3 骨格、ならびにそれぞれ T N D _ 6 6 9 S および T N D _ 6 6 9 L エンベロープ配列を含有する複製コンピテント組換えウィルスを用いて、末梢血リンパ球における二重感染競合アッセイによって、T N D _ 6 6 9 S および T N D _ 6 6 9 L ウィルスの相対適合度を調べた。9 : 1 の投入比 (T N D _ 6 6 9 S : T N D _ 6 6 9 L) で、感染 4 日後、T N D _ 6 6 9 S ウィルスよりも、T N D _ 6 6 9 L ウィルスが増殖し（図 7）、T N D _ 6 6 9 S ウィルスにおける L 6 6 9 S 突然変異に関連する適合度の有意な喪失が示唆された。計算される相対適合度 (1 + S) は 1 . 8 6 である。適合度相違をさらに定量化するため、1 : 4 の比 (T N D _ 6 6 9 S : T N D _ 6 6 9 L) もまた調べ、そして T N D _ 6 6 9 S ウィルスの適合度低下が確認された（データ未提示）。

20

【0048】

要約すると、2 F 5 および 4 E 1 0 m A b 中和両方に対するエンベロープの中和感受性を有意に増加させる、H I V - 1 エンベロープにおける突然変異 L 6 6 9 S が同定された。m A b 2 F 5 および 4 E 1 0 に対する T N D _ 6 6 9 S および T N D _ 6 6 9 L E n v - 偽ウィルスの平均 I C ₅₀ は、それぞれ、0 . 0 1 4 および 0 . 0 3 1 μ g / m l である。9 3 の H I V - 1 株のパネルを多様な m A b に対する中和感受性に関して調べた B i n l e y ら (J . V i r o l . 7 8 : 1 3 2 3 2 - 1 3 2 5 2 (2 0 0 4)) による研究において、大部分の単離体は、1 ~ 1 0 μ g / m l の I C ₅₀ で 2 F 5 および 4 E 1 0 によって中和される一方、9 つの株のみが 2 F 5 m A b によって I C ₅₀ < 1 μ g / m l で中和され、そして 9 つが 4 E 1 0 m A b によって < 1 . 0 μ g / m l の I C ₅₀ で中和された。2 F 5 および 4 E 1 0 m A b に対する T N D _ 6 6 9 S の I C ₅₀ は、それぞれ 0 . 0 5 および 0 . 1 7 μ g / m l の I C ₅₀ で、2 F 5 および 4 E 1 0 m A b によって中和される 2 F 5 / 4 E 1 0 m A b 最高感受性株 (B U S x x x M N c) よりもさらにより低かった。比較すると、L 6 6 9 S 突然変異は、先に報告された最も感受性であるウィルスよりも、2 F 5 および 4 E 1 0 m A b 中和に対して、エンベロープをそれぞれ 4 倍および 5 倍、より感受性にする。

30

【0049】

別の初代単離体 Q Z 4 7 3 4 に L 6 6 9 S 突然変異を部位特異的突然変異誘発すると、Q Z 4 7 3 4 / L 6 6 9 S E n v - 偽ウィルスが、2 F 5 m A b 中和に対して、2 対数より高く、より感受性になることによって裏付けられるように、単一アミノ酸突然変異 L 6 6 9 S は、この特異的表現型の原因である。これをさらに確認するため、また、T N D _ 6 6 9 S の 6 6 9 位のセリンをロイシンに逆突然変異させると、T N D _ 6 6 9 S エンベロープで観察される超感受性の喪失が生じた。

40

【0050】

50

T N D _ 6 6 9 S および T N D _ 6 6 9 L エンベロープはどちらも、バルク P C R によって得られた。後に、单一ゲノム増幅 (S G A) を行ったが、エンベロープ配列は同定されず、L 6 6 9 S 突然変異が in vivo では循環しないことが示された。さらに、L 6 6 9 S 突然変異は、適合度の有意な喪失を生じ、これによって、天然感染中に存在していたとしても、適合度レベルが低いため、十分に長くは循環しないであろうことが示された。

【 0 0 5 1 】

Z w i c k l a , J . V i r o l . 7 9 : 1 2 5 2 - 1 2 6 1 (2 0 0 5) による洗練されたアルカリスキャニング突然変異誘発研究において、21のM P E R A 1 a 突然変異体のうち 1 3 が、2 F 5 または 4 E 1 0 m A b 、あるいは両方に対して、親 M P E R よりもより感受性であった。H I V - 1 J R 2 における L 6 6 9 A 突然変異は、2 F 5 および 4 E 1 0 m A b による中和に対して、それぞれ 5 0 倍および 4 5 倍より感受性であり、そして最も感受性を増進する突然変異の 1 つであった。これらの知見を現在のデータと合わせると、M P E R 中和抗体に対する E n v 感受性に非常に影響を及ぼす、M P E R の構造またはアクセス可能性などの、2 F 5 および 4 E 1 0 エピトープに共有される、何らかの共通の機構がありうると示唆される。

10

【 0 0 5 2 】

L 6 6 9 S 置換に関連する、M P E R 中和に対する H I V - 1 エンベロープ感受性増加の機構は、2 F 5 および 4 E 1 0 の中和機構に光を当て、そしてこれらのタイプの抗体を誘発する免疫原設計に関する重要な情報を提供するため、綿密な研究を行う正当な理由となる。

20

【 0 0 5 3 】

この突然変異が中和感受性を増加させうる多数の方式がある。まず、該突然変異は、E n v において劇的な変化を引き起こし、そしてウイルス粒子上の機能する E n v スパイクの発現レベルに影響を及ぼした可能性もあった。多数の他の中和剤を用いた中和アッセイによって、T N D _ 6 6 9 S エンベロープの中和感受性増加は、全般的な効果ではないことが示されたため、L 6 6 9 S 突然変異が、E n v 発現レベルの変化を通じて、中和感受性を増進する可能性は低い。第二に、この突然変異は、g p 4 1 の融合動力学を変化させた結果、融合プロセスをより緩慢にした可能性もあった。融合動力学が減少した E n v は、2 F 5 および 4 E 1 0 中和に対してより感受性であることが示されてきている (R e e v e s l a , J . V i r o l . 7 9 : 4 9 9 1 - 4 9 9 9 (2 0 0 5))。これは、T 2 0 に対する T N D _ 6 6 9 S エンベロープの感受性が、T N D _ 6 6 9 L エンベロープのもののわずか 3 倍であり、融合動力学が L 6 6 9 S 突然変異によってそれほどは変化しないことが示唆されるため、可能性が低い。第三に、L 6 6 9 S 突然変異自体が、2 F 5 エピトープに対する 2 F 5 m A b のより高いアビディティーの結合を生じる可能性がある。しかしこの仮説は、2 F 5 へのペプチド結合に関する表面プラズモン共鳴 (S P R) アッセイ結果によって裏付けられず、該アッセイでは、2 F 5 コンセンサス・ペプチド (コンセンサス 2 F 5 エピトープ配列を含有する) が 2 F 5 突然変異体ペプチド (L 6 6 9 S 突然変異を含有する) よりもわずかにより高いアビディティーで結合した。さらに、この仮説は、T N D _ 6 6 9 S エンベロープの 2 F 5 および 4 E 1 0 m A b の両方に対する感受性の増加が同様の倍率であることを説明不能である。第四に、L 6 6 9 S 突然変異は、E n v の劇的なコンホメーション変化を引き起こし、より「開いた」 M P E R 構造を生じ、そしてしたがって、2 F 5 および 4 E 1 0 をターゲティングする抗体のより容易なアクセスを可能にした可能性があった。この仮説は、T N D _ 6 6 9 S エンベロープの 2 F 5 および 4 E 1 0 m A b の両方に対する感受性の増加が同様の度合いであることを非常によく説明しうる。L 6 6 9 S 突然変異と関連する 4 4 7 - 5 2 D 感受性変化 (> 1 6 1 x) によって、コンホメーション変化が V 3 ループの変化もまた引き起こした可能性もあることが示唆される。M P E R をターゲティングする中和抗体に関する立体障害が多くのグループによって推測されてきている。いくつかの研究によって、2 F 5 および 4 E 1 0 間にありうる拮抗が観察されており (Z w i c k l a , J . V i r o l . 7

30

40

50

9 : 1 2 5 2 - 1 2 6 1 (2 0 0 5) 、 N e l s o n ら , J . V i r o l . 8 1 : 4 0 3 3 - 4 0 4 3 (2 0 0 7)) 、 空間の制限が、 H I V ウイルスの 2 F 5 および 4 E 1 0 中和に影響を及ぼす要因でありうることが示唆されている。興味深いことに、 2 F 5 エピトープを M L V E n v に挿入すると (O u ら , J . V i r o l . 8 0 : 2 5 3 9 - 2 5 4 7 (2 0 0 6)) 、 表面単位に 2 F 5 エピトープを持つ E n v が、 膜貫通単位に 2 F 5 エピトープを持つ E n v よりも、 2 F 5 中和に 10 倍以上より感受性である。さらに、 H I V E n v の V 1 、 V 2 、 V 4 領域内に 2 F 5 エピトープを移植すると、 やはり、 2 F 5 に対する g p 1 4 0 の結合が増加することが示され (J o y c e ら , J . B i o l . C h e m . 2 7 7 : 4 5 8 1 1 - 4 5 8 2 0 (2 0 0 2)) 、 そして H I V - 2 の M P E R への 2 F 5 および 4 E 1 0 エピトープの移植は、 2 F 5 / 4 E 1 0 中和感受性の実質的な増加に関連することが示されてきており (D e c k e r ら , t h e K e y s t o n e S y m p o s i u m o n H I V V a c c i n e s , K e y s t o n e R e s o r t , コロラド州キーストーン , 2 0 0 6 で提示) 、 これはおそらく、 エピトープ・アクセス可能性の改善によるものである。これらのデータは、 2 F 5 感受性に対するエピトープ・アクセス可能性の影響を反映した。 T N D _ 6 6 9 S の特性は、 ありうるより「開かれた」 M P E R 構造にしたがう。

【 0 0 5 4 】

T N D _ 6 6 9 S 単離体を用いて、 ワクチン接種によってまたは天然感染によって誘発された、 2 F 5 および 4 E 1 0 様抗体の存在を検出することも可能である (今日までの研究は、 H I V - 1 感染患者およびワクチンにおける 2 F 5 または 4 E 1 0 の検出に失敗している) 。 超感受性単離体は、 2 F 5 / 4 E 1 0 が、 天然感染またはワクチン接種中、 非常に低レベルで生成されるかどうかに関して、 非常に重要な情報を提供しうる。さらに、 T N D _ 6 6 9 S エンベロープが持つようである、 より曝露された M P E R の証明は、 ワクチン免疫原設計のための重要な適用を有する。

【 0 0 5 5 】

実施例 2

g p 4 1 M P E R ペプチド・リポソーム・コンジュゲートの説明 :

図 8 は、 合成リポソームにコンジュゲート化可能な H I V - 1 g p 4 1 M P E R ペプチド各々のアミノ酸配列を示す。 これらの配列が用いられてきているが、 7 つ組反復 2 (H R 2) 領域 (a a 6 3 7 - 6 8 3) の全体を含む、 より長い g p 4 1 配列、 ならびに H R 2 領域とともに H R 1 領域を含む、 より長い配列を用いてもよい (a a 5 4 9 - 6 0 2) 。 S P 6 2 ペプチドは、 2 F 5 m A b エピトープを提示し、 一方、 M P E R 6 5 6 ペプチドには、 2 F 5 および 4 E 1 0 m A b g p 4 1 エピトープ両方が含まれる (WO 2 0 0 8 / 1 2 7 6 5 1 を参照されたい) 。 M P E R ペプチド配列の 2 つの変異体には、 S P 6 2 - L 6 6 9 S および M P E R 6 5 6 - L 6 6 9 S が含まれる。 L 6 6 9 S 突然変異は、 自己および異種血清両方による中和に非常に感受性である、 慢性感染 H I V - 1 + 被験体から得られた H I V - 1 エンベロープ・クローン (T N D _ 6 6 9 S) において同定された (実施例 1 を参照されたい) 。 T N D _ 6 6 9 S は、 2 F 5 および 4 E 1 0 m A b の両方による中和に非常に感受性である (T N D _ 6 6 9 L に比較した際、 約 3 0 0 倍低い I C ₅₀ を伴う) (S h e n J . V i r o l o g y 8 3 : 3 6 1 7 - 2 5 (2 0 0 9)) 。 該突然変異は、 m A b 2 F 5 - ペプチド・リポソーム複合体 (S P 6 2 - L 6 6 9 S ペプチド・リポソーム) の有意により緩慢な解離速度を伴う、 より好ましい m A b 結合動力学を生じた。 S P 6 2 - リポソームのトリプトファン (W) 侵入深度分析によって、 L 6 6 9 S 置換がコア 2 F 5 および 4 E 1 0 エピトープの配向を改変可能であり、 そしてこれらを B 細胞認識によりアクセス可能にすることが示唆された。したがって、 S P 6 2 - L 6 6 9 S および M P E R 6 5 6 - L 6 6 9 S ペプチドを持つリポソームの両方の型における L 6 6 9 S 置換の使用は、 好ましく曝露されたコア M P E R 中和エピトープおよび免疫後の中和抗体誘導の潜在能力を持つ、 新規免疫原を提供する。

【 0 0 5 6 】

g p 4 1 M P E R ペプチド・アジュバント・コンジュゲートの説明

10

20

30

40

50

図9に示すT o l 1様受容体リガンドを、g p 4 1 M P E Rペプチド免疫原とともに、リポソーム型で配合した。図9に言及されるリガンドは、例のみであり、そしてT L Rアゴニストの他の型(T a k e d a ら, A n n u . R e v . I m m u n o l . , 2 1 : 3 3 5 - 3 7 6 (2 0 0 3))もまた、類似のリポソーム内に取り込み可能である。

【0057】

リピドAおよびR - 8 4 8含有M P E Rペプチド・リポソームの構築には、膜係留アミノ酸配列を有するM P E Rペプチドおよび合成脂質、1 - パルミトイ - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン(P O P C)、1 - パルミトイ - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン(P O P E)、1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - リン酸(D M P A)およびコレステロールを、それぞれ、0 . 2 1 6 、 4 5 . 0 0 、 2 5 . 0 0 、 2 0 . 0 0 および 1 . 3 3 のモル分率で同時可溶化する方法を利用した(A l a m ら, J . I m m u n o l . 1 7 8 : 4 4 2 4 - 4 4 3 5 (2 0 0 7))。適切な量のM P E Rペプチドをクロロホルム - メタノール混合物(7 : 3 v / v)中に溶解し、リピドAをクロロホルム中に溶解するかまたはR - 8 4 8をメタノール中に溶解し、適切な量のリン脂質のクロロホルムストックを窒素流中で乾燥させ、その後、一晩真空乾燥させた。押出し技術を用いて、リン酸緩衝生理食塩水(p H 7 . 4)中で、乾燥したペプチド - 脂質フィルムから、リポソームを作製した。

【0058】

オリゴ - C p G複合体化M P E Rペプチド・リポソームの構築には、P O P Cの代わりに、陽イオン性脂質、1 - パルミトイ - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン(P O E P C)を用いた。ペプチド免疫原を含有する陽イオン性リポソームを、望ましい用量に適した量のo C p Gストック溶液(1 m g / m l)と混合することによって、o C p Gのコンジュゲート化を行った。

【0059】

2 F 5 m A b の、ペプチド - リポソーム構築物中のそのエピトープに対する結合に関する表面プラズモン共鳴(S P R)アッセイによって、T L Rアジュバントの取り込みまたはコンジュゲート化が、H I V中和抗体2 F 5の結合に影響を及ぼさないことが明らかになった。両方のm A b 、2 F 5および4 E 1 0の強い結合が観察された。

【0060】

実施例3
M P E R中和m A b 、4 E 1 0および2 F 5の長いC D R H 3ループは、ビリオン膜脂質と相互作用すると仮定される疎水性面を有する(O f e k ら, J . V i r o l . 7 8 : 1 0 7 2 4 (2 0 0 4) ; C a r d o s o ら, I m m u n i t y 2 2 : 1 6 3 - 1 7 3 (2 0 0 5))。4 E 1 0(s c F v)および2 F 5(I g G)のC D R H 3突然変異体が構築されてきており(図13を参照されたい)、そして中和M P E R m A bの結合が経時的に起こり、そしてg p 4 1の融合前中間体状態への結合前に、ウイルス膜脂質へのm A bの結合によって開始されることが見出されてきている。4 E 1 0 s c F vは、名目(n o m i n a l)エピトープ・ペプチドおよび三量体g p 4 1融合中間体タンパク質の両方に強く結合するが、H I V - 1およびS I Vビリオンの両方に弱く結合し、そしてしたがって、4 E 1 0がウイルス膜脂質に結合するが、g p 4 1の融合前状態には結合しないことが示される。4 E 1 0のC D R H 3ループの疎水性面上の位でのアラニン置換(W 1 0 0 a / W 1 0 0 b / L 1 0 0 c A)は、g p 4 1エピトープへの同様の結合を示したが、同じ置換は、4 E 1 0がH I V - 1ウイルス膜に結合する能力を妨害した(図14)。g p 4 1中間体タンパク質に結合するが、H I V - 1ウイルス膜に結合しない、4 E 1 0 C D R H 3突然変異体は、H I V - 1中和に失敗した。同様に、H I V - 1ビリオンへの結合が妨害されるが、g p 4 1エピトープ・ペプチドへの結合が妨害されていない、2 F 5 C D R H 3突然変異体は、H I V - 1中和に失敗した(図14)。g p 4 1融合中間体タンパク質による4 E 1 0のH I V - 1中和活性の遮断によって、4 E 1 0がウイルス融合前g p 4 1に結合しないことがさらに示唆された。これら

10

20

30

40

50

の結果によって、中和M P E R m A b の結合が経時に起こり、そしてg p 4 1 の融合前中間体状態への結合前に、ウイルス膜脂質へのm A b の結合によって開始されるというモデルが裏付けられる。この結果の重要な暗示は、H I V - 1 膜が、4 E 1 0 および2 F 5 による結合および中和の、さらなる構造構成要素を構成することである。したがって、免疫原が4 E 1 0 および2 F 5 様抗体反応を誘導するには、脂質構成要素が必要である可能性もある。

【 0 0 6 1 】

したがって、この戦略は、B 細胞寛容を調節し、免疫原を反応性B 細胞サブセットにターゲティングし、そしてリン脂質およびg p 4 1 M P E R エピトープに結合する多重反応性B 細胞の誘導を可能にする潜在能力を有する。T L R リガンドと組み合わせて用いた際、リポソーム中のI F N - の送達は、自己反応性プール由来の、そしてg p 4 1 M P E R エピトープに対する望ましい特異性を持つB 細胞のT L R 依存性活性化を可能にする潜在能力を有する。

10

【 0 0 6 2 】

構築物の説明 :

H I V - 1 g p 4 1 M P E R ペプチド(図8)を、上に概略し、そして先に記載されるように(A l a m l a , J . I mm u n o l . 1 7 8 : 4 4 2 4 - 4 4 3 5 (2 0 0 7))、合成リポソームにコンジュゲート化してもよい。超音波処理したM P E R ペプチド - リポソームの各々を調製し、そして次いで可溶性I F N タンパク質と混合し、そして次いで、乾燥させ、そして再水和させて、サイトカインを被包してもよい。短時間ボルテックスした後、被包したI F N とともに再水和させたリポソームを30分間超遠心することによって、収集してもよい。第一の設計において、リポソームをo C p G (T L R 9)、M P L - A (T L R 4)またはR 8 4 8 (T L R 7 / 9)のいずれかにコンジュゲート化する(図11)。これらのアジュvant化リポソーム構築物各々を、図8に示す、列挙するM P E R ペプチド各々を用いて調製することも可能である。第二の設計を図12に示し、そしてこれには、複数のT L R リガンドが含まれ、T L R 9 + T L R 4 およびT L R 9 + T L R 7 / 8 が同じリポソーム内に取り込まれる。これらの構築物の設計は、T L R 誘発において相乗作用を提供し、そして多重反応性B 細胞を活性化する際に、T L R リガンドの強度を潜在的に増進することも可能である。

20

【 0 0 6 3 】

30

図10に記載するように、2 F 5 および4 E 1 0 m A b 結合のS P R 分析によって、アジュvant化リポソーム構築物上のM P E R エピトープ提示の評価を行ってもよい。

実施例 4

実験詳細

2 匹の免疫動物由来の代表的なデータによって、M P E R ペプチド・リポソームでの反復免疫後のM P E R 特異的抗体反応の誘導のためのプライム / ブースト戦略の適用を示す(図17を参照されたい)。動物を、交互に、そして定期的な間隔で、まずS P 6 2 リポソームで(4 x)、そして次いでE n v g p 1 4 0 (2 x)タンパク質で免疫した。最後の2回の免疫には、全長M P E R - 6 5 6 リポソームが含まれる(上記免疫原の説明を参照されたい)。示す配列を持つM P E R ペプチドへの結合のS P R 分析によって、免疫血清における結合反応を測定した。示す事後出血(post - b l e e d) 時点で、各免疫動物由来の出血試料を収集した。各M P E R 残基の单アミノ酸置換を含む、ビオチン化アラニン置換M P E R ペプチドを用いて、B I A c o r e A 1 0 0 上で、免疫血清のエピトープマッピングを行った。上部に円で囲んだ残基は、M P E R ペプチドへの結合に必要な非常に重要な残基(赤(下線)で示したものは、アラニン置換ペプチドへの結合に際して> 5 0 % 減少を伴う)を示す。青の残基(下線なし)は、関与の度合いがより低い残基を示す(結合の< 2 0 ~ 5 0 % の減少)。

40

【 0 0 6 4 】

結果

提示する実験データは、H I V - 1 エンベロープタンパク質のg p 4 1 上の中和エピト

50

ープをターゲティングする抗体の誘導における、設計されたM P E R リポソーム免疫原の適用を示す。該データは、構築されたM P E R ペプチド・リポソームがモルモットなどの小動物および非ヒト靈長類(N H P)で免疫原性であり、そして誘導される抗体反応が、
g p 4 1 M P E R 上のコア中和エピトープに特異的であることを示す。これらの研究はまた、M P E R 特異的反応増進における、そして2 F 5 コア残基D K Wを含むコア中和エピトープへの抗体反応の集束における、プライム・ブースト戦略の適用も示す。提示する免疫スキームにおいて、データは、最初の反応における、コアD K WのN末端にある残基から、後の時点で誘導されるコア中和エピトープの3つの残基すべて(D K W)を含む反応への結合エピトープのシフトを示す。M P E R リポソームでの最後の免疫は、広域中和m A b 2 F 5 のコアD K W残基への抗体反応の集束を生じた。これらのデータは、モルモット(図17)およびN H P(図18)のような実験動物におけるM P E R 特異的抗体誘導のための、リポソーム型M P E R 免疫原の設計の適用を示す。こうしたM P E R 免疫原設計は、ヒト試験の候補でありうる。

10

20

【0065】

実施例5

図18Aに示すように、M P E R 特異的結合反応は、g p 1 4 0 E n v タンパク質でのプライミング後には誘導されず、M P E R リポソームでのブースト後に誘導された。M P E R ペプチドへの結合反応は、g p 1 4 0 タンパク質での複数の免疫後には検出されなかつた。同じ動物をM P E R - 6 5 6 リポソームでブーストすると、2 F 5 名目エピトープ・ペプチドに特異的なM P E R 特異的反応が生じた。

【0066】

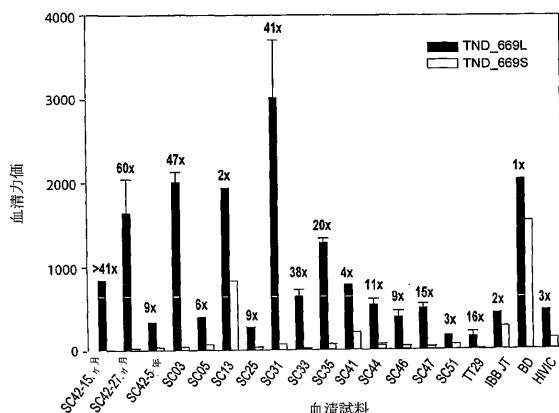
図18Bに示すように、抗体反応のエピトープマッピングは、中和2 F 5 コア残基D K Wへの反応の集束を示す。最初のより広域性である特異性は、3回目の免疫後、D K Wコア残基に集束した。

【0067】

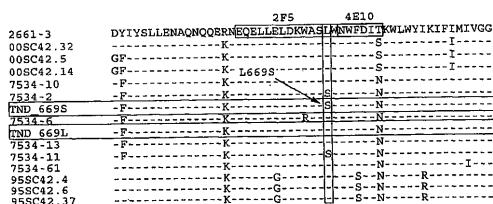
4つのN H P 免疫血清由来の結合データを示す。図17に記載するように、結合反応測定およびエピトープマッピング実験を行った。

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

〔 図 1 〕



〔 図 2 〕



〔 図 4 〕

図4A

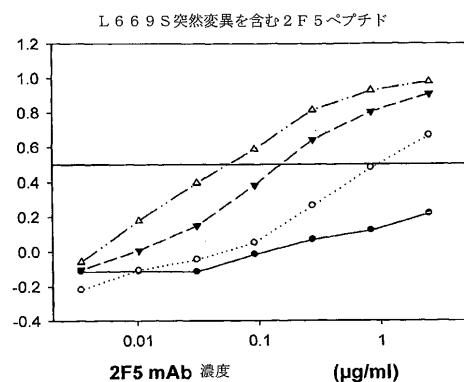


図4B

2F5 IC50 (μg/ml)		
ペプチド濃度	コンセンサス・ペプチド*	突然変異体ペプチド
30 μM	>2.5	>2.5
3 μM	>2.5	0.951
0.3 μM	0.911	0.153
0 μM	0.054	0.056

* 先に報告されている (参考文献 Shena ら、投稿中)

〔 図 3 〕

図3A

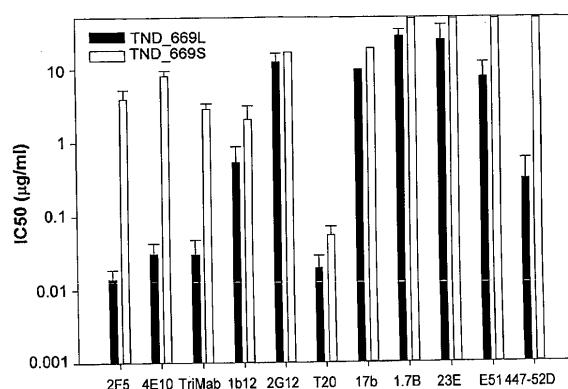
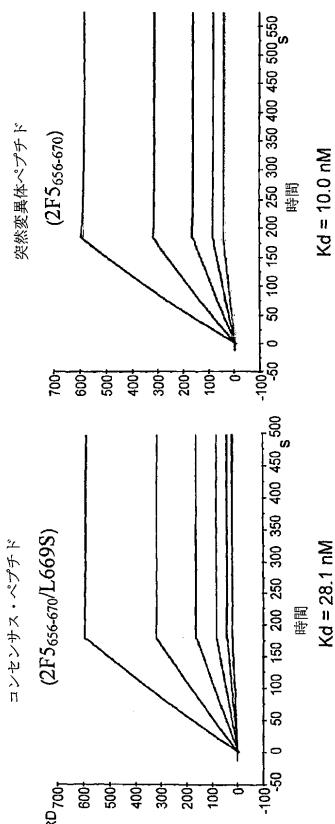


图 3 B

削除ターゲット/性質	TND_669S	TND_669L	
MPER	2F5	0.014	3.915
MPER	4E10	0.031	8.054
IgG1B12, 2G12, 2F5	Trmab	0.030	2.866
CD4 結合部位	1B12	0.53	2.06
グリセリン依存性	2G12	12.5	16.68
肥厚性阻害物質	T20	0.020	0.0545
CD4i	17b	9.73	19
CD4i: CCR5 結合部位	1.7B	27.5	>50 [*]
CD4i	23E	24.5	>50
CD4i: CCR5 結合部位	E51	7.6	>50
V3 ループ	447-52D	0.31	>50

(5)



5 A

〔 図 6 〕

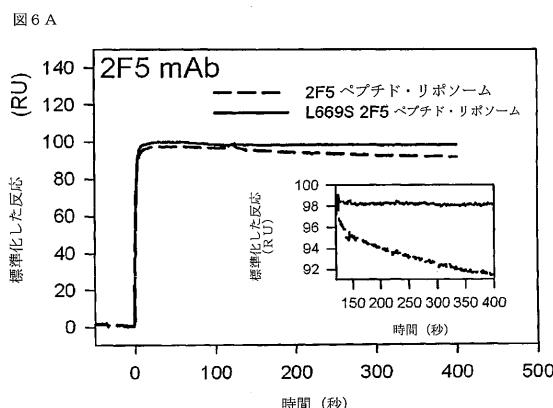
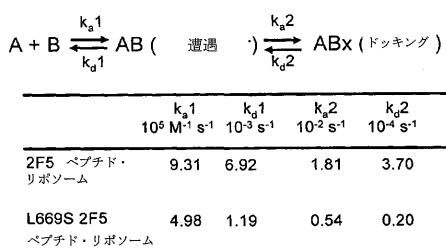
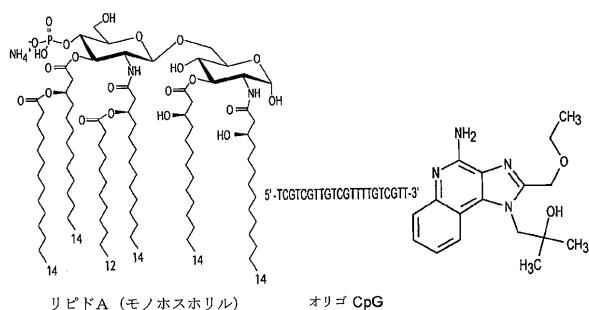


图 6 B

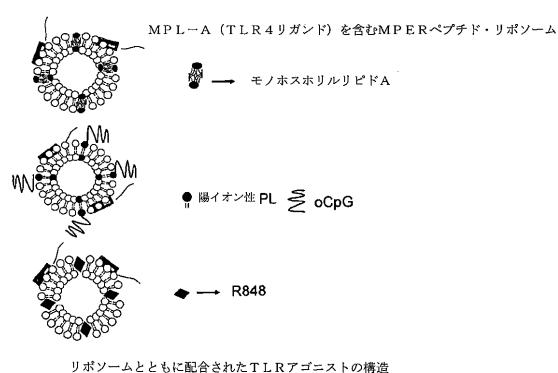


〔 図 9 〕



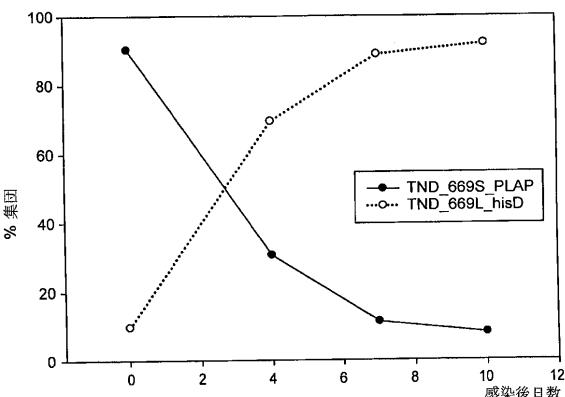
リピドA (モノエスホリル)

オリゴ CpG

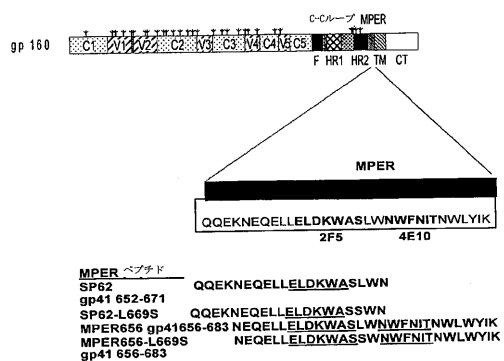


リボソームとともに配合されたTLRアゴニストの構造

〔 义 7 〕



〔 図 8 〕



スキーム1. 2つの広域中和抗体2F5および4E10のエピトープを含む
 HIV-1 g p 41 M PERペプチド。
 合成リボソームにコンジュゲート可能なg p 41 M PERペプチドのアミノ酸配列を示す。

【 図 1 0 】

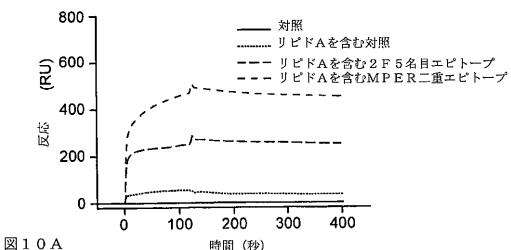
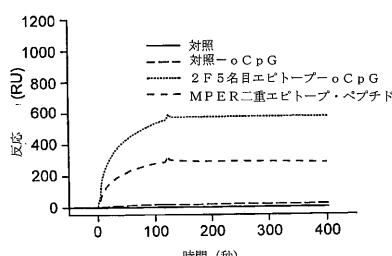
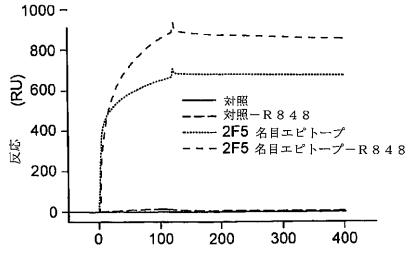


図10B

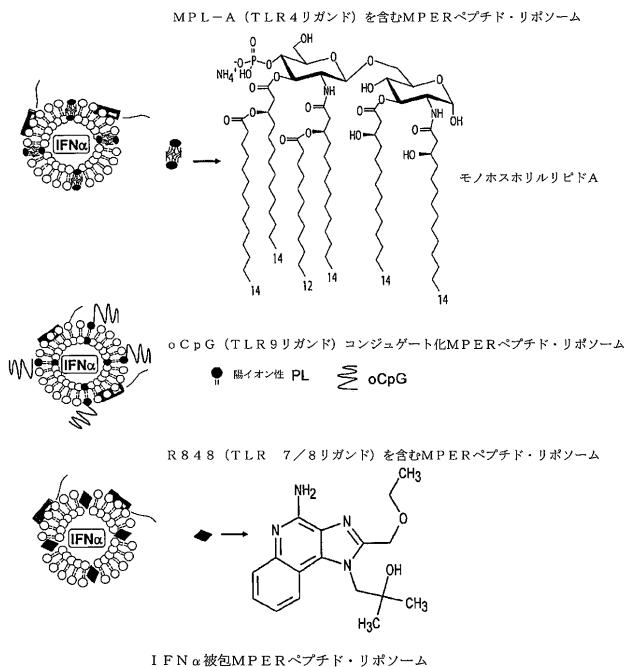


四百一

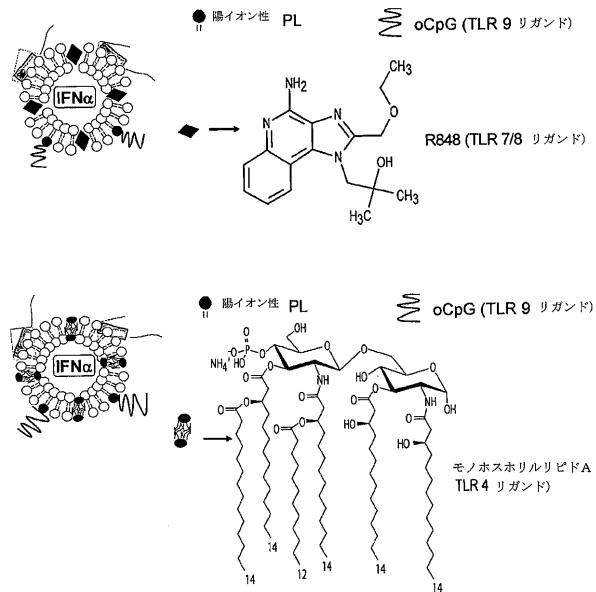


TLRアジュバントにコンジュゲート化されたMPERペプチド-リポソームと2F5 mAbの相互作用

【 111 】

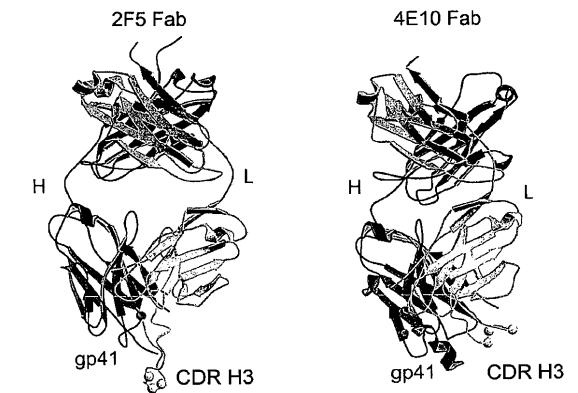


【 図 1 2 】



複数のT L Rリガンドを伴うI F N α 被包リポソーム。これらの構築物は、二重T L R誘発によって、B細胞反応において相乗作用を提供する潜在能力を有する。

【 図 1 3 】



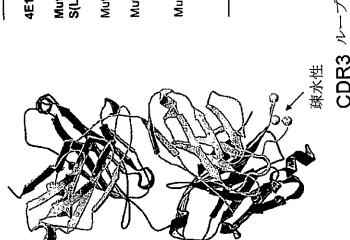
突然変異体: 2F5-mut1 rIgG L100aA 突然変異体: 4E10-mut1 scFv W100A
 2F5-mut2 rIgG F100bA 4E10-mut2 scFv F100bA
 2F5-mut3 rIgG L100aA/100bB 4E10-mut3 scFv W100A/W100bA/L100cA
 2F5-mut4 rIgG R95A 4E10-mut4 scFv 156A/S94R

2F5 (Ofelekら, 2004, *J. Virol.*, 78:10724) および4E10 (Cardosoら, 2005, *Immunity*, 22:163-173) の結晶構造、ならびに脂質およびHIV-1ウイルス膜への結合を排除するためのCDR H3ループ中の突然変異設計。

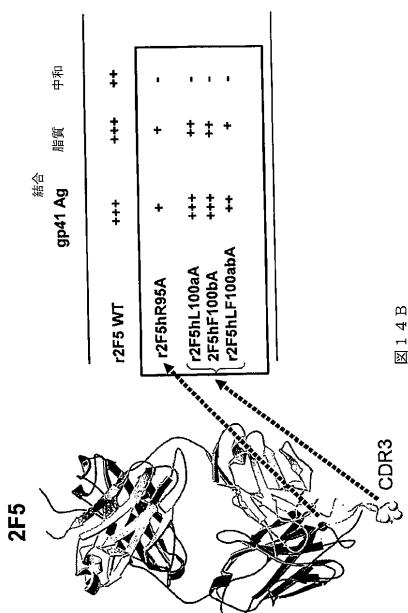
【図14A】

中和	ウイルス膜	SP41 中脳体	SP41 組合 ペプチド	SP41
+++	+++	+++	+++	+++
+	+	++	+++	++
++	++	++	+	++
++	++	++	-	-
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-

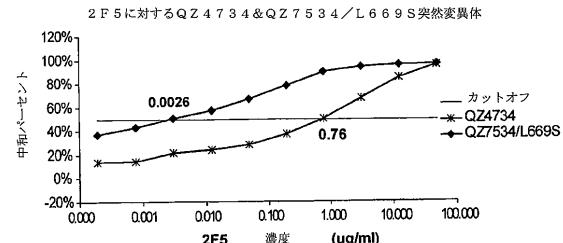
14A



【 义 1 4 B 】

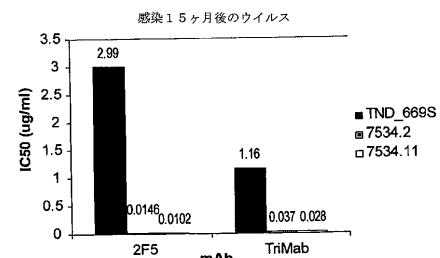


【 図 15 】



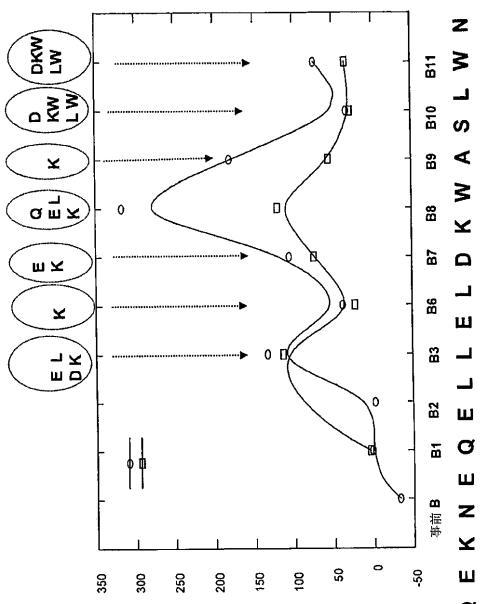
2F5 mAb による QZ4734 および QZ4734/L669S 偽型化ウイルスの中和 (TZM-1 細胞に対して試験) QZ4734/L669S 単一アミノ酸置換を導入することによって、QZ4734/L669S を生成した。曲線脳の被覆値は IC50 値を示す。

(16)



2F5およびTriMab (2F5, 4E10および2G12の1:1:1の組み合わせ)による、TNND-669Sおよび同じ血漿試料 (感染後15ヶ月) から単離された2つの他のTZM-1b細胞に対して試験を行った。

〔 四 17 〕



PPER (膜近位外部領域) リボンマー免疫原で免疫したモルモットにおける、gp 41 MPER特異的抗体反応の誘導。

【 18 】

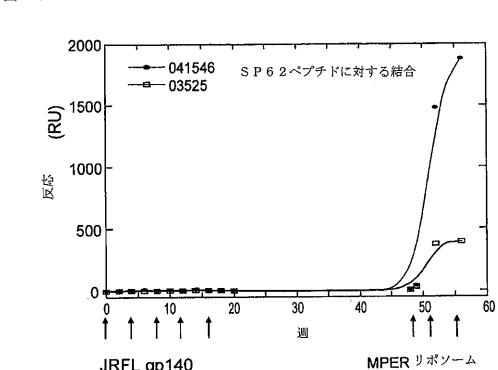
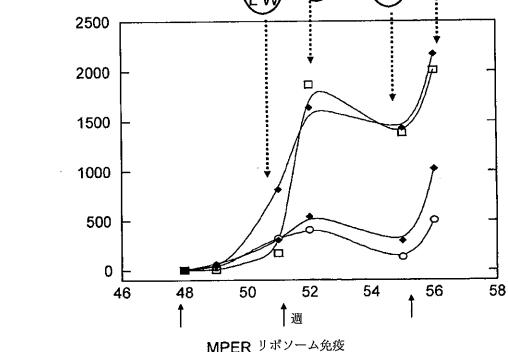


図18B



MEPR(膜近位外部領域)リポソーム免疫原で免疫した非ヒト靈長類(NHP)における、
g p 41 MEPR特異的抗体反応の説明。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2010/001017
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 38/16(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, A61P 31/18(2006.01)i, A61P 31/12(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38/16; A61K 39/385; A61P 31/18; A61K 48/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), PubMed, Google		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0031890 A1 (Haynes B.F., et al.) 07 February 2008 See abstract, [0046], [0048], [0087]~[0088] and claims	22-23
A	US 2009-0035360 A1 (Lemoine D.I.) 05 February 2009 See abstract and claims	22-23
A	US 2006-0089326 A1 (Krieg, A.M., et al.) 27 April 2006 See abstract and claims	22-23
A	Huarte N., et al. 'The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 4E10 monoclonal antibody is better adapted to membrane-bound epitope recognition and blocking than 2F5' J Virol., 02 July 2008(Epub.), Vol. 82(18), pp 8986-8996 See entire document	22-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <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 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> <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>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 17 JANUARY 2011 (17.01.2011)	Date of mailing of the international search report 18 JANUARY 2011 (18.01.2011)	
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer PARK, JEONG UNG Telephone No. 82-42-481-8131 	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/001017

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.: 1-21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-21 pertain to methods for treatment of the human by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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 SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2010/001017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008-0031890 A1	07.02.2008	AU 2006-235507 A1 AU 2008-239628 A1 CA 2604683-A1 CA 2683752-A1 CN 101588813 A EP 1868651 A2 EP 2139516 A1 JP 2010-523676 A US 2008-0057075 A1 US 2010-028415 A1 WO 2006-110831 A2 WO 2006-110831 A3 WO 2006-110831 A3 WO 2008-127651 A1	19.10.2006 23.10.2008 19.10.2006 23.10.2008 25.11.2009 26.12.2007 06.01.2010 15.07.2010 06.03.2008 04.02.2010 19.10.2006 04.06.2009 19.10.2006 23.10.2008
US 2009-0035360 A1	05.02.2009	None	
US 2006-0089326 A1	27.04.2006	AU 1995-19127 B2 CA 2194761 C CA 2194761-A1 CA 2560114-A1 CN 100338086 CO CN 101265285 A CN 101265285 CO CN 1235609 A0 EP 0772619 A1 EP 0772619 B1 EP 0772619 B2 EP 0948510 A1 EP 0948510 B1 EP 1167377 A2 EP 1167377 A3 EP 1167377 B1 EP 1167378 A2 EP 1167378 A3 EP 1167379 A2 EP 1167379 A3 EP 1714969 A2 EP 1714969 A3 EP 1746159 A2 EP 1746159 A3 JP 03-468773 B2 JP 04-126252 B2 JP 10-506265 A JP 2001-503267 A JP 2003-144184 A JP 2003-286174 A JP 2004-024261 A JP 2004-041224 A	18.11.1999 19.12.2006 01.02.1996 01.02.1996 19.09.2007 17.09.2008 17.09.2008 17.11.1999 29.12.2004 07.06.2006 08.12.2010 01.10.2003 12.07.2006 02.01.2002 08.09.2004 07.01.2009 02.01.2002 17.08.2005 02.01.2002 08.09.2004 25.10.2006 03.03.2010 24.01.2007 25.11.2009 05.09.2003 30.07.2008 23.06.1998 13.03.2001 20.05.2003 07.10.2003 29.01.2004 12.02.2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/001017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 2004-043466 A	12.02.2004
		JP 2004-215670 A	05.08.2004
		JP 2008-169216 A	24.07.2008
		JP 2008-289495 A	04.12.2008
		JP 2009-148296 A	09.07.2009
		JP 2010-150280 A	08.07.2010
		KR 10-0689942 B1	09.03.2007
		US 2003-0026782 A1	06.02.2003
		US 2003-0050261 A1	13.03.2003
		US 2003-0050263 A1	13.03.2003
		US 2003-0053229 A1	20.03.2003
		US 2003-0100527 A1	29.05.2003
		US 2003-050261 A1	13.03.2003
		US 2004-0087534 A1	06.05.2004
		US 2004-0087538 A1	06.05.2004
		US 2004-0106568 A1	03.06.2004
		US 2004-0132685 A1	08.07.2004
		US 2004-0142469 A1	22.07.2004
		US 2004-0143112 A1	22.07.2004
		US 2004-0147468 A1	29.07.2004
		US 2004-0152656 A1	05.08.2004
		US 2004-0152657 A1	05.08.2004
		US 2004-0162258 A1	19.08.2004
		US 2004-0162262 A1	19.08.2004
		US 2004-0167089 A1	26.08.2004
		US 2004-0171150 A1	02.09.2004
		US 2004-0181045 A1	16.09.2004
		US 2004-0198688 A1	07.10.2004
		US 2004-0229835 A1	18.11.2004
		US 2004-132685 A1	08.07.2004
		US 2004-147468 A1	29.07.2004
		US 2004-167089 A1	26.08.2004
		US 2004-198688 A1	07.10.2004
		US 2004-229835 A1	18.11.2004
		US 2005-0004061 A1	06.01.2005
		US 2005-0004062 A1	06.01.2005
		US 2005-0009774 A1	13.01.2005
		US 2005-0032736 A1	10.02.2005
		US 2005-0037403 A1	17.02.2005
		US 2005-0037985 A1	17.02.2005
		US 2005-004061 A1	06.01.2005
		US 2005-0049215 A1	03.03.2005
		US 2005-0049216 A1	03.03.2005
		US 2005-0054602 A1	10.03.2005
		US 2005-0059625 A1	17.03.2005
		US 2005-0070491 A1	31.03.2005
		US 2005-0101554 A1	12.05.2005
		US 2005-0101557 A1	12.05.2005
		US 2005-0123523 A1	09.06.2005
		US 2005-0171047 A1	04.08.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/001017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2005-0182017 A1	18.08.2005
		US 2005-0215500 A1	29.09.2005
		US 2005-0233995 A1	20.10.2005
		US 2005-0233999 A1	20.10.2005
		US 2005-0239732 A1	27.10.2005
		US 2005-0239736 A1	27.10.2005
		US 2005-0244379 A1	03.11.2005
		US 2005-0244380 A1	03.11.2005
		US 2005-0245477 A1	03.11.2005
		US 2005-0267057 A1	01.12.2005
		US 2005-0267064 A1	01.12.2005
		US 2005-0277604 A1	15.12.2005
		US 2005-0277609 A1	15.12.2005
		US 2005-032736 A1	10.02.2005
		US 2005-049215 A1	03.03.2005
		US 2005-049216 A1	03.03.2005
		US 2005-054602 A1	10.03.2005
		US 2005-059625 A1	17.03.2005
		US 2005-070491 A1	31.03.2005
		US 2005-123523 A1	09.06.2005
		US 2005-148537 A1	07.07.2005
		US 2005-171047 A1	04.08.2005
		US 2005-215500 A1	29.09.2005
		US 2005-233995 A1	20.10.2005
		US 2005-233999 A1	20.10.2005
		US 2005-239732 A1	27.10.2005
		US 2005-267064 A1	01.12.2005
		US 2005-277604 A1	15.12.2005
		US 2006-0003955 A1	05.01.2006
		US 2006-003955 A1	05.01.2006
		US 2006-0058251 A1	16.03.2006
		US 2006-0094683 A1	04.05.2006
		US 2006-089326 A1	27.04.2006
		US 2007-0009482 A9	11.01.2007
		US 2007-0010470 A9	11.01.2007
		US 2007-0065467 A1	22.03.2007
		US 2007-0066553 A1	22.03.2007
		US 2007-0078104 A1	05.04.2007
		US 2007-0202128 A1	30.08.2007
		US 2007-066553 A1	22.03.2007
		US 2008-0031936 A1	07.02.2008
		US 2008-0260111 A1	31.01.2008
		US 2008-031936 A1	07.02.2008
		US 2009-202575 A1	13.08.2009
		US 2010-125101 A1	20.05.2010
		US 6008200W D	28.12.1999
		US 6194388 B1	27.02.2001
		US 6207646 B1	27.03.2001
		US 6239116 B1	29.05.2001
		US 6429199 B1	06.08.2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/001017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 6653292 B1	25.11.2003
		US 7223741 B2	29.05.2007
		US 7402572 B2	22.07.2008
		US 7517861 B2	14.04.2009
		US 7524828 B2	28.04.2009
		US 7674777 B2	09.03.2010
		US 7723022 B2	25.05.2010
		US 7723500 B2	25.05.2010
		WO 96-02555 A1	01.02.1996
		WO 98-18810 A1	07.05.1998

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/26	(2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K 47/22	(2006.01)	A 6 1 K 47/22
A 6 1 K 47/24	(2006.01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04
C 0 7 K 7/00	(2006.01)	C 0 7 K 7/00 Z N A
C 0 7 K 14/00	(2006.01)	C 0 7 K 14/00

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

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 アラム,エス・ムニール

アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27710,ダーラム,デューク ユニバーシティ

(72)発明者 ヘインズ,バートン・エフ

アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27710,ダーラム,デューク ユニバーシティ

(72)発明者 セカラン,モーゼス・ディー

アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27710,ダーラム,デューク ユニバーシティ

(72)発明者 トマラス,ジョージア

アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27710,ダーラム,デューク ユニバーシティ

(72)発明者 シエン,シャオイーン

アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27710,ダーラム,デューク ユニバーシティ

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA95 BB13 BB15 BB16 BB25 BB29 BB30 CC06 CC35

CC41 DD60H DD60N DD63H DD63N DD68H DD68N DD70H DD70N FF34

FF66 GG44

4C084 AA02 AA03 BA44 CA01 DA22 MA02 MA05 MA24 MA66 NA13

ZB052 ZB332 ZC552

4C085 AA03 AA38 BA69 BB11 CC08 CC21 DD86 EE01 EE03 EE06

FF12 FF14 FF21 FF24 GG02 GG03 GG04 GG06 GG10

4H045 AA30 BA14 BA15 BA16 BA17 DA86 EA20 FA20 FA74