

(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2010-540674

(P2010-540674A)

(43) 公表日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 92 頁)

(21) 出願番号	特願2010-528318 (P2010-528318)	(71) 出願人	510098113
(86) (22) 出願日	平成20年10月9日 (2008.10.9)		テクノロジー インテグレール リミティ ド
(85) 翻訳文提出日	平成22年6月8日 (2010.6.8)		イギリス国, アイエム8 1アールディー アイル オブ マン, ラムゼイ, ウォー ター ストリート, マソニック ビルディ ングス
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/008544	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02009/046984		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成21年4月16日 (2009.4.16)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	60/978,536		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成19年10月9日 (2007.10.9)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H I V特異抗体に基づくH I V予防ワクチン

(57) 【要約】

本発明は、H I Vによる感染を予防する及び／又は個体におけるH I V感染症の進行を予防する、H I Vワクチンの製造方法に関する。特に本発明は、抗レトロウイルス療法後に選択された存在するH I V - 亜型及び変異体に結合する、個体における免疫応答としてのH I V特異抗体の形成を提供する。本発明は、実質的に全てのH I V - アイソフォームを認識しかつ結合することが可能であるH I V特異抗体にも関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

感染症を予防する H I V - ワクチンを製造する方法であって、

i) H I V - 1 亜型 A 又は B に感染した多数の個体から得られた B - リンパ球で発現されるモノクローナル抗体のファージミドライブラリーを作製する工程、

ii) 未変性の又は組換 H I V - 1 ペプチドパンニングにより、抗体ファージミドライブラリーを濃厚化する工程、

iii) 支持体に結合された H I V - 1 ファージミドライブラリーを使用するリバースパンニング手法により、H I V - 1 ペプチド / ポリペプチド / タンパク質材料を収集する工程、

iv) 工程 iii) において得られたペプチドの材料の同定及び特徴決定の工程、並びに

v) 発現システムにおけるグリコシル化された組換 H I V - 1 e n v ペプチドの作出において、工程 iv) の結果を使用する工程、

(vi) 組換 H I V - 1 e n v ペプチドを精製し、かつワクチン組成物を製造する工程を含んでなる方法。

【請求項 2】

前記 H I V 材料が得られる個体が、同一又は異なる H I V 亜型に感染されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ウイルス材料が得られる個体が、抗レトロウイルス療法ナীব患者又は抗レトロウイルス療法が施された患者である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

得られるウイルス材料が、支持体に接触される前に増幅される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

種々の異なる H I V 特異抗体及び / 又は抗体断片を保有する支持体が、ファージミドライブラリー、ペプチドマイクロチップ、又は細菌ライブラリーから選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

ファージミドライブラリーが：

a) H I V に感染した多数の個体から得られた B - リンパ球において発現された免疫グロブリンの、各々、軽鎖及び重鎖の可変領域をコードする核酸由来の D N A - 断片を調製する工程；

b) 免疫グロブリン軽鎖及び重鎖をコードする D N A - 断片を連結し、免疫グロブリンの、各々、軽鎖及び重鎖の可変領域を含むポリペプチドの発現を可能にし、多数の異なる特異性を作製する工程；

c) ファージミドベクター内の連結された断片をクローニングし、かつバクテリオファージの表面上での発現のために細菌株を形質転換する工程により調製される、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

工程 a) における D N A 断片の調製が、抗レトロウイルス療法により治療された及び / 又はされない H I V - 1 亜型 A 及び B 感染患者の B - リンパ球から得られた R N A - プールからの c D N A の調製、並びに軽鎖及び重鎖の可変領域の増幅を含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記増幅が、表 1 ~ 7 に列記されたプライマーの組合せのいずれかにより実行される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

得られた s c F v ファージミド組換抗体が、H A A R T - 又は任意の他の抗レトロウイルス療法を経験した患者において実行された抵抗性 H I V 変異株に対し特異性がある、請

10

20

30

40

50

求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

工程 i) が、異なるドナーから単離された組換え gp120 -、gp41 - 及び未変性の HIV - ポリペプチドによる、HIV - 特異抗体を結合するパンニング手法における抗体の ScFv 断片を提示しているファージミドライブラリーの濃厚化を更に含む、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

工程 (iii) における、HIV - 1 env ペプチド / ポリペプチド / タンパク質の単離が、発明されたりバースパンニング技術を用いて実行される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

工程 iv) における、LC 質量分析が、HIV - 1 gp120 及びその標準断片及び可変断片の定量分析、同定及び配列決定のために適用される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

工程 v) が、真核生物グリコシル化を伴う好適な宿主において、組換え HIV - 1 ペプチド / ポリペプチド / タンパク質を作製する工程を更に含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

任意の免疫原性刺激因子、アジュバント又は担体の添加 / 複合により、HIV 予防ワクチン組成物を調製することに関与している、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

組換え gp41 及び gp120 HIV - 1 亜型 A 及び B env ペプチド / ポリペプチド / タンパク質を含有する、請求項 13 記載の HIV ワクチン。

【請求項 16】

立体的に安定化されたりボソーム (SSL) 又はピロソーム及びそれらの可能な変種を、アジュバント - 担体として更に含有する、請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の HIV ワクチン。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法により取得し得る HIV 予防ワクチン。

【請求項 18】

請求項 16 記載の HIV ワクチンの使用であって、HIV 感染症及び AIDS 疾患の罹患及び発症に対し、未感染の個体を免疫化するための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HIV による感染を予防する及び / 又は個体における HIV 感染症の進行を予防する、HIV ワクチンの製造方法に関する。特に本発明は、抗レトロウイルス療法後に選択された存在する HIV - 亜型及び変異体に結合する、個体における免疫応答としての HIV 特異抗体の形成を提供する。本発明は、実質的に全ての HIV - アイソフォームを認識しかつ結合することが可能である HIV 特異抗体にも関する。

【背景技術】

【0002】

1 型ヒト免疫不全ウイルス (HIV - 1) は、ウイルス複製時に生じる変異の蓄積により引き起こされ、更に組換え事象によっても引き起こされる、顕著な遺伝子変動性により特徴づけられる [1, 18, 24]。HIV 治療の化学療法の失敗は、この HIV - 1 ウイルス株の高度な変異原性の活性が原因である [8]。種々のコースの抗レトロウイルス療法後の患者において、及び更には複合療法 (HAART) 後の患者においてであっても、耐性ウイルス変異株が迅速に生じることが早くに示された。これらの耐性ウイルスは、それらのタンパク質の高次構造及び構造に特異的变化を有する。通常 HIV - 1 が現在の治療から逃れることに寄与するそのような変異は、治療条件下での選択の結果として保存され (saved) かつ蓄積される。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

抗 - H I V - 1 医薬品による治療は、ウイルス複製を完全には停止せず、このことは予め存在する耐性変異の選択及び蓄積、並びに新たな変異の発生及び蓄積を可能にし、その結果ウイルス生存の新たな入口を生じる。従って現存する抗レトロウイルス調製品 (N R T I、N N R T I、プロテアーゼインヒビター、融合インヒビター、更には H A A R T のような種々の薬剤の混合物) は全て、耐性ウイルス株が生じかつ繁殖するまで、多少延長された期間にわたり H I V - 1 複製を遅くすることができるのみである [7]。一般的抗 - H I V 治療に耐える広く蔓延している H I V - 1 耐性変異株は、特に H I V - 感染した患者が通常抗レトロウイルス療法を受ける開発途上国において、重大な問題となり始めている [8]。

10

【 0 0 0 4 】

H I V 研究の 2 5 年の歴史にわたり、H I V 免疫療法用のワクチン開発の数種のアプローチが提唱され、かつそれらの実践的結果が検証された。これらのアプローチは、ワクチン活性成分、それらの作用機序及びそのワクチンの製造法に従い、以下のように分類することができる：

- 1 型：モノクローナル H I V - 特異抗体 - ベースの H I V / A I D S ワクチン、
- 2 型：H I V 粒子破壊 - ベースのワクチン、
- 3 型：H I V - ペプチド - ベースのワクチン、及び
- 4 型：H I V ペプチドの遺伝子をコードする D N A プラスミド又はウイルス (アデノ - 、アデノ随伴、鶏痘、ワクシニアなど) ベクターワクチン。

20

【 0 0 0 5 】

- 1 型：モノクローナル H I V - 特異抗体 - ベースの H I V / A I D S 治療用ワクチン、中でも m A b としての中和抗体、又は 2 ~ 3 種の H I V - 中和 m A b のカクテル [5, 14, 28]

H I V 感染機構について最初に発見されたことは、C D 4 受容体並びに C C R 5 及び C X C R 4 共受容体を介した、リンパ球又は他の宿主細胞へのその侵入方法であった。次に H I V エンベロープタンパク質構造が研究され (図 1 0 a - b)、g p 1 2 0 ループの 3 D の変動性並びに C D 4 及び共受容体の識別及び吸着のための g p 1 2 0 - g p 4 1 複合体形成の重要な役割が基本原則として設定された。ウイルス e n v タンパク質を見つけ、H I V 細胞侵入に寄与するそれらのエピトープに結合し、又は C D 4 受容体及び共受容体上の各ドメイン若しくはエピトープに結合し、その結果段階的 H I V 感染プロセス若しくは細胞結合を妨害すると理解されるモノクローナル抗体は、H I V 中和抗体と称された。

30

【 0 0 0 6 】

抗体 - ベースのワクチン開発における大きい問題点は、H I V 遺伝子変動性によっても引き起こされ、これは、一部の H I V 抗原により誘発された組換抗体は、H I V - 1 の異なる単離体を中和することが不可能であるということである。免疫化により誘発された抗 - H I V - 1 モノクローナル抗体の大部分は、貧弱な交差 - 中和活性を有するか又はこれを有さず、かつ典型的には、変異のためにウイルス毎に異なるか又は感染性ビリオンの表面に余り露出されていないかのいずれかである決定基に結合する。中和 m A b のいくつかの異形が作出されたが、その後臨床試験が、エンベロープタンパク質 g p 1 2 0 及び g p 4 1 に対する中和抗体をベースにしたワクチンは、標的 H I V タンパク質の表面エピトープの変動性及び変化という同じ理由により、1 ~ 2 ヶ月以内に働きを停止する (稀に、これらが開始時から働く場合) ことを示した。

40

【 0 0 0 7 】

説明されたワクチン開発アプローチの欠点は、動物の免疫化のためのウイルス抗原のどちらかの抗体のモノクローナル性の選択である。ウイルス標的 - タンパク質の種々の変種に特異的な中和抗体のパネルが作製されるような場合であっても、各 m A b は、細菌システムにおける組換モノクローンとして作製される。更に原核生物の組換抗体はそれらの抗原に対する親和性が、動物又はヒトの血清中の未変性の A b と比べ、少なくとも 1 0 倍低

50

い。動物において誘発されたポリクローナルH I V - 特異的免疫グロブリンは通常、ヒトなどの種々の生物について免疫毒性である。それらを、診断目的に使用することは可能であるが、アナフィラキシー反応の発生機会の多さは、それらの免疫療法適用に関する当然の制約である。ハイブリドーマm A b作製技術は、免疫グロブリンにおける生物学的種の差異の問題点を解決しない。ヒト化m A b又はキメラm A bの作製技術は、非常に面倒であり、かなり時間がかかりかつ費用もかかる。従ってこの技術により、抗 - H I V 免疫療法のための数十又は数百のm A b異形を作製することは不可能である。

【 0 0 0 8 】

2 型：H I V 粒子破壊 - ベースのワクチン[9, 20]。天然のH I V ビリオン及びH I V ペプチドを使用する発想は、15年以上前に明らかにされ、かついくつかの形で生まれ変わった。中でも、小型ウイルスにとって致死的であるが、ペプチド結合及びタンパク質の高次構造に対する破壊作用が比較的低いことが周知である、 α - プロピオラクトン、ソラレン又は類似物質による、H I V 粒子の感染性活性の保存が発想された。超遠心分離法による患者の血流由来の未変性ウイルスの濃縮は、一部の免疫化に適用可能なウイルス量を生じることができないことが急速に明らかになり始め、これはかろうじて研究分析のために若干の材料を送達することができる。そのため、この種のワクチンの実際上の変形は、実験室株のインビトロ感染培養、又は初代単離株の感染及びそれらのドナーリンパ球との培養のいずれかである。両方の場合において、免疫化後のH I V タンパク質の免疫応答形成に必要な大量のウイルス粒子を提供するための、数百リットルの発酵槽中での大規模生成が唱えられている。

10

20

【 0 0 0 9 】

この発想それ自身は完全に悪くはなく、これは他の3種のワクチン型の以前には利点さえ有する。第一に、免疫化のための不活化されたウイルス粒子使用の安全性は、ショ糖ピロー(pillow)勾配における超遠心分離後に、H I V R N A コピーの実時間定量を試みる場合に、より自明のものとなる。ウイルスR N A は大部分、小片に崩壊され、かつショ糖勾配における濃縮後に得られたH I V ビリオン又はそれらのタンパク質の実濃度よりも、 $10^4 \sim 10^5$ より低い数のレベルへと破壊される。第二に、未変性ウイルスタンパク質の獲得は、現存する種々のH I V e n v タンパク質エピトープを対象とする見込みがよりあるように見える。しかしこの最後の説明は、この種のワクチンが働かない真の理由である。

30

【 0 0 1 0 】

H I V 粒子破壊 - ベースのワクチン開発は、遺伝子変異選択のインビトロ条件が、動物又はヒト生物における同じプロセスの境界からどの程度異なるかの最良の例である。ウイルスペプチドの分析は、異なるウイルス亜型にのみではなく、同じ患者から単離されたウイルス変異株にさえも特異的である、抗原エピトープの高い変動性を明らかにした。しかし全ての実験室株、中でも高度に感染性のB I I I のA 4 5 5 は、e n v ペプチドの配列の一定でありかつより均質な組成を有する。実験室H I V 株に関して質量分析法又は3 D 構造的方法により分析されたe n v ペプチドライブラリーの多様性は、単独の一患者から採取した同等物から最大5%である。同じ傾向が、ドナー血液リンパ球又はC D 4、C C R 5 若しくはC X C R 4 - 有するヒト細胞培養物とインビトロで共培養された初代H I V 単離株について認められる。これは、ウイルスのインビトロ感染に関する選択条件は、生物における天然のウイルス複製及びビリオン形成プロセスとは非常に異なり、ヒト生物におけるウイルス生存率(survivorship)に関するゲートは、インビトロ培養時よりも95%より広いことを意味する。従って大規模インビトロ生成後の不活化ウイルス粒子を使用し抗 - H I V ワクチンを調製する全ての試みは失敗し、更には実験室H I V 株から供給されたペプチド - ベースのワクチンも失敗した。

40

【 0 0 1 1 】

3 型：H I V - ペプチド - ベースのワクチン[3, 6, 13, 15, 27, 33, 36]。この最新型のワクチンは、小型のH I V ペプチド、受容体認識及び感染活性に寄与するウイルスタンパク質のより大きいH I V タンパク質偽エピトープの複数の小さい15 ~ 20個のアミノ

50

酸断片、これらの小型ペプチドのパネルを含む。小さいレンチウイルスファミリーのメンバーとして、H I Vは、小数のペプチド（合計18）からなり、H I Vペプチドワクチンの大部分は、g p 1 2 0（g p 1 4 0、g p 1 6 0）又はg p 1 2 0及びg p 4 1の両方のe n vタンパク質の断片を含有し、残りは、維持が困難な(little easy-to-maintain)マトリックスペプチド及びp 2 4断片を含む。このクラスの他の部分は、H I V生活環に関して天然の提供されたグリコシル化により酵母において生成された完全長e n vペプチド若しくはそれらの大型断片、又はいわゆる糖質 - ベースのH I Vワクチンである。H I Vペプチドワクチンの一部は、治療的免疫化が意図され、一部は、予防活性を有することが言明されている。

【0012】

しかしこれまで組換H I Vペプチドのカクテルも合成15～20個アミノ酸ペプチドのカクテルも、ウイルス感染及び複製からの防御を提供することができなかった。その主な理由は、どのようにこれらのペプチドが得られたかの原理の分析から明らかにすることができる。組換ペプチド配列は、長いT a q - ポリメラーゼP C R（通常1000～3000bp）により増幅されたH I Vゲノム断片のステージを含む、患者由来のウイルス材料からのR T - P C Rにより得られた試料の、又はH I V - 特異的プライマーP C R後の患者のリンパ球由来のD N Aの配列の自動D N A配列決定の技術、その後の形質転換された大腸菌株コロニーの選択により作製される。現在の技術は、高くないとして平均で多様な変種 $10^5 \sim 10^6$ から1配列ケースの頻度での、ランダム様式のH I V遺伝子型のモノクローナル選択を基礎としており、それから平均感染性ウイルス力価は1%であり、そのためこれは感染活性のあるウイルスの $10^3 \sim 10^4$ コピーである。1個体の患者血液の同じ試料からこの技術で作製された二つの配列の完全なH I Vゲノムのデータは、劇的に異なることは、H I Vゲノム配列を作製しそれら自身を分析する研究者には周知である。従ってこれらの組換ペプチド又は3～4種の組換ペプチドのカクテルによる免疫化は、例え真核生物発現システムにおいて適切にグリコシル化された（糖鎖付加された(carbohydrated)）としても、現在対処されるべきウイルス変異株の不活化に特異的な免疫応答の形成を提供することはできない。従って、H I Vワクチン開発アプローチは、これらの標準とは無関係であり、組換ペプチド配列の情報は、他の方法で作成されなければならない。

【0013】

合成アミノ酸の小型H I Vペプチド[27]は、矛盾したアプローチにより作製され - ペプチド結合形成の各サイクルに関して、公知のH I V配列における可能性のあるアミノ酸変種の混合物が添加される場合、数百の変種が自動ペプチドシンセサイザーにおいて混合物として作製されている。e n vタンパク質の可変領域の多くの変種は、ペプチドシンセサイザーを使用し得ることができる。しかしこれらのペプチドのサイズは、15～20、最大30個のアミノ酸に限定され、より長いペプチド型は、組換システムにおいてのみ作製が可能である。実際に、小型の合成ペプチド及びそれらのカクテルによる免疫化は、H I V免疫反応について十分に高いが、それへの特異性が低いかもしれないように追加免疫する。個々に、動物（アカゲザル(Rhesus macaques)）の合成H I Vペプチド免疫化の試みであっても、標準E L I S P O T法により試験されたそれらの血液中にH I V特異抗体が存在しないという不満足な結果を引き出す。恐らくH A A R Tと組合せた治療目的の組成物としての、現存するペプチド - ベースのH I Vワクチンは、若干見込みがあるであろう。しかしペプチドワクチン組成物はひとつも、現在まで免疫化後のH I V感染症 - 予防作用を示していない。

【0014】

4型：H I Vペプチドの遺伝子をコードするD N Aプラスミド又はウイルス（アデノ随伴、鶏痘、ワクシニア、レトロウイルスなど）ベクターワクチン[11, 12, 16, 21, 26, 29, 30]。世界中で99の臨床試験に関して承認が得られた55種の抗 - H I Vワクチン中でほとんどは、D N A - ベースのクラスに属している。しかしひとつの候補だけが、第I I I相臨床試験を通過し、かつ第I I b相を通過する若干の見込みがある[37, 42]。この種のワクチンを使用する発想は、D N A免疫化は、自己免疫合併症及びアナフィラキシー反

10

20

30

40

50

応などの即時型副作用を生じないという、健常なバックグラウンドを有し、そのためその臨床適用は、安全かつ容易である。この利点にもかかわらず、全てのウイルス及び非ウイルスDNAワクチンは、それらの実際の抗-HIV有効性の可能性に関して、希望を弱める多くの欠点を含む。

【0015】

DNAは、それ自身いかなる免疫反応も引き起こさないで、このワクチン有効性は、下記の3つの条件の大きさであり、これらは各々同等に重要である：

1) トランスフェクション/感染効率、又はいかに多くの細胞が、一旦適用されたある量のDNAから遺伝物質が供給され得るか；

2) 発現レベル、又はどのくらい多くのタンパク質が、1種又は複数の遺伝子コピーを得る細胞において発現されているか；

3) 免疫応答の継続、又はいかに長くMHCが、標的化病原体を認識するmAbの誘発を続けるか。

【0016】

インビトロトランスフェクション/感染効率の測定は、細胞が分裂の次サイクルを通過するまでに遺伝子導入後24時間に計測された現在のタンパク質を発現している細胞の割合であり、この割合は、同じ条件で同時に導入された蛍光タンパク質又はlacZを発現している細胞について計測される。非-ウイルス系プラスミドベクターに関して、インビトロ効率は、40~90%を達成することができるが、同じベクターに関してインビボ静脈内投与は、最良の状態では1~5%生じる。これらの40~90% (インビボにおいて1~5%) から、98~99%は、2週間後には消滅する一過性又はエピソード性の発現であり、かつトランスフェクトされた遺伝物質のわずかに1~2%が、細胞ゲノムに挿入され、長期発現を提供する。プラスミドDNAワクチン[16]の量は、その送達物質-それらにより作製された陽イオン性脂質及びリポソーム、陽イオン性ポリマー (ポリエチレンジアミン、ポリリシン)、プルロニック並びにそれらの種々の組合せに関する、最大耐量により制限される。実際に、負帯電したDNAに結合しかつ運搬することができる全ての陽イオン物質は、濃度 10^{-5} ~ 10^{-4} M及びそれ以上で高度毒性である。非-ウイルスベクターの発現レベルは、ウイルスベクター発現と比べ、比較的高い。

【0017】

ウイルスDNAベクターの感染効率は可変性であるが、通常インビトロ実験の10~20%を超えない。しかしウイルスベクターは、遺伝物質の直接ゲノムへの送達を提供するそれらの能力において魅力的となり始めている。そのためインビボ投与に関するウイルスベクターの感染効率は平均2~5%であるにもかかわらず、標的タンパク質の発現は、主として長期間であり、一過性ではない。従ってウイルスDNAベクターは、治療又は予防目的で免疫応答及び抗-HIV活性の十分な持続を有すると仮定された。

【0018】

しかしウイルスDNAワクチン成分、及びいかにそれらが段階的に作用するかを研究するために、それらの予測される活性様式の制限を観察することができる。臨床試験に入っているDNAベクターの第一のクラスは、アデノウイルス構築物(construction)であった。それらの最新型は既に0とは異なる感染効率を示し、及び免疫化mAb後に誘発された力価は全ての免疫化学法により検出可能であるにもかかわらず、これらは決して単独投与において使用されない。このポイントは、アデノウイルスベクター-ADV[11]、又はアデノ随伴ウイルスベクター-AAV[29]は、予定された免疫化の2週間後のELISA、INF-ELISPOT又はウェスタンブロットアッセイにより通常認識されるタンパク質を送達する比較的低い発現のみを引き起こすことである。任意の組換えタンパク質又はタンパク質混合物による標準免疫化の2週間後に抗体力価によりADV及びAAVに関するこれらのデータを比較する場合、ADV及びAAVワクチン接種に関して絶対数は5~10倍より低いことは明らかになり始める。これらの数に注目し、本研究者らは、可能性のある免疫応答の期間についていくつか結論づけることができる。

【0019】

10

20

30

40

50

第III相臨床試験に到達し、かつ2003年10月以降タイにおいて16000名の未感染個体に適用されたただ一つのワクチン組成物は、2種のボックスウイルス（ワクシニアウイルス）- HIVワクチン接種（ALVAC-HIV）後の、プラスミドDNA-gag-pol-envワクチン（AIDSVAX B/E）による並べられたワクチン接種を基にしていた[12]。この特許のデータの検証は、ワクチン接種されたアカゲザルの血液試料由来の誘発された抗体の力価は、各免疫化後1～3週間増加し、かつワクチン接種の残り1年間は、対照数からプラスのプロットへやや外れていくことを示している[12]。免疫応答の継続は、この場合これをいかにして評価するかという問題である。アデノウイルス及びボックスウイルスは、中でも最大のウイルスファミリーであり、これらは表面上及びウイルスマトリックス内にそれら自身のタンパク質を数百個露出していることも忘れてはならない。これは、投与後短期間（1～2週間）でブーストされた免疫応答は、高度であるが、ほとんど非特異的であり、かつ加えて非特異性は、副作用として免疫毒性反応を引き起こすということを意味している。

【0020】

ウイルスワクチンの有効性における唯一の例外は、レトロ-（レンチ-）ウイルスベクター-ベースのアプローチである[26]。HIVはそれ自身、レンチウイルスファミリーの良い例である。レトロウイルスベクターは、十分に高い（最大5%）インビボ感染効率を提供し、送達された遺伝子タンパク質の発現は、細胞ゲノムの感染のために安定していない場合にも十分でありかつ長い。レトロウイルスベクターは、癌治療用ワクチンとして、臨床試験において、あらゆる他の遺伝子構築物よりも、著しくより良い抗腫瘍反応を示した。HIVを含む全てのレトロウイルスのみが、それらの治療的適用であっても疑わしく、予防的ワクチン接種は注目に値しないものにするある性質を有し-これは、移動性遺伝エレメントとしてヒトゲノムへ侵入するそれらの能力、並びにある期間後そのカスケードが制御できなくなり始める複数の遺伝的変異を駆動し、種々の細胞及び組織において複数の癌悪性転換を引き起こす能力である。

【0021】

DNA-ベースのHIVワクチンの一般的欠点は、PCR及びモノクローニング後の標準DNA配列決定などの、組換えHIVペプチド組成物に関して先に説明された方法と同じ方法で得られた当初のヌクレオチド配列に関するものである。 $10^5 \sim 10^6$ 変種と等しい患者1名の血流中のHIV遺伝的変異の平均数を理解することは真実に近い。ランダム様式のこの方法で得られた一つ又はいくつかの配列データで作製された遺伝的構築物は、同じ患者に関してであってもHIV変異株の大半が基本的には働くことができない。並びに全てのプラスミドDNA及び任意のウイルスベクター-ベースのDNAのHIVワクチンは、単独のenv、pol、gag及びそれらの組合せ領域に関するHIVゲノムの配列をベースにしている。これらの構築物がモノクローナルヌクレオチドHIVゲノム領域の配列からなるようになるまで、HIVワクチン開発は袋小路にある。HIV遺伝的変動性及び変異性を根絶するために、その現存する変異の定量分析を継続し、かつより頻繁に存在する変異株に関する見込みのあるワクチンを製剤することは必要である。

【0022】

先に説明されたように、DNA-ベースのHIVワクチンの有効性に関する他の主な制限は、ウイルス及び非-ウイルスの遺伝子治療用ベクターのインビボ送達に関する不完全な公知の方法に起因した貧弱な免疫応答である。あらゆる種類の抗-感染症免疫化を提供するDNA-ベースのワクチン型の見込みが低いことを理解するための科学者の正確な比較は、以下である。任意のタンパク質又は抗原、及び原核生物大腸菌システムにおいて作出されたそれらの組換え連結されたIgG軽鎖-重鎖変形に関する仮定のモノクローナル抗体(mAb)を想定して欲しい。ここで本発明者らは、ELISA、ELISPOT、イムノドットプロット、ウェスタンプロット、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡などの、全ての可能な実験室免疫反応アッセイにより、抗原がこれらの2種のmAb型へ結合するための親和性の比較を行うことを試みる。本発明者らが、これらの型がひとつのアッセイに収められた各状況において認めるものは、以下である-組換えmAbの親和性は、常に天

10

20

30

40

50

然の動物モノクローナル抗体の親和性よりも少なくとも10倍低く、更には力価決定時の最小結合活性の差異は、100～200倍に達し得る。ワクチン免疫原性のインビボ評価に関する同じ状況は、研究者が、動物免疫化に使用されるDNA-ベース組成物及びタンパク質-ベース組成物の活性を分析する場合に、認められる。免疫化された動物の血中の現在の抗原に関するmAbの力価として測定された特異的免疫応答の有効性は、遺伝子ベクターとして送達される抗原の方が、当初のタンパク質-抗原よりも、数倍より低いであろう。DNA変種に関する特異的抗原免疫応答の強度は、その「陽性対照」-タンパク質変種よりも常に5～20倍より低い。

【0023】

可能性のあるHIVワクチン候補として説明されている、更にひとつの小さい組成物の範疇が存在し-これは樹状細胞ワクチンとも称される。それらの開発は、幹細胞科学を基本にし、かつ樹状細胞ワクチンは、かなり経費が高い(平均患者1名の治療に45000～60000米ドル)にもかかわらず、適度に十分な治療結果を伴う化学療法又は放射線治療と組合せて、数種類の腫瘍の治療に適用される。しかしいくつかのある種の病理又は微生物を識別しかつ殺傷することがインサイチュにおいて示された樹状細胞-マクロファージ前駆体は、同じ患者の血流に自家的にのみ適用されることができるので、HIV治療、更には感染症予防に関するそれらの効能はかなり疑わしい。マクロファージの「教え(teaching)」に関するウイルスのペプチドを得る場所に関する疑問は、同じであり、組換え体は、数年配列が固定され、かつ未変性のものは、単離するために実在しないような高濃度で提供されなければならない。従って樹状細胞適用は、重大な抗-HIVワクチンの候補としては提唱することができない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0024】

HIV-1大流行の制御の唯一の可能性のある方法は、非-感染個体、特に高リスク群の代表者の免疫化を通じて、HIV-1感染を防止及び/又はその発症を停止することができる、ある種のワクチンである。そのようなワクチンは、個別の天然のHIV-1ペプチドのエピトープの混合物、正確にはウイルス表面上外側にのみ存在する主要なHIV-1エンベロープタンパク質gp120、その断片のエピトープ、及び同じく好適な外側部分を伴うenv-gp120-gp41四量体の原料としてのgp41ペプチド及び/又はワクチン接種される個体の免疫系を認識可能なエピトープを含有しなければならない。これらのペプチドは、先に言及された理由(3～4頁13～30、1～20行)のために、ウイルス由来の未変性のものであることはできない。並びに組換えペプチドに関して、正確な配列情報が誘導されなければならない。本発明者らは、以下を基にしたenv配列研究を含む、本特許出願において詳細に特定されたHIVワクチン開発の代替法を開発した。

1) 未変性ウイルスペプチドのファージディスプレイリバースパニング技術による収集及びアフィン(affine)精製;

2) HIV-感染した個体の現在のコホート中の多数の変異株において表されたgp120及びその断片の配列に関する情報を送達する一群のLC-MS法を使用する、未変性ウイルスペプチドの引き続きの定量的かつ配列決定分析;

3) HIV及び真核生物のグリコシル化と同じ組換えenvペプチド産生のためにリーシュマニア属システムを使用する、天然envペプチドエピトープの再構築;

4) a) 必要な免疫ブースト期間の延長、b) 免疫毒性の制御:を提供する、免疫原性envペプチドのための立体的に安定したリボソームパッケージング又はピロソームのいずれかのアプローチを使用する、HIV予防ワクチン組成物。

【0025】

現在までに実行されたgp120のプロテオーム解析は稀であり、かつ他のウイルスペプチド及び細胞タンパク質のカクテルから精製された未変性のペプチド変種は存在しないので、不完全であった。十分な吸着能を持つカラムでのウイルスenvペプチドのアフィ

ン吸着によるリバースパンニング技術は、この問題点を解決することができる。H I V 感染に対する免疫化のためのワクチン組成物が製造される前に、H I V 感染した個体の現在のコホートの大半において提示されている e n v ペプチドのアイソフォームを選択することが必要である。

【 0 0 2 6 】

1 名の患者について平均 10^5 の遺伝的変種という大きい変動性にもかかわらず、最も採用されかつより高い感染生存率を有する変種の選択が、各感染者において実行される。疫学的変動性のデータは、H I V 変異株の蔓延は、縄張りの境界、存在する遺伝子配列に応じた性的 - 又は注射薬物乱用 (I D U) - 伝染の個人的接触依存性を有することを証明している。優性の (dominating) ウイルスペプチド変種の数、遺伝的変種よりも決定的にはるかに小さいが、十分迅速に種々の数の優性に変更することができる。及び優性である感染的に危険な変種であるヌクレオチド配列は、情報を生じず、プロテオーム定量及び配列分析のみ行うことができる。本発明者らが試みたこの方法は、液体クロマトグラフィー、エレクトロスプレーイオン化質量分析である。

【 0 0 2 7 】

未変性の g p 1 2 0 H I V ペプチドは、高い免疫原性を有するが、エピトープ同一性を失っていない組換え変種について同レベルを維持するためには、同様のグリコシル化を持つ組換えシステムが必要である。この問題点を解決するためには、細胞培養物、酵母培養物及びリーシュマニア属システムを使用することが可能である。真核細胞培養生成は、大腸菌における 1000 と比べ平均数 1000 万 (decades of million) であるような多数の自己細胞タンパク質のために、ごくわずかな量の組換えペプチドをもたらす。酵母培養物は、十分な生産を提供するが、酵母における糖合成 (carbohydration) は、先に提唱されたように、真核生物及び H I V と非常に似ている訳ではない。従って本発明者らは、誘導性かつ高い発現で、真核生物に典型的なグリコシル化様式を伴うリーシュマニア属システムを選択した。リーシュマニア属において作製された g p 1 2 0 組換え変種は、高度かつ 100% の H I V - 特異的免疫応答を提供し、次の段階は、感染症発症の防止のためにこの反応を延長することであった。

【 0 0 2 8 】

立体的に安定したリボソームを、ペプチドワクチン担体として使用することができる方法には、下記のふたつの可能性がある：ペプチドが、リボソームベシクルの水内容物中に封入されるか、又は活性化された遠位 P E G 末端に結合され、リボソームの表面上に提示されるかのいずれか。両方の場合において、e n v ペプチドは、迅速なプロテアーゼ切断及び分解から保護され、その結果免疫ブースト期間は延長される。立体的に安定したリボソームは、無毒であり、かつそれら自身無害である。これらのベシクル (visicle) は、内部に数週間又は数ヶ月にわたり装荷された (enloaded) 免疫原性ペプチドを保持することができ、かつ一度にではなくこの十分長い期間内にそれらの内容物を次第に放出する (lease) ことができる。このことは、1 回のワクチン接種についてより多くのタンパク質量を使用することを可能にする。H C C に関する外来タンパク質とのより長い永久的接触が提供される場合に、より強力かつより長い免疫応答が形成される。予防的 H I V 感染症の伝染及び発症に関するワクチンの成功は、重要であろう。

【 0 0 2 9 】

H I V ワクチン候補の分析について留意する最後の点は、それらの有効性の前臨床評価のための適切なインビボモデルが存在しないことである。抗 - レトロウイルス化学療法薬の開発を伴う更なる治療による H I V 感染症のモデル作製にチンパンジーを使用しようとする全ての試みは納得できかつ妥当であったが、チンパンジー又はアカゲザルにおいて抗 - H I V 免疫応答を評価することは、不可能である。類人猿及びサルにおいて誘発される免疫原性反応は、同じ抗原免疫化によりヒトにおいて生じる反応とはスペクトルにおいて極めて異なる。更に例えばチンパンジーは、あらゆる H I V 亜型に感染し、ヒトにとって致命的であるウイルス負荷のレベルで、疾患発症症状のささいな徴候を伴わずに数年間幸せに生存することができ、更にはチンパンジー独自のシミアンウイルス感染症が生じる。

そのため、抗 - H I V 免疫原性組成物の試験に関して、通常の実験マウスは、類人猿よりも劣ることはないが、統計学的に有意な数が入手でき、かつより頻繁な血液免疫検定ができる。臨床試験のみが、免疫防御作用が現在の新規 H I V ワクチンにより提供されるかどうかを判定することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 0 】

【図 1】図 1：C D - 4 5 モノクローナル抗体、共焦点顕微鏡法により行った H I V 感染したヒトの B リンパ球分析： a、b) H I V - 特異的 m A b R N A 単離物の「良好な」給源； c、d) 進行性疾患段階の進行 (A I D S) を伴う患者からの比較的「不良な」給源； e) 感染した患者の血液由来の T 及び B リンパ球、透明度スキャンニング。

10

【 0 0 3 1 】

【図 2 A】図 2：本発明の方法の好ましい実施態様に従うファージミド D N A ライブラリーの獲得手法のスキーム。

【図 2 B】図 2：本発明の方法の好ましい実施態様に従うファージミド D N A ライブラリーの獲得手法のスキーム。

【図 2 C】図 2：本発明の方法の好ましい実施態様に従うファージミド D N A ライブラリーの獲得手法のスキーム。

【 0 0 3 2 】

【図 3】図 3：本発明の好ましい実施態様に従う E L I S A 技術による陽性抗体産生クローンの選択を示す略図。

20

【 0 0 3 3 】

【図 4】図 4：組換ファージライブラリー形成及びパンニング選択。

【 0 0 3 4 】

【図 5】図 5 a - b：「ヘッド」上に提示された濃厚化された H I V e n v ペプチド - 特異抗体ライブラリーを伴う、組換ヘルパー M 1 3 ファージの構造。走査型プローブ顕微鏡 (S P M 又は A F M) 接触モードは、Nikon Eclipse 2000U をベースにした NanoWizard (JPK Instruments 社、独国) を用い、スティングカンチレバー - CSC17/noAl、共鳴振動数 1 2 k H z (MicroMash 社、エストニア) で行った。ファージの長さは平均 8 0 0 n m、厚さは 4 0 ~ 5 0 n m であり、H I V - 特異的 S c F v ライブラリーの提示は、1 個のファージ粒子につき 2 ~ 1 0 抗体分子である；この「ヘッド」の測定されたサイズは、平均 2 0 0 ~ 2 5 0 n m である。 a) 組換 M 1 3 ファージ、及び提示された H I V - 特異抗体ライブラリーを伴うその「ヘッド」、 b) 対照 M 1 3 K o 7 ヘルパーファージ。

30

【 0 0 3 5 】

【図 6】図 6 a - b：リバースパンニング技術に使用された、アフィニティ超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ - 活性化されたカラムの構造。走査型プローブ顕微鏡 (S P M) 接触モードは、スティングカンチレバー - CSC17/noAl を伴う NanoWizard 接触モードを用いて行った。 a) 組換ファージ包埋以前の、超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ - 活性化された吸着剤、 b) M 1 3 m A b 包埋後の、提示された組換ファージ H I V - 特異的 S c F v ライブラリーを伴う、超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ - 活性化された吸着剤。

40

【 0 0 3 6 】

【図 7】図 7 a、b：H I V e n v ペプチドを収集するためのリバースパンニング技術。 a) R P アフィニティカラムから溶離された画分のプロファイル (亜型 A プール単離物、P E G - 沈降及びそれに続く 2 0 % ショ糖勾配中 1 0 0 0 0 0 g での超遠心を、濃縮に使用した)。ピーク A 及び B は、ポリクローナル抗 - H I V 抗体を使用するウェスタンブロットにより特異的 e n v ペプチドの存在についてチェックした。 b) R P アフィニティカラムから溶離された画分のプロファイル (亜型 A プール単離物、限外濾過を、上清の濃縮に使用した)。ピークは、ポリクローナル抗 - H I V 抗体を使用するウェスタンブロットによりチェックした。

【 0 0 3 7 】

50

【図 8】図 8 a - b : リバースパンニングカラムからの HIV 亜型 A env ペプチドブールの溶離された画分の SDS - PAGE 及びウェスタンブロット (ECL 検出) : a) 1 - ハイレンジマーカー ; 2 - 画分番号 4 ; 3 - 画分番号 5 ; 4 - 画分番号 6 ; 5 - 画分番号 7 ; 6 - 画分番号 8 ; 7 - 画分番号 11 ; 8 - 画分番号 9 ; - 全てのアッセイは、
- メルカプトエタノール (- ME) と共に調製した。 b) 1 - 画分番号 1 - ME あり ; 2 - 画分番号 2 - ME あり ; 3 - HIV - PEG - ME あり ; 4 - HIV - 沈降物 - ME あり ; 5 - HIV - 上清 - ME あり ; 6 - ハイレンジマーカー ; 7 - 画分番号 1 - ME なし ; 8 - 画分番号 2 - ME なし ; 9 - 画分番号 6 - ME なし ; 10 - HIV - PEG - ME なし ; 11 - HIV - 沈降物 - ME なし ; 12 - HIV - 上清 - ME なし。

10

【 0 0 3 8 】

【図 9 A】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。 a) #A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393 MKAKGMQRNYQHLWRWGXMLFWXIM

【図 9 B】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。

【図 9 C】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。

【図 9 D】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。

20

【図 9 E】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。 b) B.RU.04.04RU128005_AY682547 MRARGIRKKNYQGLLRWGTLGLGILMI

【図 9 F】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。

【図 9 G】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。

【図 9 H】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。

【図 9 I】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。 c) #B.RU.04.04RU129005_AY751406 MRAKGTRKNYQRLWRWGIMLLGMLMI

30

【図 9 J】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。

【図 9 K】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。

【図 9 L】図 9 a - c : 配列決定及び 2 D 分析による、Env シグナルペプチド gp 120 構造の再構築。

【 0 0 3 9 】

【図 10 A B】図 10 a - d : HIV - 1 エンベロープペプチドの概略的 3 D 構造 a) gp 120 コアの概略的 3 D 構造 [40, 41] b) gp 120 CD 4 - CCR 5 結合エピトープの概略的 3 D 構造 [24]

40

【図 10 C】図 10 a - d : HIV - 1 エンベロープペプチドの概略的 3 D 構造 c) CD 4 - 結合ループ形成における gp 120 形質転換の概略的 3 D 構造 [22]

【図 10 D】図 10 a - d : HIV - 1 エンベロープペプチドの概略的 3 D 構造 d) gp 41 エクトドメインの構造及び変動性 [34]

【 0 0 4 0 】

【図 11 A】図 11 a - b : 下記をコードする HIV env ペプチド DNA 断片の PCR 増幅 : a) 全 gp 120、gp 120 内側及び外部ドメイン、並びに V 2、V 3 及び V 4 ループ b) 全 gp 41 及び gp 41 エクトドメイン。

【図 11 B】図 11 a - b : 下記をコードする HIV env ペプチド DNA 断片の PCR 増幅 : a) 全 gp 120、gp 120 内側及び外部ドメイン、並びに V 2、V 3 及び

50

V 4 ループ b) 全 g p 4 1 及び g p 4 1 エクトドメイン。

【 0 0 4 1 】

【 図 1 2 】 図 1 2 : 種々の発現システムにおける H I V e n v ペプチド及びそれらの断片の生成 : a) 誘導性発現の g p 1 2 0 内部ドメイン、g p 4 1 エクトドメイン、S D - P A G E b) 永久発現の g p 1 2 0、g p 4 1、S D S - P A G E 及び E C L ウェスタンブロット検出

【 0 0 4 2 】

【 図 1 3 】 図 1 3 : 他のタンパク質発現システムにおけるグリコシル化と比較した、リーシュマニア・タレントラエ(*Leishmania tarentolae*)細胞 (L E X S Y 発現システム) におけるタンパク質の N - グリコシル化のスキーム。レター (letter) (Jena Bioscience社) において、哺乳類細胞及びリーシュマニア・タレントラエにおいて得られたグリコシル化パターンは、糖鎖末端の N - アセチルノイラミン酸の存在のみ異なる ;

【 0 0 4 3 】

【 図 1 4 】 図 1 4 : 1 k b スタッファー断片を置換する標的遺伝子のクローニング部位を持つ、p L E X S Y _ I - 2 ベクターファミリーのマップ。5 ' o d c 及び 3 ' o d c は、発現プラスミドの S w a I による線状化後の、宿主染色体への相同組換え領域である。L . タレントラエ a p r t の 0 . 4 k - I R 由来の u t r 1、1 . 4 k - I R c a m C B 由来の u t r 2、及び 1 . 7 k - I R 由来の u t r 3 は、最適化された遺伝子 - フランキング非翻訳領域であり、これは、L E X S Y 宿主 T 7 - T R における標的遺伝子及びマーカー遺伝子の発現のための転写後 m R N A プロセシングのためのスプライシングシグナルを提供する。S P は、L . メキシカナ (*Leishmania mexicana*) 分泌された酸性ホスファターゼ L M S A P 1 (7) のシグナルペプチドを、及び H 6 はヘキサヒスチジンストレッチを意味する。代替のクローニング戦略は、標的タンパク質のサイトゾル型 (c) 又は分泌型 (s) 発現を生じる。サイトゾル型発現の 5 ' 挿入部位は、B g l I I、N c o I、又は S l a I であり、かつ分泌型発現については、S a l I 又は X b a I である。このスタッファー断片の 3 ' 末端で、N h e I、M s p C I、又は K p n I の制限部位は、C - 末端 H i s 6 ストレッチへの融合を生じるのに対し、N o t I クローニング部位の利用は、この H i s 6 ストレッチを無効にする。マーカーとして、b l e (ブレオマイシン耐性) 遺伝子及び n e o (アミノグルコシドリッド転移酵素) 遺伝子が利用可能である (Jena Bioscience社) ;

【 0 0 4 4 】

【 図 1 5 】 図 1 5 a - d : H I V e n v 組換えペプチドのクロマトグラフィー精製の工程 : a) 6 H i s p 1 2 0 i d 1 大腸菌発現 (S D S - P A G E 5 ~ 2 0 %)、b) N i - N T A カラム上の 6 H i s p 1 2 0 i d 1 の精製、c) Biosuite Q - PEEK 1 0 u m 4 . 6 x 5 0 m m カラム (Waters社、米国) 上の 6 H i s p 1 2 0 i d 1 の精製 d) S u p e r o s e 1 2 1 0 / 3 0 0 G L 上のゲル濾過クロマトグラフィーによる 6 H i s p 1 2 0 i d 1 の精製。精製前及び精製後。

【 0 0 4 5 】

【 図 1 6 】 図 1 6 a - b : H I V e n v 組換えペプチド免疫ブーストのためのリボソームアジュバントの種類 : a) ベシクルの水相の内側に装荷された組換え H I V e n v ペプチドを伴う、立体的に安定したリボソーム 1 5 0 n m、P E G - 4 0 0 の概略図 ; b) P E G 活性化された遠位端に結合された組換え H I V e n v ペプチドを伴う、立体的に安定化されたリボソーム 2 0 0 n m、P E G - 2 0 0 0 の概略図。

【 0 0 4 6 】

【 図 1 7 】 図 1 7 : S S L ワクチン成分のガウス及びニコンプ (Nicomp) サイズ分布 : ベシクルの平均直径は、1 5 5 n m である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 7 】

本発明は、本ワクチンによりチャレンジされた個体において誘発された特異化された免疫応答により、その保護活性を提供する、H I V、好ましくは H I V - 1 亜型 A 及び B の

予防ワクチンを提供する。従って本活性物質は、以下に詳細に説明された複合技術により調製及び選択された組換ポリペプチド/ペプチド混合物である。基本的ワクチン成分は、ウイルスの表面タンパク質及びエンベロープタンパク質並びにそれらの断片により表され、これは好ましい実施態様に従い、グリコシル化の状態が異なるHIVエンベロープタンパク質gp120、gp140、gp160(図1)及びgp41、gp120のV1-V3ループの保存ドメイン、gp120 V1-V5ループの耐性-関連した可変部分に対する抗体、gp41のグリコシル化された変種；HIV-1エンベロープスパイク及びgp41タンパク質の外部部分によるCD4受容体の結合時に高次構造の変化を受ける近位V1/V2及びV3ループを伴う、ウイルスエンベロープタンパク質gp120、gp140、gp160へのCD4結合エピトープ；ウイルスエンベロープタンパク質のCXCR5及びCCR4共受容体結合部位；p24ウイルスペプチドの種々のエピトープ：を含んでなる。

10

【0048】

これらの組換ポリペプチド及びそれらの混合物は、種々のドナーB-リンパ球mRNAから作製された抗体の組換ファージディスプレイライブラリーを用い、収集され、同定され、かつクロニングされる。各々の作製されたファージ抗体ライブラリーは、組換gp120-、gp41及び未変性のHIV-ポリペプチドの種々のエピトープの結合に対し、好ましくは組換gp140-、gp160-及びp24 HIV-1亜型Aタンパク質上に存在するエピトープの結合に対しても、特異的である。

20

【0049】

これらの組換ファージ抗体ライブラリーは、検出、分析及び/又は精製の手段として種々の適用において使用されてよい[23]。前記抗体ライブラリーを使用する適用は、免疫検定、免疫プロット、クロマトグラフィーなどを含むが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体は、HIV治療及び/又は予防のための新規医薬品の開発に関しても有用である。

本発明の好ましい実施態様においては、M13KO7ファージ上に提示された組換抗体が、HIV予防ワクチンの開発に使用される。

【0050】

ファージミドリライブラリーにより展示された抗体断片は、本質的に保存された高次構造のHIVタンパク質エピトープに結合するので、該抗体の標的は、HIV感染症に対するワクチンとして適格であり、チャレンジ時に、個体の免疫系は、これらのエピトープに対する特異的免疫応答を生じるだろうから、すなわち最終的に記憶細胞となる成熟したB細胞及びT細胞はその個体に免疫を伝達することを示す。

30

【0051】

本発明のHIVワクチンは、組換gp41及びp24 HIV-1亜型Aタンパク質、並びにそれらの断片(実施例3の表9)は本発明の方法により調製された抗体に結合する、gp120、gp140及びgp160の断片、加えて通常の担体及び賦形剤及び任意に免疫刺激剤を含有する。

【0052】

本ワクチンは、任意のHIVウイルス、更には変異したHIVウイルス上に存在し得るエピトープに特異的な、記憶細胞による個体の免疫系を提供することにより、HIV感染症の獲得を防止し、かつ更なる進行も防止するであろう。

40

【0053】

前記組換タンパク質及び/又は断片は、本発明の方法により得られたHIV-特異抗体により選択された未変性のHIV-1エンベロープタンパク質の結合及び分析により獲得された配列情報を基にしている。

詳細には、エンベロープタンパク質などのタンパク質は、超遠心分離及びウイルス粒子の溶解などの好適な方法により破壊されたウイルス粒子から得られる。

【0054】

好適なタンパク質の選択は、当業者に公知の任意の好適なスクリーニング法により実行

50

されてよい。好ましい実施態様において、この選択は、(i) ウイルスのエンベロープタンパク質の収集のための提示された抗体による組換えファージを使用するファージパンニング、及び/又は(ii) 培養のためにプラスチック表面に接着されたHIV - 特異抗体のアフィン吸着、及び/又は(iii) カラムに包埋されたHIV - 特異抗体による、ウイルスエンベロープタンパク質のアフィニクロマトグラフィー選択のいずれかにより実行されてよい。

【0055】

次工程において、入手されかつ選択された未変性のウイルスタンパク質の配列及び/又はアイソフォームの3D高次構造が、同定されてよい。従って手順は、HIV - 1罹患個体の血流中、更にはNRTI、NNRTI及びHAARTの変形などの種々の投与計画で抗レトロウイルス療法を受け取った患者の血流中を循環するgp120、gp41及びp24などの、ウイルスタンパク質の高度に特異的な可変断片及び/又は定常断片の数種の変種の混合物を提供する。

10

【0056】

前記配列を基に、ウイルスタンパク質の組換えポリペプチド及び/又は断片が作出される。これらの配列は、それらに対する好適な免疫応答を誘導するために免疫系により認識され得るポリペプチドの作製に適した方法を使用することにより得ることができる。

【0057】

前記組換えポリペプチドは、例えばリーシュマニア誘導型発現システムのような真核生物発現システム及び真核生物 - 様グリコシル化を備える酵母などの、任意の好適な発現システムにおいて得ることができる。

20

【0058】

本発明のHIV - 1 A及びB亜型予防ワクチンの種々の変種の調製のための例証的かつ一般的技術は、以下により詳細に例証されている、工程1 - 9を含む：

1. HIV - 特異的ScFv抗体の断片を含む、ヒト組換えIgGファージミドライブラリーの作製（ファージディスプレイ技術）；
2. HIV - 特異抗体のScFv断片を提示している組換えファージミドライブラリーの濃厚化（バイオパンニング）；
3. 任意に、PBMC - MT感染法によるインサイチュでの抗レトロウイルス療法ナイーブのウイルス材料の増殖；
4. HIV粒子及びペプチドの濃縮；ウイルス不活化及び破壊；
5. リバースパンニング技術によりファージミドライブラリーを提示しているHIV - 特異的組換えScFvによる未変性のHIV envペプチドの収集；並びに
6. 任意に、液体クロマトグラフィー質量分析（LC - MS）法による、envペプチド変動性及び頻度の定量分析及び配列分析；
7. 任意に、主要HIV envペプチドのクローニング、及びリーシュマニア・タレントラエにおけるワクチン開発のための組換えペプチドの作製；
8. 任意に、組換えHIV envペプチドのクロマトグラフィー精製及び3D構造解析；並びに
9. 好ましくはワクチン送達のビヒクルとして立体的に安定したリボソーム又はピロソームを使用する、HIV予防ワクチン免疫ブースト組成物の調製。

30

40

【0059】

1. HIV - 特異的ScFv抗体の断片を含む、ヒト組換えIgGファージミドライブラリーの作製（ファージディスプレイ技術）；

ここで本発明の方法において、ファージミドライブラリーが、以下を含む段階i) からiii) に従い、工程1) において作製される：

i) 各々、HIVに感染した多数の個体から得られたBリンパ球において発現されたIgGの、軽鎖及び重鎖の可変領域をコードするRNA由来のDNA断片の増幅が、調製される段階；

ii) IgG重鎖の可変領域をコードする核酸に会合されているIgG軽鎖の可変領域を

50

コードする核酸を含むひとつの構築体への、段階 i) で得られた軽鎖及び重鎖の二つの DNA 断片の集成；

iii) pCANTABファージミドベクターへの形質転換。

【0060】

詳細には、最初に、HIVにより感染していることがわかっており、かつその中にHIV特異抗体が存在することが予想される多くの個体から、B及び/又はTリンパ球が単離される。抵抗性HIV変異株を持つ個体も含まれてよい。これらのB細胞の単離は、任意の公知の技術、例えばロイコフェレーシス、引き続きのリンパ球集団からのB/T細胞の単離[19]などにより実行されてよい。引き続きRNAが、B/Tリンパ球から、例えば論文[23]に例証されたような当該技術分野において周知の技術により、単離される。

10

【0061】

ScFvライブラリー作製のために、HIV-特異的免疫グロブリンの配列を含むmRNAが単離されることが好ましい。これに関して、Bリンパ球の数は、RNA単離前のHIV-感染者の血液中の、例えば共焦点顕微鏡分析によるCD45 mRNA免疫検定により、評価される。図1に示されたデータは、AIDS疾患及び症状の進行した段階の患者の一部は、総単離されたリンパ球に対するBリンパ球の非常に低い比率を有し(図1c、d)、かつ通常低いCD45免疫染色は、高いウイルス負荷及び非常に低いCD4:CD8状態に相関していることを示している。他のもの(図1a、b)とは異なり、これらの患者は、HIV-特異的ファージミドライブラリー作製のコホートに関してかなり不良な供給源である。先行する抗レトロウイルス治療に沿った又はその過程の高いウイルス負荷並びにそれらの頻度は、HIV-特異的ScFvライブラリーを得る機会を制限するものではない。

20

【0062】

そのように得られた総RNAは、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の定常領域に特異的な、例えばオリゴdTを使用するか、又は好ましい実施態様による、プライマーとしてのオリゴヌクレオチドの使用により、cDNAに転写される。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の異なる定常領域の配列は、当該技術分野において周知であり、その結果cDNAへの転写に好適なプライマーは、容易にデザインすることができる。従って手順は、関心のない材料はその第一工程において排除されるので、RNAプール(複数)中の免疫グロブリン転写産物の最初の選択、及び種々のドナーからの種々のRNA-試料のより容易な取り扱いを可能にする。同じくmRNAをcDNAへ転写する前の種々のドナーからのRNA-プールの組合せも構想され、かつこれはより大きい多様性が得られる(下記参照)ので好ましい。こうして調製されたcDNAの相補体は、当該技術分野において周知の技術により合成される。

30

【0063】

十分量のDNA断片を調製するために、関心対象の領域は、B/Tリンパ球から得られたmRNA、cDNA又は鋳型としてのcDNAから調製された二本鎖DNAを直接用いて増幅することができる。

【0064】

前記PCR反応に関して、増幅される核酸配列の5'末端及び3'末端にアニーリングする好適なプライマーが使用され、これらは一般に、長さ約10~40、好ましくは15~30、より好ましくは20~30ヌクレオチドである、オリゴヌクレオチドである。

40

【0065】

リバースプライマーとして、その配列が、免疫グロブリンの定常領域に由来したオリゴヌクレオチドが使用されてよい。好ましくは該リバースオリゴヌクレオチドプライマーは、対応する重鎖のCH1領域に、又は型及び型軽鎖のC又はC領域にハイブリダイズする。使用されるフォワードプライマーは、重鎖及び軽鎖の可変領域の反対末端にハイブリダイズする。

【0066】

好ましい実施態様において、一次PCR増幅のためのフォワードプライマー及びリバー

50

スプライマーは、V BASEデータ-ベース(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>)から選ばれた、表 1 から 3 に示された核酸配列からなる群から選択される。この P C R 反応は概して、長さ約 7 5 0 の断片を生じる。

【 0 0 6 7 】

【 表 1 】

表 1 : ヒト免疫グロブリン κ 型軽鎖の P C R 増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーのリスト

#	プライマー名、方向	ヌクレオチド配列(5' - 3')
1	V κ 1a forward	RAC ATC CAG ATG ACC CAG
2	V κ 1b forward	GMC ATC CAG TTG ACC CAG
3	V κ 1c forward	GCC ATC CRG ATG ACC CAG
4	V κ 1d forward	GTC ATC TGG ATG ACC CAG
5	V κ 2a forward	GAT ATT GTG ATG ACC CAG
6	V κ 2b forward	GAT RTT GTG ATG ACT CAG
7	V κ 3a forward	GAA ATT GTG TTG ACR CAG
8	V κ 3b forward	GAA ATA GTG ATG ACG CAG
9	V κ 3c forward	GAA ATT GTA ATG ACA CAG
10	V κ 4a forward	GAC ATC GTG ATG ACC CAG
11	V κ 4b' forward	GAT ATT GTG ATG ACC CAC ACT CC
12	V κ 5a forward	GAA ACG ACA CTC ACG CAG
13	V κ 6a forward	GAA ATT GTG CTG ACT CAG
14	V κ 6b forward	GAT GTT GTG ATG ACA CAG
15	C κ 1' reverse	ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C

10

20

【 0 0 6 8 】

30

【表 2】

表 2 : ヒト免疫グロブリンλ型軽鎖のPCR増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーのリスト

#	プライマー名、方向	ヌクレオチド配列(5' - 3')
1	Vλ1a' forward	CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC
2	Vλ1b' forward	CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC
3	Vλ1c' forward	CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC
4	Vλ2 forward	CAG TCT GCC CTG ACT CAG
5	Vλ3a forward	TCC TAT GWG CTG ACT CAG
6	Vλ3b forward	TCC TAT GAG CTG ACA CAG
7	Vλ3c forward	TCT TCT GAG CTG ACT CAG
8	Vλ3d forward	TCC TAT GAG CTG ATG CAG
9	Vλ4 forward	CAG CYT GTG CTG ACT CAA
10	Vλ5 forward	CAG SCT GTG CTG ACT CAG
11	Vλ6 forward	AAT TTT ATG CTG ACT CAG
12	Vλ7 forward	CAG RCT GTG GTG ACT CAG
13	Vλ8 forward	CAG ACT GTG GTG ACC CAG
14	Vλ4/9 forward	CWG CCT GTG CTG ACT CAG
15	Vλ10 forward	CAG GCA GGG CTG ACT CAG
16	Cλ2' reverse	TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TG
17	Cλ7' reverse	AGA GCA TTC TGC AGG GGC CAC TG

10

20

【 0 0 6 9 】

【表 3】

表 3：ヒト免疫グロブリン重鎖（I g M、I g G、I g A）の P C R 増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーのリスト

#	プライマー名、方向	ヌクレオチド配列(5' - 3')
1	VH1aM forward	CAG GTK CAG CTG GTG CAG TCT GG
2	VH1bM forward	CAG GTC CAG CTT GTG CAG TCT GG
3	VH1cM forward	SAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT GG
4	VH1dM forward	CAR ATG CAG CTG GTG CAG TCT GG
5	VH2aM forward	CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GGT C
6	VH2bM forward	CAG GTC ACC TTG ARG GAG TCT GG
7	VH3aM forward	GAR GTG CAG CTG GTG GAG TCT G
8	VH3bM forward	CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT G
9	VH3cM forward	GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT G
10	VH3dM forward	GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY G
11	VH4aM forward	CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS G
12	VH4bM forward	CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG G
13	VH5b' forward	GAR GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
14	VH6a'M forward	CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG
15	VH7aM forward	CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT GG
16	IgM'M reverse	TGG AAG AGG CAC GTT CTT TTC TTT GTT G
17	IgG1'M1 reverse	CTT GTC CAC CTT GGT GTT GCT GG
18	IgA reverse	GCA GGG CAC AGT CAC ATC CTG G

10

20

【 0 0 7 0 】

次工程において、段階 i) において得られた軽鎖及び重鎖の二つの D N A - 断片の、I g G 重鎖の可変領域をコードする核酸に会合されている I g G 軽鎖の可変領域をコードする核酸を含むひとつの構築体への連結は、各々、I g G 軽鎖及び重鎖の可変領域 S c F v を含むポリペプチドの発現を可能にする。

30

【 0 0 7 1 】

好ましい実施態様により、可変軽鎖及び重鎖をコードする D N A 断片間の特異的連結を得るために、段階 i) において得られた試料の量は、例えば二つのパーツにアリコートとされ、かつ任意に希釈される。次に、m R N A からの増幅による c D N A、c D N A 又は c D N A 由来の二本鎖 D N A のいずれかにより調製された該 D N A 断片は、軽鎖又は重鎖に特異的なリンカーと個別に接触されてよく、その結果このリンカーは、各試料パーツ中のみのそれぞれの D N A 断片に結合する。すなわち一方のパーツは、軽鎖のみに関するリンカーを有するのに対し、他方のパーツは、重鎖のみに関するリンカーを有するという

ことである。使用されるリンカーは、互いに好適な条件下でのハイブリダイゼーションを可能にし、軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含む D N A 断片を生じるであろう。再度、これら二つの D N A 断片の会合は、これら二つの D N A 断片の連結がインフレームで実行され、その結果は軽鎖可変領域及び重鎖可変領域のアミノ酸配列を持つポリペプチドを生じるであろう。同じ事が、望ましいならば、二つの重鎖及び二つの軽鎖を特異的に得るために実行することができる。表 4 及び 5 において、好ましいプライマーが列記されている。

40

【 0 0 7 2 】

【表 4】

表 4 : ヒトλ型及びκ型軽鎖可変断片の二次PCR増幅のためのリバースオリゴヌクレオチドプライマーのリスト

#	プライマー名、方向	ヌクレオチド配列(5' - 3')
1	Jλ235 reverse	TAG GAC GGT CAG CTY GGT CCC
2	Jλ7 reverse	GAG GRC GGT CAG CTG GGT GCC
3	Jλ1 reverse	TAG GAC GGT GAC CTT GGT CCC
4	Jλ6 reverse	GAG GAC GGT CAC CTT GGT GCC
5	Jλ4 reverse	ACC TAA AAT GAT CAG CTG GGT TCC
6	Jκ2 reverse	TCG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC
7	Jκ3 reverse	TCG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC
8	Jκ14 reverse	TCG TTT GAT YTC CAC CTT GGT CCC
9	Jκ5 reverse	TCG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC

10

【0073】

【表 5 A】

20

表 5 : PCR増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー並びにヒト免疫グロブリン軽鎖及び重鎖の集成体のリスト

	プライマー名、方向	ヌクレオチド配列(5' - 3')
1	linkM-JH6 reverse	GCT ACC GCC ACC GCC GCT GCC ACC GCC ACC AGA ACC ACC GCC GCC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT C
2	linkM-JH3 reverse	GCT ACC GCC ACC GCC GCT GCC ACC GCC ACC AGA ACC ACC GCC GCC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CC
3	linkM-JH1245 reverse	GCT ACC GCC ACC GCC GCT GCC ACC GCC ACC AGA ACC ACC GCC GCC TGA GGA GAC RGT GAC CAG GG
4	linkM-VL1a' forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CAG TCT GTG CTG ACT CAG CC
5	linkM-VL1b' forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG
6	linkM-VL1c' forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG
7	linkM-VL2 forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CAG TCT GCC CTG ACT CAG CC
8	linkM-VL3a forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC TCC TAT GWG CTG ACT CAG C
9	linkM-VL3b forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC TCC TAT GAG CTG ACA CAG C
10	linkM-VL3c forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC
11	linkM-VL3d forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC TCC TAT GAG CTG ATG CAG

30

40

【表 5 B】

12	linkM-VL4 forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CAG CYT GTG CTG ACT CAA TC
13	linkM-VL5 forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CAG SCT GTG CTG ACT CAG CC
14	linkM-VL6 forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC AAT TTT ATG CTG ACT CAG
15	linkM-VL7 forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CAG RCT GTG GTG ACT CAG GAG
16	linkM-VL8 forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CAG ACT GTG GTG ACC CAG GAG
17	linkM-VL4/9 forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CWG CCT GTG CTG ACT CAG CC
18	linkM-VL10 forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC CAG GCA GGG CTG ACT CAG CC
19	linkM-Vk1a forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC RAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT C
20	linkM-Vk1b forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GMC ATC CAG TTG ACC CAG TCT C
21	linkM-Vk1c forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GCC ATC CRG ATG ACC CAG TCT C
22	linkM-Vk1d forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GTC ATC TGG ATG ACC CAG TCT C
23	linkM-Vk2a forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT C
24	linkM-Vk2b forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAT RTT GTG ATG ACT CAG TCT C
25	linkM-Vk3a forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAA ATT GTG TTG ACR CAG TCT C
26	linkM-Vk3b forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAA ATA GTG ATG ACG CAG TCT C
27	linkM-Vk3c forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAA ATT GTA ATG ACA CAG TCT C
28	linkM-Vk4a forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT C
29	linkM-Vk4b' forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAT ATT GTG ATG ACC CAC ACT CC
30	linkM-Vk5a forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT C
31	linkM-Vk6a forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT C
32	linkM-Vk6b forward	GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGT AGC GAT GTT GTG ATG ACA CAG TCT C

【 0 0 7 4 】

本発明のより好ましい実施態様において、 $((Gly)_4Ser)_3$ ポリペプチドリンカーをコードするリンカー断片が、免疫グロブリンの可変性の重鎖及び軽鎖をコードする核酸配列に追加される。この重鎖及び軽鎖のリンカー部分は、互いにアニーリングし、例えば Taq SE DNA ポリメラーゼなどの、Taq SE DNA ポリメラーゼの存在下でフィルイン反応を刺激する。最後に重鎖及び軽鎖は、それらの DNA リンカー断片パーツを使用し、単独の遺伝子に集成される。

【 0 0 7 5 】

従って手順は、免疫グロブリン軽鎖又は重鎖の可変領域をコードする核酸の、各々、当初得られたRNAプール中に存在しない抗原結合部位を形成するために軽鎖及び重鎖の組合せも含む、別の免疫グロブリン軽鎖又は重鎖の可変領域をコードする核酸との無作為連結により、人工的に作製された非常に多くの抗体を得ることを可能にする。示されるように、免疫グロブリンの可変領域上の既に天然に予め形成された抗原結合部位のパーツを使用し、かつそれらが無作為に組合せて、HIVに感染した個体において天然に産生される抗体と比べ、HIVタンパク質に対し増強されかつ一定の結合親和性を示す抗体も作製される。

【 0 0 7 6 】

加えて制限部位が、こうして得られたDNA - 断片に導入され、これは、例えばクローニング工程などの、後続の適用において有用である。原則として、任意の好適な制限部位が、必要に応じて使用されるが、当業者の知識内でこれはCHO - K 1 o s e の好適なものである。制限部位は、例えば制限部位の核酸配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーの使用、又は各々、5'末端及び/若しくは3'末端に組合せられた制限部位の核酸配列を含むアダプター分子の使用などの、当該技術分野において公知のいずれか適当な方法により導入されてよい。

【 0 0 7 7 】

本発明の好ましい実施態様において、S f i I 及びN o t I 制限部位が、好ましい実施態様に従い軽鎖及び重鎖核酸配列を含む連結された核酸断片の末端に導入され、そこでこれらの制限部位は、クローニングベクターへの更なるクローニング工程に使用される。S f i I 及びN o t I 制限部位は、各々、該連結された断片 (S c F v 遺伝子) の5'末端及び3'末端に付加される。これらの特定の制限部位は、抗体遺伝子において非常に低い頻度で生じ、例えば軽鎖及び重鎖核酸配列を含む、得られた連結断片のほとんどが、単独のS f i I / N o t I 断片としてクローニングされることを可能にする。本発明のより好ましい実施態様において、S f i I 及びN o t I 制限部位は、オリゴヌクレオチドプライマーを介して導入される。好ましい使用されるS f i I - 部位 - 及びN o t I - 部位 - 含有するオリゴヌクレオチドプライマーは、論文[21]のプライマー配列を基にデザインされる。軽鎖及び重鎖核酸配列を含む得られた連結断片の末端でのS f i I 及びN o t I 制限部位の導入に有用なプライマーは、表6に示されている。

【 0 0 7 8 】

10

20

30

【表 6 A】

表 6 : 集成された s c F v 遺伝子の末端への S f i I 及び N o t I 制限部位の導入のためのオリゴヌクレオチドプライマーのリスト

#	プライマー名、方向	ヌクレオチド配列 (5' - 3')
1	JK2-NotI	TTC TCG ACT TGC GGC CGC TCG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC
2	JK3-NotI	TTC TCG ACT TGC GGC CGC TCG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC
3	JK14-NotI	TTC TCG ACT TGC GGC CGC TCG TTT GAT YTC CAC CTT GGT CCC
4	JK5-NotI	TTC TCG ACT TGC GGC CGC TCG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC
5	JL235-NotI	TTC TCG ACT TGC GGC CGC TAG GAC GGT CAG CTY GGT CCC
6	JL1-NotI	TTC TCG ACT TGC GGC CGC TAG GAC GGT GAC CTT GGT CCC
7	JL7-NotI	TTC TCG ACT TGC GGC CGC GAG GRC GGT CAG CTG GGT GCC
8	JL6-NotI	TTC TCG ACT TGC GGC CGC GAG GAC GGT CAC CTT GGT GCC
9	JL4-NotI	TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACC TAA AAT GAT CAG CTG GGT TCC
10	VH1aM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAG GTK CAG CTG GTG CAG TCT GG
11	VH1bM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAG GTC CAG CTT GTG CAG TCT GG
12	VH1cM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC SAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT GG
13	VH1dM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAR ATG CAG CTG GTG CAG TCT GG
14	VH2aM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GGT
15	VH2bM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAG GTC ACC TTG ARG GAG TCT GG

10

20

30

【表 6 B】

16	VH3aM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC GAR GTG CAG CTG GTG GAG TCT G
17	VH3bM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT G
18	VH3cM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT G
19	VH3dM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY G
20	VH4aM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS G
21	VH4bM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG G
22	VH5b'-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC GAR GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
23	VH6a'M-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG
24	VH7aM-SfiI	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT GG

10

20

【 0 0 7 9 】

軽鎖及び重鎖核酸配列を含む得られた連結断片のクローニング及び発現に関して、当業者に公知のいずれか好適なクローニング及び / 又は発現ベクターが使用されてよい。好ましい実施態様において、例えば、p C A N T A B 5 E . c o l i ファージミドベクターを含む、ファージミドベクターが使用される。

【 0 0 8 0 】

ファージミド p C A N T A B 5 E は、M 1 3 及び C o 1 E 1 プラスミドの両複製起点を含み、その結果好都合なことにプラスミドとして増幅されるか、あるいは M 1 3 K O 7 などのヘルパーファージの助けにより、組換え M 1 3 ファージとしてパッケージされることができる。S f i I 及び N o t I 消化された抗体可変領域遺伝子は、p C A N T A B 5 E ファージミドベクター内のリーダー配列と M 1 3 遺伝子 3 の本体(main body)の間でクローニングされる。得られる融合タンパク質は、両方の親タンパク質の機能を保持している。g 3 p リーダー配列は、本タンパク質の大腸菌の内膜 / ペリプラスムへの輸送を指示し、そこで主 g 3 p ドメインは、該融合タンパク質を該集成ファージの先端へ結合する。p C A N T A B 5 E は、クローニングされた S c F v と g 3 p の配列の間の接合部に、アンバー翻訳停止コドンも含む。得られる s c F v 断片を含む p C A N T A B 5 E プラスミド誘導体のプールは、T G 1 などの、大腸菌 s u p E 株の形質転換に使用される。s u p E において、大腸菌株翻訳は、p C A N T A B 5 E 内のアンバー停止コドンまで続き、そのファージ先端に展示された S c F v - g 3 p 融合タンパク質を作製する。

30

40

【 0 0 8 1 】

【表 7】

表 7 : s c F v 断片混合物の再増幅に使用されるオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー	5' - 3' ヌクレオチド配列
VH12467 <i>Sfi</i> IReampl	TGC GGC CCA GCC GGC CSA G
VH35 <i>Sfi</i> IReampl	TGC GGC CCA GCC GGC CGA RG
JL1235 <i>Not</i> IReampl	GAC TTG CGG CCG CTA GGA CG
JL4 <i>Not</i> IReampl	GAC TTG CGG CCG CAC CTA AAA TG
JL67 <i>Not</i> IReampl	GAC TTG CGG CCG CGA GGR C
JK1234 <i>Not</i> IReampl	GAC TTG CGG CCG CTC GTT TG
JK5 <i>Not</i> IReampl	GAC TTG CGG CCG CTC GTT TAA TC

10

N o t I 制限エンドヌクレアーゼの認識部位は、青色で記し、S f i I 制限エンドヌクレアーゼの認識部位は、緑色で記している。

【 0 0 8 2 】

H B 2 1 5 1 などの非サプレッサー株において、停止コドンが認識され、タンパク質合成は、s c F v 遺伝子の末端で中断され、かつ g 3 p 融合タンパク質は合成されない。この場合、得られる S c F v タンパク質は、細胞周辺腔に輸送されるが、これは該遺伝子 3 ドメインを欠いているので、ファージ粒子には集成されない。むしろ可溶性抗体断片が、ペリプラスム中に蓄積し、かつ延長されたインキュベーション時に、培地に漏出する。従って、H B 2 1 5 1 及び類似の大腸菌株は、選択された抗原陽性ファージによる、それらの感染後の可溶性抗体の産生に使用され、かつ現在の適用においては使用することができない。s c F v ライブラリー作製の工程は、実施例 1 に示されている。

20

【 0 0 8 3 】

2 . H I V - 特異抗体の S c F v 断片を提示している組換ファージミドライブラリーの濃厚化 (バイオパンニング) ;

抗体の発現は、抗原に結合することが可能であるポリペプチドを得るのに適した宿主において得ることができ、及びこうして得られたポリペプチドは、異なるドナーから単離された組換 g p 1 2 0 - 、 g p 4 1 - 及び未変性の H I V - ポリペプチドと共に得られた。これにより、発現されたポリペプチドが宿主の表面上に発現される場合に、これは有利ではあるが、必須ではない。抗体の発現に適した宿主は、ウイルスシステム、原核細胞及び真核細胞及び / 又は細胞培養物を含む。

30

【 0 0 8 4 】

好ましい実施態様において、該抗体の断片は、ファージディスプレイライブラリーを作製するバクテリオファージ M 1 3 において発現され、これはファージディスプレイ技術の使用のために異なるファージにより各々提示される非常に多数の異なる構築体の展示を可能にする。このファージディスプレイアプローチは、免疫グロブリン遺伝子のクローニング並びに機能性抗体の発現及び検出のための強力なツールである。抗体の可変性の重鎖及び軽鎖断片を、モノクローナル抗体選択の段階を伴わずに、H I V - 特異抗体のプール又はライブラリーとしてファージ表面上に展示された融合タンパク質として、得ることができる。このアプローチは、任意の抗原に対する抗体を迅速に見つけ、かつ必要な場合には、他の発現システムにおけるグリコシル化を伴う及び / 又は伴わずに、それらの可溶性変種を作製することを可能にする。

40

【 0 0 8 5 】

ファージミドライブラリーパンニングは、多数のクローンの非常に迅速なスクリーニングを可能にするインビトロ技術であり、ここで選択された H I V ポリペプチドへの結合親和性を示しているそれらの表面に抗体を提示しているファージは、組換ファージミドの維

50

持及び更なるスクリーニング工程のための新規ファージの作製のために同定されかつ使用することができる。ファージ - 提示している抗体ライブラリーは、抗原 - 陽性クローンを同定するために、当該技術分野における SDS - PAGE、ウェスタンブロット及び ELISA スクリーニングのクロスサイクルにより、結合親和性に関して分析することができる。

【0086】

展示された ScFv 抗体断片は、それらの抗原 - 結合能を保持しているので、従って、親和性選択により、特異抗体を発現している組換えファージを濃厚化することは可能である。このアプローチにより、規定された特異性及び親和性の抗体は、集団から迅速に選択される。得られた抗体遺伝子ライブラリーは、抗原結合能を改善するように、スクリーニングされる。この技術の工程は、パンニングと称され、HIV - 特異的 ScFv 断片を提示しているファージが、引き続き：

i) 組換え gp120 -、gp140 -、gp160 -、gp41 HIV - 1 亜型 A 及び B env ペプチド、

ii) 種々の HIV - 感染ドナーから単離された未変性の HIV env ポリペプチド：に結合し、かつ収集されることを含む。好ましい実施態様において、先に列記された全てのポリペプチドに結合親和性を示すファージライブラリーが選択されるので、展示された抗体の数は、 $10^7 \sim 10^{12}$ から $10^2 \sim 10^3$ へと減少する。該ポリペプチドの特異的組換え HIV ポリペプチドとの独立した接触サイクルのために、ここでこれらのポリペプチドの配列は、(i) 公知であり、かつ (ii) 一定であり、並びに異なるドナーから単離された未変性の HIV - ポリペプチドにより、ここでこれらのポリペプチドにおいて変異が生じ、抗体を選択することが可能であり、これは本質的に公知の HIV 変異体全てに結合し、このことは本抗体は、本質的に該 HIV ポリペプチド上の一定の高次構造を認識することができることを指摘している。

【0087】

従って手順は、ファージの表面上に提示された HIV - 特異的組換え抗体ライブラリーを誘導し、かつ感染した個体からのものの巨大なプールから選択されることを可能にし、これらは、二つの異なる方法：

i) 標準バイオパンニング手法[4]

ii) 固形状態の固定された未変性の HIV ペプチドのニトロセルロースメンブレンでの包埋：により、例えこれらのポリペプチドにおいて変異が生じてても、選択された HIV ポリペプチドへの結合親和性を示す。

【0088】

第一の方法に従い、i) 組換えファージ作製のために、M13KO7 ヘルパーファージ 4×10^{10} pfu を添加し、1時間のプレインキュベーション、並びに $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン及び $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンの存在下、37 °C で、250 rpm で攪拌しながら12時間のインキュベーションの間に、対数期形質転換された TG1 大腸菌培養物が調製された（典型的ファージは、 $10^{10} \sim 10^{11}$ アンピシリン - 導入単位 / ml を生じた）。ファージは、他のプラスチック表面には、非特異的に吸着するので、ポリプロピレンチューブが推奨される。

【0089】

その後PEG沈降を行う。細菌培養物を、1000 g で10分間遠心し、上清を収集し、冷却する。上清に、1/5 v/v 冷溶液、20% PEG / 2.5 M NaCl を添加し、0 °C で60分間インキュベーションし、その後Beckman JA-20ローターにおいて10000 g で、4 °C で20分間遠心する。上清は廃棄する。ペレット（これは容易に視認できないことがある）を、0.01% チメロサルを含む $2 \times \text{YT}$ 培地 16 ml 中に再懸濁する。本発明者らは、上清が貯蔵される（4 °C で）場合には、これを $0.45 \mu\text{m}$ フィルターを通らせ濾過することを推奨した。この組換えファージを含有する溶液は、パンニングに使用する。

【0090】

P E G 沈降及びファージパンニングのサイクルは、一部のファージディスプレイ組換え抗体調製品は不安定であるので、レスキュー後できる限り直ぐに実行されなければならない。最小培地プレートから対数期 T G 1 細胞コロニーを、2 × Y T 培地 5 m l に移し、2 5 0 r p m で振盪しながら、3 7 °C で一晩インキュベーションする。次に新鮮な 2 × Y T 培地 1 0 m l に、この一晩培養物 1 0 0 μ l を接種し、かつ 2 5 0 r p m で振盪しながら、3 7 °C で、この培養物の A 6 0 0 が 0 . 3 に到達するまで、インキュベーションする。

【 0 0 9 1 】

2 5 c m²組織培養フラスコを、例えば P B S 又は 0 . 0 5 M N a₂C O₃ (p H 9 . 6) などの、好適な緩衝液中に 1 0 μ g / m l に希釈された抗原 5 m l でコーティングする。抗原によるコーティングは、室温で 1 ~ 2 時間、又は 4 °C で一晩行うことができる。プレートのコーティングの条件、すなわち緩衝液並びにインキュベーションの温度及び時間は、抗原によって決まり、かつ該新規組換え体が由来した当初のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のために使用される免疫検定の条件に類似していなければならない。抗原のコーティング濃度は、所望の組換えファージ抗体の親和性 (抗原 - 結合能) に応じて変動することができる。高親和性抗体について、低親和性抗体よりも、より少ない量の抗原が必要である。しかし特異的親和性を伴う抗体の単離のためには、溶液 - ベースの選択のほうが、選択に使用される抗原の量を、より正確に制御することができるので、固相選択よりも好ましい。

【 0 0 9 2 】

このフラスコを、P B S で 3 回洗浄し、各洗浄後にはこれを完全に空にする。次にこのフラスコを、フラスコ表面上のあらゆる残存する部位をブロックするために、ブロッキング緩衝液で完全に満たし、室温で 1 時間インキュベーションする。このフラスコを、P B S で再度 3 回洗浄し、各洗浄後にはこれを完全に空にする。

【 0 0 9 3 】

保存剤として 0 . 0 1 % チメロサル又は 0 . 0 1 % アジ化ナトリウムを含有するブロッキング緩衝液を、新たに調製する。P E G - 沈降された組換えファージ 1 6 m l を、ブロッキング緩衝液 (保存剤を含有する) 1 4 m l で希釈し、かつ室温で 1 0 ~ 1 5 分間インキュベーションする。パンニング工程時に、非 - 特異的疎水性タンパク質 - タンパク質相互作用が、未変性 M 1 3 ファージタンパク質と一部の抗原の間で生じることがある。この相互作用は、T r i t o n X - 1 0 0 が希釈されたファージ上清に最終濃度 0 . 1 % で添加された場合に、低下することができる。あるいは、グリシン又はトリプシン溶液による特異的結合ファージの溶離を行うことができる。希釈された組換えファージ 2 0 m l をフラスコに注ぎ、かつ 3 7 °C で 2 時間インキュベーションする。次にこのフラスコを空にし、P B S 3 0 ~ 5 0 m l で 2 0 回、及び 0 . 1 % T w e e n 2 0 含有する P B S で 2 0 回洗浄する (洗浄瓶は、洗浄液の分注にうまく働く) 。各回、フラスコは完全に空にする。

【 0 0 9 4 】

対数期の T G 1 細胞全量 1 0 m l (工程 1 参照) を、フラスコ又はパンニング容器に加え、3 7 °C で 1 時間インキュベーションする。1 時間後、1 0 m l の細胞懸濁液の 1 0 0 μ l を取り出す。それらから、2 × Y T 培地中に、細胞懸濁液の 1 0 倍希釈液を調製する (1 : 1 0 、 1 : 1 0 0 、 1 : 1 0 0 0) 。未希釈細胞 1 0 0 μ l 及び各希釈物 1 0 0 μ l を、個別の S O B A G プレート上に、滅菌したガラス製スプレッダーを使用し、配置する。乾燥した場合、これらのプレートは倒置し、3 0 °C で一晩インキュベーションする。これらのコロニーがインキュベーション後に採取するには余りにも小さい場合は、このプレートを、3 0 °C で更に 4 ~ 8 時間放置することができる。これらの S O B A G プレートは、以下のように操作することができる : a) 細胞をプレートからこすりとり、ストック培養物を作製する。このプレートを、2 × Y T 培地 5 m l に浸し、滅菌したガラス製スプレッダーで細胞を培地へこすり取る。グリセロールを最終濃度 1 5 ~ 3 0 % となるよう添加し、- 7 0 °C で貯蔵する。b) このプレートを密封し、後日レスキューするために、4 °C で最高 2 週間貯蔵する。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 5 】

[25] ii) から改変された第二の方法に従い、未変性の H I V ペプチドの混合物を、10 % S D S - P A G E ゲル上を泳動させ、引き続きウェスタン転写緩衝液 (2 5 m M トリス、1 9 3 m M グリシン、及び 2 0 % メタノール) 中で、ニトロセルロースメンブレン上に電氣的に転写する。この抗原の位置は、メンブレンをボンソーレッド又はクマシーブリリアントブルーのいずれかで染色することにより決定される。タンパク質バンドを含むメンブレンの $7 \times 30 \text{ mm}^2$ 切片を切り出し、10 % ブタゼラチン、 5×10^{11} C F U / m l ヘルパーファージと共に、4 で一晚インキュベーションすることによりブロックする。ブロック後、このメンブレンを、結合緩衝液 (5 % ゼラチン、 3×10^{11} C F U / m l ヘルパーファージ、0 . 5 M N a C l) に移し、s c F v ファージミド抗体ライブラリー 10^{12} C F U を添加する。ファージライブラリーは、メンブレンと共に、4 で 4 時間、穏やかに揺動しながらインキュベーションする。このメンブレンを、P B S、0 . 1 % T w e e n 20 で 6 回 (各洗浄につき容量 1 0 0 m l)、及び P B S で 6 回 (各洗浄につき容量 1 0 0 m l) 洗浄する。あるいは、これらのスポットを、0 . 1 % T w e e n 20 を含有する P B S (P B S T) で 5 分間かけて 3 回、2 5 % グリセロール含有する 1 0 % M P B S で 2 0 分間かけて 5 回、及び最後に P B S で 5 分間かけて 3 回洗浄する。タンパク質バンドを含むメンブレンを、レーザーブレードで切り出し、ファージを、1 0 0 m M T E A により、室温で 1 0 分間かけて溶離する。中和後、溶離されたファージ粒子を、ゼラチン - プロットされたメンブレン又はゼラチン - コーティングされたイムノチューブと共に、室温で 3 0 分間インキュベーションする。その後上清を、T G 1 を感染するために使用する。ファージは、先に説明されたように、次の選択ラウンドのために大腸菌から調製される。

10

20

【 0 0 9 6 】

3 . P B M C - M T 法による抗レトロウイルス療法ナীব患者のウイルス材料単離体の増殖 ;

H I V は、C D 4 - C C R 5 - C X C R 4 受容体が濃厚化された細胞培養物においてうまく増殖することができることは公知であるが、実際にはこの方法には多くの制約がある。第一に、患者由来の未変性ウイルス材料又はインビトロ感染症の実験室株の感染力価は、種々の方法 (リアルタイム R T P C R、p 2 4 E L I S A など) で測定された総ウイルス濃度の 1 ~ 2 % より多くなることはない。このことは、例えば、感染材料中のウイルスコピーの数が 10^5 である場合、研究者がインビトロ増殖から分析することができる最初のコピー数は、わずかに 10^3 であり、残りの 10^2 の当初の H I V の可能性のある異形は、分析から外れるということの意味する。第二に、インビトロ感染選択を通過した H I V 変異株の数は、最良の場合において、当初の 10^3 個からの数個の配列変種であり、従って実験室ウイルス株は、H I V 遺伝子及びペプチドの変動性の実際の状況を決して表していない。第三に、H A A R T 又は他の抗レトロウイルス療法で治療した患者由来の H I V は、インビトロで増殖する能力を失っており、従って抵抗性 H I V 変異株は、インビトロにおいて培養することができない。第二に、本発明者らの未変性ウイルス培養実験は、下記の場合に、最良の結果が得られることを証明している :

30

i) H I V - 感染患者のリンパ球を、説明されたように [19]、フィコール - ブラーク溶液を使用する、ヘパリン処理した新鮮な血液由来の健常ドナーのリンパ球と共にインキュベーションする。ロシア連邦領土に広がった H I V - 1 亜型 A に関して、H I V - 感染したリンパ球が、説明されたような [19] 健常ドナーの新鮮血液から単離された単球と共にインキュベーションされる場合に、ほとんどの場合において、感染はうまくいくことは、留意する価値がある。

40

ii) 濃度 $0 . 25 \times 10^6 / \text{m l}$ で調製された H I V とのインキュベーションのために使用される M T - 2 又は M T - 4 又は任意の他の株化細胞 (C C R 5 F - C E M、P M - I、H e L a、U 9 3 7 など) は、その後、R P M I - 1 6 4 0 培地の総容量 5 0 m l までの添加、及び 4 2 5 g で 1 0 分間の遠心により、2 回収集される H I V - 繁殖された同数の単球と共培養する。細胞混合物は、I L - 2 $10 \mu \text{ l} / \text{m l}$ を添加した C L 培地中

50

に再懸濁し、 25 cm^2 組織培養フラスコ中で直立した位置で 37°C でインキュベーションする。ウイルス-含有培地は、培養培地の半量を取り出し、これを同量の新鮮培地(RPMI + 10% FCS)と交換することにより、3~4日毎に収集する。

【0097】

ウイルス感染活性の有効性は、細胞死及びシンシチウム形成の顕微鏡分析並びに同じくp24 ELISA試験によって、制御される。収穫された培養培地は、 3000 rpm (1000 g)で15分間の遠心により、細胞を透明化し、 -80°C で貯蔵する。

【0098】

4. HIVペレットの濃縮(限外濾過、超遠心分離による)、ウイルス不活化及び破壊

ウイルス粒子を約20重量%含有するストック溶液を、血漿又は培養上清から作製する。最初に、上清を、 3000 rpm (1000 g)で15分間遠心し、次に得られた上清を、 13200 rpm (16000 g)で次の15分間遠心する。20%ショ糖の試料総容積の約半量を、超遠心チューブの底に積層し(ショ糖溶液の密度は $1.16 - 1.18\text{ g/cm}^3$ である)、その後レトロウイルス粒子を含有する上清を、このチューブの上方に注ぐ。チューブを、 38000 rpm で、MLS-50ローターOptima MAX, Beckmann (160000 g)で、1時間35分遠心する[19]。ペレットを、少量の培養培地(例えばRPMI 1640)に溶解する。

【0099】

HIVの不活化

HIVペレットの溶解及びHIVタンパク質の獲得

第一の方法を、論文[1]に説明されたように行う。HIV溶解緩衝液(放射線免疫沈降緩衝液)の組成は、 20 mM トリス-C1、 $\text{pH } 8.0$ 、 120 mM NaCl、 2 mM EDTA、 0.5% デオキシコール酸、 0.5% NP-40、 $2\text{ }\mu\text{g}$ PMSF、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ アポプロテイン、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ペプスタチンAを含有する。界面活性剤の添加後、磁気スターラーの上で低温加熱(50°C)しながら、穏やかに混合する。

【0100】

第二の方法は、質量分析及び結晶解析のためのペプチドの混合物の調製に関する標準である。得られたHIV-1タンパク質混合物の pH は、 2 N HClにより2.5に調節し、 0.15% (wt/vol) ブタペプシン(Sigma Chemical社, セントルイス, MO)と共に 37°C で4時間インキュベーションする。 80°C で15分間加熱することにより、加水分解を停止し、その後 pH を、 2 M NaOHの添加により、 $7.5 - 8$ に調節する。その後加水分解したタンパク質混合物を、 10 kDa 加水分解メンブレン及びペプシンにより限外濾過し、残りの加水分解されないタンパク質を除去する。濾過された加水分解されたタンパク質混合物は、凍結乾燥し、 -80°C で貯蔵する。

【0101】

5. リバースパンニング技術によりファージミドライブラリーを提示しているHIV-特異的組換えScFvによる未変性のHIV-1 envペプチドの収集;

抗原ファージを提示したライブラリーを使用するワクチン開発のためにファージディスプレイ技術を使うアプローチは、論文[35]において曖昧に説明されている。組換えファージScFvライブラリーカラム包埋の手法を開始する前に、M13提示されたライブラリーを、改変されたウェスタンプロット法により特異性に関してチェックする。プローブを、勾配SDS-PAGEで泳動し、引き続きニトロセルロース上に電氣的に転写する[25]。この抗原スポットを、 1% Tween 20を含有するPBS中に1時間最初に浸し、プロットされたタンパク質を再生する。これらのメンブレンを、PBS中の4%ゼラチン溶液により、 37°C で2時間更にブロックし、ファージ 10^{12} CFU/ml (4%ゼラチン溶液中 1.5% BSAと室温で30分間プレインキュベーションする)と共に室温で1時間インキュベーションする。その後メンブレンを、PBS、 0.1% Tween 20で3回、及びPBSで3回洗浄し、5%スキムミルク/PBS中のHRP-複合された抗-M13の $1:8000$ 希釈物と共に室温で1時間インキュベーションし、ファージ結

10

20

30

40

50

合を検出する。PBS / 0.1% Tween 20により3回及びPBSにより3回洗浄後、これらのバンドを、ECL検出(Amersham社)により可視化する。TPBS - プロットによる過剰な洗浄後、これらのメンブレンを、ECL試薬中で1分間インキュベーションする。各メンブレンは引き続き、Hyperfilm-ECLと共にインキュベーションし、現像する。

【0102】

組換えmAbは通常、その生物から単離された未変性の抗体と比べ、約10~30%の親和性を示す。しかしウイルス変異株の各コホートに関する個体(患者)のパネルのファージディスプレイ技術から作製された、HIV - 特異的mAb(ファージミドライブラリー)は、抗-HIV - 1予防ワクチンの開発のための主要なHIV env及び他のペプチド及びタンパク質を選択するのに十分である(図7a、b、8a、b)。

10

【0103】

組換えファージ作製を提示しているファージミドライブラリーに関して、M13KO7ヘルパーファージがTG1大腸菌一晚培養物へ添加され、1時間ブレインキュベーションされ、並びに100µg/mlアンピシリン及び50µg/mlカナマイシンの存在下、37で12時間インキュベーションされる(典型的ファージ収量は、 $10^{10} \sim 10^{11}$ アンピシリン - 導入単位/ml)。この培養物を、1000gで10分間遠心し、上清を収集しかつ冷却する。その後PEG8000/NaCl(20%PEG/2.5M NaCl)溶液の1/5 v/vを上清に添加し、水中で1時間インキュベーションし、その後10000g、4で20分間遠心し、沈殿を形成する。このペレットを、LB又は10mM トリスHCl(pH8.0)に溶解し、0.45µmを通して濾過する。組換えファージは、0.01%チメロサルを添加する場合は、4で貯蔵することができる。

20

【0104】

i) 不動化されたM13 - 特異的mAbによる超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ活性化されたクリオゲル(Protista Biotechnology社)クロマトグラフィーカラムでの包埋

M13 - 特異的mAbは、超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ-活性化されたクリオゲル(Protista Biotechnology社)に包埋する。このために、乾燥吸着剤を、0.5M 0.1M NaHCO₃(pH8.3)を含有するNaCl緩衝液中に再懸濁する。M13 - 特異的mAbは、同じ緩衝液中に濃度10mg/mlとなるよう溶解し、該吸着剤へ添加し、室温で1時間機械的に攪拌しながらインキュベーションする。インキュベーション後、この吸着剤を、同じ0.1M NaHCO₃(pH8.3)/0.5M NaCl緩衝液の5容量で洗浄する。非特異的反応基をブロックするために、この吸着剤を、0.1M トリス - HCl緩衝液(pH8.0)又は1Mエタノールアミン(pH8.0)と共に、室温で2時間インキュベーションし、その後5mlクロマトグラフィーカラムに調節する。

30

【0105】

両方の方法に関して、gp120、gp140、gp160及びそれらの断片、gp41、p24に特異的な第一のファージM13粒子は、先に説明されたように得られた(段階4)加水分解されたHIV - 1ペプチド混合物と共に、37で40分間インキュベーションする。その後ファージ粒子を、不動化されたM13ファージ-特異抗体の助けにより、いずれかで包埋する。

40

【0106】

包埋されたM13 - 特異的mAbを伴う調製された超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ - 活性化されたクリオゲルカラムは、0.05M トリス - HCl(pH8.0)緩衝液で平衡とし、その後同じ緩衝液中の組換えM13を、液体クロマトグラフィーシステムActaPrime Plus(GE Healthcare社)を用い、速度0.5ml/分で、5時間かけて調節する。その後このカラムを、同じ0.05M トリス - HCl(pH8.0)緩衝液の5容量で洗浄する。

【0107】

組換えファージの包埋は、走査型プローブ顕微鏡法(原子力顕微鏡)により検査する。う

50

まく包埋されたファージHIV - 特異的ScFvライブラリーを伴うクリオゲルは、図6bに示されており、対照の超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ - 活性化されたクリオゲルカラム構造は、図6aに示されている。

【0108】

0.05 M トリス - HCl (pH 8.0) 緩衝液中で加水分解されたHIV - 1 ペプチド混合物は、包埋されたアフィンカラムに、速度0.5 ml / 分で5時間かけて注がれる。その後このカラムを、同じ0.05 M トリス - HCl (pH 8.0) 緩衝液の5容量で洗浄する。

【0109】

HIV ペプチドに結合するファージは、0.1 M グリシン (pH 2.2) 勾配により溶離される。得られた画分は、ファージ - 抗原複合体が完全に再調節されるまで、0.001 M PMSF の存在下、グリシン溶離緩衝液中、室温で5時間インキュベーションされる。

【0110】

このHIV ペプチドは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC、Waters社) を用い、分析し[2]かつ精製する。分析用逆相HPLCを、Symmetry C18カラム (5 μ m、4.6 mm \times 150 mm、流量0.5 ml / 分) を装着したWaters 1525 HPLC システム上で行う。分取用逆相HPLCを、Waters 1525 HPLC システム上で、Symmetry C-18カラム (10 μ m、5.0 cm \times 25 cm) 及びWaters UV 検出器を用いて行う。水 / 0.1 % トリフルオロ酢酸 (TFA) 中のアセトニトリルの直線勾配を、結合したペプチドの溶離に使用する。

【0111】

6. 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC - MS) 法による、env ペプチド変動性及び頻度の定量分析及び配列分析；

未変性のHIV - 1 ペプチドを、リバースパンニングHIV - 特異的ファージライブラリー由来の試料の給源として収集する。env ペプチドの定量的選択、質量分布及び特徴決定は、一次元液体クロマトグラフィー - 質量分析 (LC - MS - MS 分析) により行う。

【0112】

論文[10]に類似しているように見えるSDS - PAGEゲルからのタンパク質ストリップ、及びペプチド質量フィンガープリントとして同定されない2Dからの単独のスポットを、Esquire 6000プラス装置(Bruker Daltonics社、ブレーメン、独国)を用いるエレクトロスプレーイオン化四重極質量分析装置によるトラップ法により分析する。これらの試料の捕捉は、低速クロマトグラフィーシステムUltimate LC Packing及び試料選択装置Famos LC Packing(Dionx社、CA、米国)オンラインレジメンから提供される。このクロマトグラフィーパーツは、二つの縦列に(consequently)連結されたカラムで、それらの間に電磁バルブを備えるものからなる。第一のカラム (100 μ m \times 3 s m) は、大きい細孔直径の、C₈類似体の疎水性ポリマー相Poros R2を備え、これは試料の濃縮及び脱塩のために使用される。第二のカラム (75 μ m \times 25 s m) は、粒度5 μ m、細孔直径300、C₁₈類似体のPhenomex吸着剤を備え、これはトリプシン処理されたペプチドの脱塩された混合物の分離のために使用される。クロマトグラフィー分離の条件は、以下である：200 μ l / 分で、スプリッター前の実際の排出(exhaust)速度900 nl / 分、及び分離時200 nl / 分。5 % から60 % までの溶液B (75 % アセトニトリル、25 % イソプロパノール、0.1 % ギ酸) の直線勾配で、48分間にわたるペプチド分離を行う。

【0113】

全ての測定は、300 ~ 2500 m / z の間で行われ、捕捉質量最適化は700と等しい。電荷数が2以上、かつ強度が閾値よりも高いイオンが、タンデム実験に使用される。得られた質量 - プリントは、MASCOT検索システムへ送付される。この検索は、プロテオームデータ - ベースを介して試行され、結果は、ペプチドアイデンティフィケーションの確認のためのソフトウェア複合体Scaffold 01-07-00 (<http://www.proteomesoftware.com>)

10

20

30

40

50

により検証される。95%を超えるアイデンティフィケーション予測値 (identification expectancy) を持つペプチドは、最終スケジュールに入れる。全ての観測されたペプチド質量は、計算された平均質量と 0.5 Da 以内で合致する。

【0114】

これらのチャートは、env タンパク質分子におけるポリペプチド配列の疎水性断片 (Y 軸正の指標) 及び親水性断片 (負の指標) の分布を表している (図3)。

on f : 信頼性 (0 = 低い、9 = 高い)

P r e d : 推定された二次構造 (H = ヘリックス、E = 鎖、C = コイル)

A A : 標的配列

疎水性アミノ酸相対指数 :

10

【0115】

【数1】

Ala: 1.800 Arg: -4.500 Asn: -3.500 Asp: -3.500 Cys: 2.500 Gln: -3.500
Glu: -3.500 Gly: -0.400 His: -3.200 Ile: 4.500 Leu: 3.800 Lys: -3.900
Met: 1.900 Phe: 2.800 Pro: -1.600 Ser: -0.800 Thr: -0.700 Trp: -0.900
Tyr: -1.300 Val: 4.200 Asx: -3.500 Glx: -3.500 Xaa: -0.490

20

【0116】

【数2A】

a) #A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393

gp120 inner domain

v1 v2

CKAAENLWVTVYYGVPVWRDAETTLFCASDAKAYDKEVHNWVATHACVPTDPNPQEI
ALE NVTEKFDMMWKNMVEQMOTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLN
VFEEMKNCIFNMTELDRDKRKTVHSLFYKLDIVSTGSNGSGQYRLINCNTS
AMTQA CPKVTFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDTNFTGTGPCKNVSTVQCTHGIKPV

30

gp120 outer domain

v3 v4 v5

VSTQLLLNGSLAEKEVMXRSENITDNGKXIIVQLTEPVNITCIRPGNNTRTSIRIGPGQT
FYATXDVIGDIRKAYCXVSRAAWXSTLQKISTQLRKYFNNKTIXFKNSSGGDLEVTT
HSF NCGGEFFYCNITDFFNSTWDGXGTXITXANGT
ITLECRIRIKQIINMWQRVGQAMYAPPIKGSIRCESNITGLXLTRDGGGGTNXXXETFRPIG
GN

gp120 inner domain

GGNMRDNWRSELYKQVVKIEPIGVAPTRAKRRVVEREKR

40

【数 2 B】

b) B.RU.04.04RU128005_AY682547

gp120 inner domain v1 v2
 CSAAGNLWVTVYYGVPVWKEADTTLFCASDAKGXSTEVHNVWATHACVPTDPNPQEIDLE
 NVTENFNMWQNNMVEQMHEDIISLLDQSLKPCVKLTPLCVTLNKNXNMVEQMHEDIISLWD
 QSLKPCVTLTPLCVTLNXXGKEEIKNCSFNTTTNIRNKMKEY
ALFYKLDIVPIDGDNTSYMLTSXNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKENKF
 NGTGPKKNVSTVQCTHGIRPV
 gp120 outer domain v3 v4 v5

10

VSTQLLLNGSLAEEVVVRSRNFSDNAKNIIVQLKDPVQINCTRPSNNTRKSISIGPGXA
 FYATGDIIGDIRXAHCNLSGADWTKTLEQIVKKLXEQYNKTIVFKQSSGGDPEIXMHSFN
 CGGEFFYCNTTKLENSTWENNSTNSTXNETGNXTITLPCRIKQIINRWQEVGKAMYAPPI
 KGQIKCSSNITGLLLTRDGGSNSTNNETFRPAGGD

gp120 inner domain
 GGDIRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTMAKRRVVQREKR

20

【数 2 C】

c) #B.RU.04.04RU129005_AY751406

gp120 inner domain v1 v2
 SSSAEQLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDARALNTEXHNVWATHACVPTDPNPQEXLLE
 NVTENFNMWXXKXGEMKNCSFNITTSTRDRXKEYALE
YKLDIVPIDDAKNSTNYRLISNTSVLTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFN
 GTGPCTNVSTVXCTHGIRPV

gp120 outer domain v3 v4 v5
 VSTQLLLNGSLAEEVVIRSANFTNNAKTIIVQLNESXVINCTRXPXNNTRKSIPIGPGRA
 FYTTGDIIGDIRQAHCXLSSTKWN DTLRQIVEKLREQFGNKTIKFNQSSGGDPEIVMHSF
 NCGGEFFYCNSTPLENSTWNSSHGDSTERSNTNESTITLTCRIKQIINMWQKVGQAMYAP
 PIRGQISCSSNITGLLLTRDGGANNSTTEVFRPGGGX

30

gp120 inner domain
 GGXMRDNXRSELYKYXVVKIEPLGVXPTKAKRRVVQREKX

【0117】

7. 主要 HIV env ペプチドのクローニング及びリーシュマニア・タレントラエに
 おけるワクチン開発のための組換えペプチドの作製；

40

HIV 生活環は、ヒト、サル又は齧歯類において生じ、かつそのタンパク質のグリコシル化は、哺乳類代謝に近い。真核生物発現システムは、酵母システム、糸状菌を含むが、昆虫、哺乳類及び/又は植物からの細胞培養物も含む。gp120 及び gp41 は両方とも、それらの外部ドメインにおいて高度にグリコシル化される。発現された断片又はタンパク質のグリコシル化が望ましい場合、発現は、真核生物システム、例えば酵母、哺乳類細胞培養物、リーシュマニア細胞培養物、バキュロウイルス発現培養物において実行されなければならない。CHO-K1 (チャイニーズハムスター細胞) 又は Cos-7 (アフリカミドリザル腎上皮細胞) などの哺乳類細胞における発現は可能であるが、哺乳類細胞は細胞代謝における数百万のタンパク質を有するので、その組換え物の発現はかなり低く、

50

かつ作製された組換え体は、クロマトグラフィーによる単離が難しい。結果的に本発明者らは、リーシュマニア・タレントラエをenvペプチド産生システムとして選択した。

【0118】

定量的質量分析後に、そのプール中の圧倒的多数を提示しているgp120変種を、配列決定し、かつクローニングに進める。多数の刊行物に示されたように、gp41配列異形は、HIV - 特異的免疫応答にとっては重要ではない(図10d、実施例4)。gp41グリコシル化レベル及びgp120へのカップリングは、その配列変動性よりもHIV - 特異抗体の誘発にとって重要であるので[31]、本発明者らは、クローニングのための標準成分として、患者コホートからの1種の変種の遺伝子のみを採取することを考えた。得られたgp120タンパク質配列を基に、gp120 envペプチド遺伝子をコードする対応するプロウイルスのDNA断片を、特異的プライマー対(表8)を使用し、患者のリンパ球cDNAマトリックスから、2段階入れ子型PCRにより増幅する。プライマーそれ自身及びそれらのセットは、LC-MS分析の結果を基に変化することができる。

10

【0119】

gp120及びgp41の全ペプチド、gp120内部ドメイン及びgp120外部ドメイン、gp41エクトドメインをコードするDNA断片のクローニングを行うことは可能である(図10a、b、cのgp120構造を参照のこと)。gp120、gp41及びそれらの主要ドメインをコードするHIV-1 DNA断片のPCR増幅スキームは、図11a、bに示されている。env gp120、gp41及びそれらのドメインの増幅のためのプライマーのセットは、表8に示されている。制限部位は、クローニングベクター変種に従い選択され、NcoIに関してピンク色で、XbaIに関して青色で、NotIに関してオレンジ色で、NheIに関して緑色で印をつけている。どの領域が、各場合の最良の免疫化の結果のためのクローニングに最も適しているかは、かなり当該技術分野で重要であり、又は経験のある研究者の選択による。

20

【0120】

【表 8】

表 8 : H I V - 1 g p 1 2 0、g p 4 1 及びそれらの主要ドメインをコードしている DNA 領域の増幅に使用されるオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー	5' - 3' ヌクレオチド配列	増幅断片
<i>Env</i> For <i>Nco</i> I	AAT ACC ATG GAA GCG AGG GGG ATG CAG AGG	<i>Env</i>
<i>Env</i> For <i>Xba</i> I	ATA TCT AGA GCC GCA GAA AAC TTG TGG GTC AC	<i>Env</i>
<i>Env</i> Reverse <i>Not</i> I	AT AGC GGC CGC TCA TTA TTG CAA AGC CTT TTC TGC GCC YTG TCT G	<i>Env</i>
<i>Env</i> Reverse <i>Nhe</i> I	ATA ATA GCT AGC TTG CAA AGC CTT TTC TGC GCC YTG TCT G	<i>Env</i>
gp120 For	ATA CCA TGG GCC GCA GAA AAC TTG TGG GTC AC	gp120
gp120 Rev	AT AGC GGC CGC TCA TTA TCT TTT TTC TCT CTC CAC CAC TCT TC	
gp120 Rev Inner	AT AGC GGC CGC TCA TTA GCC ATT TAA CAG CAG TTG AGT TGA TAC	gp120 inner* domain
gp120 For Outer	ATA CCA TGG GTA GTA TCA ACT CAA CTG CTG TTA AAT GGC	gp120 outer domain
gp120 Rev Outer	AT AGC GGC CGC TCA TTA CCT CAT ATT TCC TCC TAT A GG TCT G	
gp41 For	ATA TCT AGA GCA ATT GGA CTG GGA GCC GCC	gp41
gp41 Rev	ATA GCT AGC TCA TTA TTG TAA AGC CTT TTC TRC GCC	
gp41 Rev Ecto	ATA GCT AGC TCA TTA TAT TTT TAT ATA CCA TAA CCA ATT TGA TAT G	gp41* ectodomain
V2 For	ATA CCA TGG ACT TTC AAC ATG ACC ACA GAA YTA AGA G	gp120 V2 loop
V2 Rev	AT AGC GGC CGC GCA ATT TAT TAG TCT ATA CTG CCC ACT AC	
V3 For	ATA CCA TGG TGT ATC AGA CCT GGC AAC AAT ACA AG	gp120 V3 loop
V3 Rev	AT AGC GGC CGC ACA ATA TGC TTT TCT TAT GTC CCC TAT TAC	
V4 For	ATA CCA TGG TGC AAT ACA ACA GAC CTG TTC AAT AG	gp120 V4 loop
V4 Rev	AT AGC GGC CGC GCA TGG CAG AGT TAT AGT TCC ATT G	

・ 1 2 0 F o r プライマーは、g p 1 2 0 内部ドメインの増幅のためのフォワードプライマーとして使用され、4 1 F o r プライマーは、g p 4 1 エクトドメインの増幅のためのフォワードプライマーとして使用される。

【 0 1 2 1 】

ワクチン開発のための組換タンパク質製造に関する発現システムの選択に関して、いくつかの特徴が重要である。それらの発現は：i) 誘導性；ii) 同様にグリコシル化されるか又は継代される哺乳類翻訳後修飾でなければならない。

【 0 1 2 2 】

i) 誘導性発現は、組換ペプチドの妥当な量及び濃度を達成するために必要である。誘導性システムにおいて図 1 2 に示されたように、組換タンパク質の発現は、S D S - P A ゲル電気泳動の走査により可視化できる（図 1 2 a）。細胞が非誘導性発現ベクターによ

リトランスフェクションされる場合、通常これは、SDS-PAGEにおいては明白ではないので、これはウェスタンブロットにより検出されなければならない(図12b)。

【0123】

ii) ワクチン接種ために作製された組換えペプチドのグリコシル化は、可能な限りウイルス宿主-真核生物リンパ球細胞に関する天然の典型にマッチしなければならない。数百万のそれら自身のタンパク質の中で真核細胞培養物において組換えタンパク質の十分な産生を得ることは、困難でありかつ経費がかかる。そのため、酵母株、昆虫細胞又は真核細胞の寄生システムにおいて、HIV-1エンベロープタンパク質(gp120、gp41及び全gp160)の生成を試行することが可能である。本発明者らの考えた選択肢は、トリパノソーマ原虫宿主のリーシュマニア・タレントラエであり、これは容易な操作で真核生物タンパク質の発現/フォールディング/修飾型を組合せ、かつ哺乳類に対し病原性でもない。この発現システムの主な利点は、標的タンパク質の哺乳類型の翻訳後修飾、例えばグリコシル化、リン酸化又はプレニル化などである(図13)。

10

【0124】

最も簡便な方法は、Jena Bioscience社により設計されたLEXSYcon2発現キット及びLEXInduce2発現キットからの、pLEXSYベクターファミリーにおけるHIV-1エンベロープタンパク質のクローニングである。トリパノソーマ原虫において、mRNAは、遺伝子間領域内のトランススプライシング及びポリアダニル化により、個々のmRNAへ転写後プロセシングされる、ポリシストロン性前駆体として転写される。これらの種におけるタンパク質発現の調節は、RNAレベルについて主に生じ、かつ遺伝子間領域の構造により影響を受けることがある。pLEXSYベクターにおいて、L・タレントラエにおける異種タンパク質の発現に関して最適化された遺伝子間領域が使用される(Jena Bioscience社)。

20

【0125】

pLEXSY-2ベクターは、発現カセットの染色体18S rRNA座(ssu)への組込み後に、分泌シグナルペプチド(図14のSP)を伴う又は伴わずのいずれかで、標的タンパク質の構成的発現を可能にする。従って同じベクターを、サイトゾル型発現又は分泌型発現のいずれかのために、ORFのクローニングに使用することができる。これらのベクター上にコードされたLmSAPシグナルペプチドは、リーシュマニア・メキシカナの分泌された酸性ホスファターゼ(lmsap1)の遺伝子に由来する。標的HIV-1タンパク質のORFのこのシグナルペプチドへのインフレーション融合は、LEXSY宿主における分泌型発現を可能にするが、このシグナルペプチド-コード配列の5'末端での任意の制限部位へのクローニングは、サイトゾル型発現を生じるであろう。

30

【0126】

標的遺伝子のpLEXSY発現ベクターへの挿入

pLEXSY-2ベクターは、1kbスタッパー断片の置換により、標的遺伝子カセットの方向性のある挿入を可能にする。得られたライゲーション混合物は、リーシュマニア配列に忍容性のあるコンピテント大腸菌細胞(Stb12、Stb14、XL-1、XL-10、SUREなど)の形質転換に使用される。この組換え大腸菌クローンの選択は、アンピシリンにより実行される。大腸菌における構築後、この発現プラスミドは、SwamIによる完全な消化により線状とされ、その後標的遺伝子を伴うこの発現カセットは、相同組換えによりLEXSY宿主P10の染色体18S rRNA ssu座に組込まれる。標的遺伝子挿入部位に先行する大腸菌における転写及び/又は翻訳に関するシグナルは存在せず、その結果大腸菌における遺伝子発現の欠如は、大腸菌にとって毒性であるタンパク質の構築体の作製にとって利点である。

40

【0127】

HIV-1エンベロープシグナルペプチドにより支持された構成性サイトゾル型発現又は構成性分泌型発現に関して、HIV-1エンベロープ遺伝子(シグナルペプチド、gp120及びgp41をコードするgp120、gp41及び全env遺伝子)は、NcoI(フォワード)及びNheI(リバーズ)部位を含むプライマーにより増幅され(表8

50

)、N c o I / N h e I により消化され、かつ p L E X S Y - 2 ベクターにおいてクローニングされる。そのような配置において、本標的 H I V - 1 タンパク質は、C - 末端 H i s 6 ストレッチに融合される。他方で、H I V - 1 エンベロープ遺伝子は、N c o I (フォワード) 及び N o t I (リバース) 部位を含むプライマーにより増幅され、N c o I / N h e I により消化され、かつ p L E X S Y - 2 ベクターにおいてクローニングされる。この場合、得られた標的 H I V - 1 タンパク質は、C - 末端 H i s 6 ストレッチを欠いている。

【0128】

p L E X S Y - 2 ベクターからの L m S A P シグナルペプチドにより保証された構成的分泌型発現に関して、H I V - 1 エンベロープ遺伝子 (シグナルペプチド部分を欠いている、g p 1 2 0、g p 4 1 及び全 e n v 遺伝子) は、X b a I (フォワード) 及び N h e I (リバース) を含むプライマーにより増幅され (表 7)、X b a I / N h e I により消化され、p L E X S Y - 2 ベクターにおいてクローニングされる。そのような配置において、本標的 H I V - 1 タンパク質は、C - 末端 H i s 6 ストレッチに融合される。他方で、H I V - 1 エンベロープ遺伝子は、X b a I (フォワード) 及び N o t I (リバース) 部位を含むプライマーにより増幅され、X b a I / N o t I により消化され、かつ p L E X S Y - 2 ベクターにおいてクローニングされる。この場合、得られた標的 H I V - 1 タンパク質は、C - 末端 H i s 6 ストレッチを欠いている。

注意：前述の X b a I、N c o I、N h e I 及び N o t I 制限部位は、前の (former) S U 由来の H I V - 1 亜型 A 1 e n v 遺伝子に関しては稀である。p L E X S Y - 2 ベクターのマッピングは、図 1 4 に示されている。L E X S i n d u c e 2 発現キットは、p L E X S Y _ I - n e o 2 (アミノグルコシドリリン酸転移酵素をコードする) を備え、L E X S Y 宿主 T 7 - T R におけるテトラサイクリン - 誘導性バクテリオファージ - T 7 ポリメラーゼ - 駆動した発現に適している。

【0129】

組換タンパク質発現

p L E X S Y _ I - 2 ベクターは、分泌シグナルペプチドを伴う又は伴わずのいずれかで、標的タンパク質の誘導性発現を可能にする。従って同じベクターを、誘導性サイトゾル型発現又は誘導性分泌型発現のいずれかのために、O R F のクローニングに使用することができる。これらのベクター上にコードされた L m S A P シグナルペプチドは、リーシュマニア・メキシカナの分泌された酸性ホスファターゼ (l m s a p 1) の遺伝子から誘導される。標的タンパク質の O R F のこのシグナルペプチドへのインフレーム融合は、L E X S Y 宿主における分泌型発現を可能にするが、このシグナルペプチド - コード配列の 5' 末端での任意の制限部位へのクローニングは、サイトゾル型発現を生じるであろう (図 5)。p L E X S Y _ I - 2 ベクターファミリーは、本発現力セットのリーシュマニア・タレントラエ T 7 - T R レシピエント株の染色体オルニチンデカルボキシラーゼ (o d c) 座への組込み後の標的タンパク質の誘導性発現を保証し、これは宿主 R N A ポリメラーゼ I の制御下で、バクテリオファージ T 7 R N A ポリメラーゼ及び T E T リプレッサーを構成的に発現する。第一のクローニング工程において、本標的遺伝子は、T 7 プロモーター / T E T オペレーター配置の下流で p L E X S Y _ I - 2 ベクターに挿入可能である制限部位を含むリンカー配列と共に、供給される。これらのベクターは、標的遺伝子挿入部位の側方に位置する最適化された非翻訳領域を含み、これは転写後 m R N A プロセシングのためのスプライシングシグナルを提供する。大腸菌における構築後、本発現プラスミドは線状とされ、相同組換により、L E X S Y 宿主 T 7 - T R の o d c 座に組込まれる。

【0130】

H I V - 1 エンベロープシグナルペプチドにより保証されたテトラサイクリン誘導性サイトゾル型発現又はテトラサイクリン誘導性分泌型発現に関して、H I V - 1 エンベロープ遺伝子 (シグナルペプチド、g p 1 2 0 及び g p 4 1 をコードする、g p 1 2 0、g p 4 1 及び全 e n v 遺伝子) は、N c o I (フォワード) 及び N h e I (リバース) 部位を

含むプライマーにより増幅され、NcoI/NheIにより消化され、かつpLEXSY-2ベクターにおいてクローニングされる。そのような配置において、本標的HIV-1タンパク質は、C-末端His6ストレッチに融合される。他方で、HIV-1エンベロープ遺伝子は、NcoI（フォワード）及びNotI（リバーズ）部位を含むプライマーにより増幅され、NcoI/NheIにより消化され、かつpLEXSY-2ベクターにおいてクローニングされる。この場合、得られた標的HIV-1タンパク質は、C-末端His6ストレッチを欠いている。

【0131】

該ベクター由来のLmSAPシグナルペプチドにより保証されたテトラサイクリン誘導性分泌型発現に関して、HIV-1エンベロープ遺伝子（シグナルペプチド部分を欠いている、gp120、gp41及び全env遺伝子）は、XbaI（フォワード）及びNheI（リバーズ）を含むプライマーにより増幅され、XbaI/NheIにより消化され、かつpLEXSY-2ベクターにおいてクローニングされる。そのような配置において、本標的HIV-1タンパク質は、C-末端His6ストレッチに融合される。他方で、HIV-1エンベロープ遺伝子は、XbaI（フォワード）及びNotI（リバーズ）部位を含むプライマーにより増幅され、XbaI/NotIにより消化され、かつpLEXSY-2ベクターにおいてクローニングされる。この場合、得られた標的HIV-1タンパク質は、C-末端His6ストレッチを欠いている。

【0132】

NcoI/NheI又はNcoI/NotI部位においてpLEXSYベクターファミリーにクローニングされた全HIV-1env遺伝子、又は固有のシグナルペプチドを欠き、代わりpLEXSYベクター由来のLmSAPシグナルペプチドに融合されているHIV-1env遺伝子（XbaI/NheI若しくはXbaI/NotI部位でpLEXSYベクターにクローニングされる）は、プラスミド構築体の作製に使用することができ、特にgp120配列の、種々のHIV-1ウイルス株から得られた他のgp120配列変種による迅速な置換が可能である。この目的のために追加のXbaI部位が、位置特異的変異誘発により、gp120末端とgp41始端の間でenv遺伝子配列に導入される。その後、pLEXSY::HIV-1envプラスミド構築体が、NcoI/XbaI（全env遺伝子が、NcoI/NheI若しくはNcoI/NotI部位でクローニングされる場合）又はXbaI単独（その固有のシグナルペプチドを欠いたHIV-1envが、XbaI/NheI若しくはXbaI/NotI部位においてクローニングされる場合）により消化され、gp120配列が除去される。得られたプラスミド誘導体は、NcoI（フォワード）又はXbaI（フォワード）及びXbaI（リバーズ）部位を含むプライマーでの、PCR増幅により、他のHIV-1ウイルス変異株から得られた、gp120配列のクローニングに適している。

【0133】

L E X S Y - 2 宿主及び発現株の培養

リーシュマニア属は、下記の二段階で、好気性条件下で増殖する：鞭毛を持つ前鞭毛型（昆虫宿主における野生型）及び脊椎動物宿主における無鞭毛型。インビトロにおいて、T7-TR L E X S Y - 2 宿主の両方の段階は、複合培地（L E X S Y B H I、若しくはL E X S Y Y S）又は化学的に規定された培地（合成L E X S Y 培地）中で、暗所、26℃で培養することができる。培地は、L E X S Y B H I 粉末37g/lから調製され、オートクレーブ処理され（琥珀色）、最大6ヶ月間貯蔵される。使用前に、細菌感染の防止のために、培地には、5µg/mlヘミン、及び100µg/mlペニシリン及び50µg/mlストレプトマイシンが補充される。この培地は、暗所で4℃で貯蔵され、補充後2週間以内に使用される。複合培地への血清の添加は不要であり、ウシ胎仔血清は、L.タレントラエの増殖を増強しない。前記宿主又はL E X S Y 株の増殖阻害の場合、細胞は2000gで5分間遠心し、新鮮培地中に慎重に再懸濁し、かつインキュベーションを継続する。この株は、1:10~1:50の割合で通常希釈される連続懸濁培養物として維持することができる。最良の結果は、中程度(mid-late)増殖相(OD₂~3;

10

20

30

40

50

$8 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^8$ 細胞 / ml) 時の接種により得られる。株維持に関して、10 ml 培養物を、月曜日及び金曜日に 1 : 20 で希釈し、かつ TC フラスコを直立してインキュベーションすることが都合がよい。細胞生存能は、運動している鞭毛を持つ運動型前鞭毛型として顕微鏡下で目視可能であり；死滅細胞は、丸形であるか又は破壊された形状であり、これらは運動しない。

【0134】

組換タンパク質発現培養は、懸濁培養のための、培養容量 10 ~ 200 ml の通気した組織培養 (TC) フラスコ、又は約 140 rpm でインキュベーター内で攪拌され、培養容量 50 ml ~ 1 L のエレンマイヤーフラスコにおいて、又は最大 100 L の標準バイオリアクターにおいて行うことができる。ベクター pLEXSY-neo2 に関する組換体の選択は、50 µg / ml ネオマイシンの存在下で行う。

10

【0135】

LEXSY 宿主株及び LEXSY 発現株は、20 % グリセロール中で、-80 °C で、少なくとも 1 年間貯蔵することができる。オートクレーブにかけたグリセロール (80 %) 容量の 1 / 4 及び中増殖相からの LEXSY BHI * 培地中で増殖した培養物 $4 \sim 8 \times 10^7$ 細胞 / ml (OD 1.2 ~ 1.8) の容量の 3 / 4 を、15 ml フアルコン管に加え、グリセロールと混合し、滅菌したクリオバイアルに分注する。バイアルは、室温で 10 分間維持し、その後氷の上で 1 時間、-20 °C でしばらくの間維持し、長期間貯蔵のために -80 °C に移す。グリセロールストックの再活性化に関して、クリオバイアルを、氷上で解凍し、その内容物を、補充培地 10 個に注ぎ、直立の通気フラスコにおいて、26 °C で静止位置で、培養物が不透明となるまで 2 日間、インキュベーションする。

20

【0136】

LEXSY 宿主トランスフェクションのための発現プラスミドの調製

大腸菌から得られた標的遺伝子を含む発現プラスミド 1 ~ 5 µg を、SwamI により完全に消化する。作製された大腸菌パーツを示している 2.9 kb 断片、及び LEXSY 宿主の染色体 ssu 座に組み込まれるべき標的遺伝子を伴う線状化された発現カセットを示しているより大きい断片を、アガロースゲルで泳動する。より大きい断片の発現カセットは、アガロースゲル抽出キットを用いて単離する。酵素及び緩衝塩は、PCR 精製キットにより除去することができる。あるいは、この消化物をエタノールにより沈殿し、70 % エタノールにより洗浄し、かつ最大 50 µl の滅菌 2 回蒸留水又は 10 mM トリス (pH 8) / トランスフェクションへ再溶解する。

30

【0137】

LEXSY 宿主株の電気穿孔法によるトランスフェクション

効率的トランスフェクションのために、L. タレントラエ予備培養物を、10 ml LEXSY BHI 培地中に 1 : 20 で接種し、組織培養 (TC) フラスコ中で直立して、26 °C でインキュベーションし、予備培養の 2 日後、10 ml 培地中に 1 : 10 で希釈し、同じ条件で一晩インキュベーションする。増殖培養物は、 6×10^7 細胞 / ml (OD 1.4、波長 550 ~ 600 nm、3 % ホルマリン) 含有しなければならず；これらの細胞は、生存し、かつ液滴状の形状であることは、顕微鏡により確認される。細胞は、2000 g、室温で 5 分間遠心し、上清の 1 / 2 量を除去する。このペレットは、残留する培地中に再度懸濁し (10^8 細胞 / ml)、氷の上で 10 分間放置する。最大 50 µl の水又はトリス緩衝液中 0.1 ~ 5 µg 形質転換している DNA は、並行したチューブ中で氷の上で 10 分間冷却し、氷の上に直ちに配置する。予め冷却した細胞 350 µl を、DNA の入ったチューブに加え、気泡を避けるために氷の上で d = 2 mm の電気穿孔キュベットに移す。電気穿孔のパラメータは、450 V、450 µF、パルス時間 5 ~ 6 ミリ秒である。電気穿孔後、キュベットを、氷に、正確に 10 分間戻す。その後電気穿孔された細胞を、キャピラリーにより、10 ml LEXSY BHI へ移し、26 °C で一晩インキュベーションする (約 20 時間、OD 0.3 ~ 0.4)。

40

【0138】

50

トランスジェニック L E X S Y 株の選択

発現株の確立のために、下記の二つの方法を、並行して慣習的に使用することが可能である。染色体の組込みのためにデザインされた線状化された発現カセットによるトランスフェクション後、クローン性又は非クローン性選択に由来した培養物を比較した場合、同様の発現レベルが、繰り返し認められる。しかし、環状発現プラスミドのトランスフェクションは、クローン性選択を必要とし、その理由は、これらのエピソームは、不均質様式で増幅しかつ最終的にゲノムへ組込む傾向があるからである。環状DNAによるトランスフェクション後の、懸濁培養液中の非クローン性選択は、通常低下した発現レベルを生じる。

【 0 1 3 9 】

10

固形培地上への播種によるクローン選択

L E X S Y 宿主細胞は、新たに調製したカンテンプレート上で選択する。トランスフェクションされた 1 0 m l の o / n 培養物から 2 m l のバッチを 1 ~ 4 個採取し、残りの培養物は、非クローン性選択のために並行して使用する。細胞は、2 0 0 0 g、2 0 で 5 分間遠心し、そのペレットは、残渣培地 5 0 ~ 1 0 0 μ l 中に再懸濁し、再懸濁した細胞は、5 0 μ g / m l ネオマイシンが補充された新たに調製された L E X S Y B H I カンテン上にカンテンの表面上に、配置されたニトロセルロースフィルター上に細胞を画線する方法により播種される。播種は、これらのメンブレン上で直接 1 % カンテン上よりもより容易であり、細胞の遊走 (swarming) は消滅する。それ以外に、メンブレン上の播種は、例えば蛍光スキャニング又は所与の標的タンパク質に特異的検出法による、クローン性集団の発現プロファイルの試験のために、フィルターを持ち上げることができる。プレートは、パラフィルムで密封され、2 6 で逆さまで (bottom up) インキュベーションする。

20

【 0 1 4 0 】

播種後 5 ~ 7 日目に、小さい限定されたコロニーが出現し始め、播種後 7 ~ 9 日目に、コロニーが直径 1 ~ 2 m m まで増殖した時点で、これらをピペットチップを用い、9 6 - ウェルプレート中の選択増殖培地 0 . 2 m l に移し、1 日 インキュベーションした後 - 2 4 - ウェルプレート中の選択培地 1 m l へ移すことができる。2 6 で更に 2 4 ~ 4 8 時間 インキュベーションした後、その培養物を、T C フラスコ中の選択培地 1 0 m l に増殖し (expand)、評価及び凍結保存に使用することができる。

30

【 0 1 4 1 】

懸濁培養における選択

トランスフェクション実験から得た 1 0 m l o / n 培養物が、わずかに不透明になり始めた (O D₆₀₀ 0 . 4、約 1 0⁷ 細胞 / m l ; 通常電気穿孔の約 2 0 時間後) 直後に (4 . 4 . 参照)、ネオマイシン 5 0 μ g / m l を添加し、インキュベーションを 2 6 で 7 日間継続する。組換細胞は、顕微鏡下で運動型であり、液滴様の形状であり、かつ「曇った」懸濁培養物として増殖するのに対し、陰性対照中の細胞は、選択時に、死滅し始め、顕微鏡下で鞭毛を伴わない、球形又は不規則な形状のように見える。通常、選択の 7 日目の 1 : 1 0 接種割合のネオマイシンを含む新鮮な培地への 1 回の連続転移は、抗生物質 - 抵抗性組換株化細胞の不透明な培養物を得るのに十分である。

40

【 0 1 4 2 】

ゲノム組込み及び組換 e n v ペプチド発現の確認

本発現カセットの s s u 座への組込みは、鋳型としてトランスジェニック株のゲノム DNA を使用する、診断的 P C R 又は配列決定により確認することができる。p L E X S Y _ I - 2 ベクター診断的 P C R (アニーリング温度 5 5) は、抗生物質耐性カセットフォワードプライマー及び o d c リバースプライマー P 1 5 1 0 により行う (表 9)。本発現カセットの o d c 座への組込みは、対照反応においては認められない特徴的断片 (各々、1 . 9 又は 2 . 0 k b p) を生じる。加えて、o d c フォワードプライマー A 1 3 0 4 及び a p r t リバースプライマー A 1 7 1 5 (標的遺伝子の 5 ' u t r 内にハイブリダイズする) により、診断的 P C R (アニーリング温度 6 0) を行うことができる。本発現

50

カセットのodc座への組込みは、特徴的1.1kb断片を生じるが、対照反応においては得られず、ここで鑄型は、LEXSY宿主株の発現プラスミド又はゲノムDNAである。

【0143】

組換えLEXSY株における標的タンパク質の発現は、細胞抽出物の、又は分泌型発現の場合は上清のアリコートの、SDS-PAGE及びウェスタンブロットにより評価する。最適な発現を得るために、任意に種々のテトラサイクリン濃度、各個別のタンパク質の培養条件及び収穫時間での、平均1µg/mlのテトラサイクリン発現の誘導にキャリアレーションされる。

【0144】

【表9】

表9：LEXS induce 2キット(Jena Bioscience社)に利用可能なプライマーの配列

プライマー	5' - 3'ヌクレオチド配列	
挿入断片配列 決定フォワード P1442	CCG ACT GCA ACA AGG TGT AG	5' utr aprt を備える全「AP」 発現ベクター
挿入断片配列 決定リバース A264	CAT CTA TAG AGA AGT ACA CGT AAA AG	全LEXSI 発現ベクター
odcフォワード プライマー A1304	TCC GCC ATT CAT GGC TGG TG	全odc発現ベクター の診断的組込み
aprtリバース プライマー A1715	TAT TCG TTG TCA GAT GGC GCA C	5' utr aprt を伴う全aprt発現 ベクターの診断的組 込み
neoフォワード プライマー A1432	GCA TGG CGA TGC CTG CTT GC	全odc発現ベクター の診断的組込み
odcリバース プライマー P1510	GTG CAC CCA TAG TAG AGG TGC	全ssu組込みベク ターの診断的組込み

【0145】

8. 組換えHIV envペプチドの生成及びクロマトグラフィー精製

タンパク質生成に関して、本組換え株は、複合LEXSYプロスBHI(Jena Bioscience社)において、OD₆₀₀ D2(10⁸細胞/ml)まで増幅される。このタンパク質生成は、新鮮な培地に細胞を移して1時間後の、5mg/l テトラサイクリンの添加により誘導され、かつこの培養物は、Multitron IIインキュベーター-振盪機(Infors AG社、スイス)において130rpmで攪拌しながら26℃で、24~72時間、ODが約1.8に達するまで、インキュベーションされる。培養物上清中及び細胞中の組換えgp120の存在は、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS-PAGE)の存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウェスタンブロットにより決定する。N-グリコシル化の存在の確認のために、本発明者らは、培養物上清又は細胞を、N-グリコシダーゼで処理し、かつ処理したタンパク質の電気泳動移動度を分析する。

【0146】

タンパク質を発現しているリーシュマニア細胞は、2500gで10分間遠心し、その

ペレットを、20 mM トリス (pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、1 mM PMSF 中に再懸濁する。この細胞溶解液は、20 kHz で、超音波処理機を用い、19 mm 探針による、氷中で1分間10回のパルス適用が、パルス間の間隔2分間で行われる。透明化された上清を収集し、0.45 µm 細孔メンブレンを通して濾過し、アガロースに結合されかつニッケルで帯電されたニトリロ三酢酸 (Ni-NTA) を使用する、不動化された金属イオンを含むクロマトグラフィーカラム (GE Healthcare 社) における、組換え gp120 のアフィニティ精製に使用される。簡単に述べると、この Ni-NTA カラムは、20 mM トリス (pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、1 mM PMSF の緩衝液の3容量で、流量 1 mL / 分ですすがれる (LC Akta Prime Plus 社, GE Healthcare 社)。次にこのカラムに、流量 0.25 mL / 分を利用し、組換え gp120 (r-gp120) を含有する濾過した上清が充填される。充填後、このカラムは、洗浄緩衝液 (20 mM トリス-HCl、500 mM NaCl、5 mM イミダゾール、pH 7.4) の3容量ですすがれる。この r-gp120 は、カラム内部のエンテロキナーゼにより切断され、ポリヒスチジン尾部を除去する。この目的のために、Ek の1国際単位 (IU) が、10 mM トリス-HCl、10 mM CaCl₂、pH 8.0 を含む緩衝液中のカラムへ導入され、この切断反応は、25 °C で18時間進行される。あるいは、ポリヒスチジン尾部により標的化されたタンパク質は、イミダゾール勾配 (150 mM NaCl を含有する 100 mM トリス-HCl (pH 8.0) 中の 0 ~ 0.5 M イミダゾール) 中で溶離される。タンパク質含有画分はプールされ、限外濾過により濃縮される。画分は、SDS-PAGE / 銀染色及び抗-Hit gp120 抗体によるウェスタンブロットにより分析される。r-gp120 含有画分は、プールされ、0.1 M トリス-EDTA 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析され、標準アプローチ [2] を使用し、同じ緩衝液で平衡とされた陰イオン交換カラム (Q-PEEK 10µm AXC Biosuite, Waters 社) 上に装加される。このタンパク質は、0 ~ 1 M NaCl の勾配により溶離される。r-gp120 含有画分は最終的に、Sephacryl S-200 HR (GE-Healthcare 社) を使用するゲル濾過により精製される。

【0147】

精製された rhEPO の N-末端配列決定は、自動エドマン分解により実行される。精製されたタンパク質の濃度は、BCA アッセイにより決定される。タンパク質発現及び精製の種々の段階を通じて得られた画分の分析は、SDS-PAGE により実行される。本タンパク質バンドは、クマーシーブリリアントブルー R-250 又は銀染色により可視化される。

【0148】

a. ワクチン送達のビヒクルとして立体的に安定したリポソームを使用する、HIV 予防ワクチン免疫ブースト組成物の調製

最も一般的には「ワクチン」と称される、将来の該疾患と接触する可能性のある症例において、いくつかの細菌又はウイルス感染症に対する特異的免疫応答を提供する目的で、経口 (os)、又は皮下、筋肉内、静脈内のいずれかによる投与のための任意の医薬品は、多くの必要要件を満たさなければならない。これらの必要要件の主なものは：

- iii) 免疫応答が、ある種の病原性微生物又は感染症に対し高度に特異的であること；
- iv) 免疫応答が、疾患症状の出現を妨げるよう、この特定の感染症の発症と闘うのに十分に強力であること；
- v) 免疫応答が、長期間、数ヶ月及び数年間持続すること；
- vi) 前述の全てにもかかわらず、本ワクチンは、ヒト生物に関して反応原性 (免疫毒性) でないこと；である。

【0149】

本発明の HIV 予防ワクチンの有効性は、これを、免疫賦活剤又は免疫原性担体、例えばアジュバントなどと会合することにより増強される。未変性の HIV env タンパク質混合物に加え、gp120 糖鎖付加された組換え型は、高度に免疫原性であり、皮下に接種されることを容易に忍容できず、それら自身により強力な免疫反応をもたらす (実施例

4)。しかし、全ての純粋なタンパク質に関して、生物におけるそれらの生分解は、迅速であり、かつペプチドが、任意の保存剤若しくはプロテアーゼインヒビターアジュバントと固定されない場合、免疫応答は2～3週間以内に使い果たされる。本発明者らの最初の考えは、envペプチドを分解から保護し、細網内皮系に不可視であるよう、それらを立体的に安定化されたリボソーム(SSL)にパッケージすることであった。しかしマウスにおける極初期の実験から、SSLは、十分に長いことができるある期間装荷されるか又は結合されたペプチドを保持することができ、かつそれらの急性免疫毒性を減少することができるが見出された。ペプチドに関して、立体的に安定化されたリボソームのプラットフォームは、アントラサイクリンのリボソーム薬剤形状に関して示されたように、低い総免疫毒性及びより良い薬力学(薬剤の適時放出)の利点に順応する。リボソームペプチドは、正に細胞増殖抑制剤又は他の低分子量剤のようにゆっくりSSLの外側で誘発され得る。即時型免疫反応の阻害は、単回投与のためのペプチド用量の増加、及び長い十分にブーストされた免疫化のためのウイルスenvペプチドのMHCとの接合部接触の延長を可能にする。この方法のSSLは、免疫ブーストアジュバントとして及びワクチン送達システムとして同時に活用される。

10

【0150】

従って本発明の効果的な組成物の具体的製剤は、該製剤が投与される際に被験者において、アジュバントを生分解性、安全かつ有効とするのに適した様式で実行されてよい。二つの考え方が更に説明される：

i) envペプチド混合物は、立体的に安定化されたリボソーム(SSL)に装荷される；

20

ii) envペプチドは、SSLのPEG-活性化された基に共有的に連結される；

iii) 可能性のある構築体(pNL3-4、IRIVなど)のピロソーム上に提示されたenvペプチド。

【0151】

i) 立体的に安定化されたリボソーム調製品及びペプチド装荷

立体的に安定化されたリボソームは、リン脂質：コレステロールがおよそ7：3及び0.2～0.5mol/%ポリエチレングリコール-ジステアロイル(ホスファチジル)エタノールアミン(PEG-DSPЕ)からなる混合物からの、クロロホルムの真空乾燥法、及び窒素流下でのベシクル形成[40]を用いて調製される。使用される脂質混合物は：DOPC/Chol/DSPЕ-PEG350、DOPC/Chol/DSPЕ-PEG400などである(Avanti Polar Lipids社、バーミングハム、AL)。本リボソームの主成分は、ジオレオイル-ホスファチジルコリン(DOPC)であり、これは卵黄、脳組織又はダイズ豆などの天然の給源から抽出されるか、又は合成により調製することができる。コレステロールは、リボソーム膜内のリン脂質二層を安定化するために必要であり、PEG-PEGは、膜の安定性及び硬度を提供し、これは懸濁液中のリボソームが融合及び分解することを防ぎ、かつこれらが数ヶ月間それらのサイズ分布及び漏出を伴わずに内側に装荷された物質を保存することができるようにする。SSL中のPEGの理想的分子量は、400～700であり、1000～2000のより長いPEG鎖は、リボソーム膜の硬度が、それらの内容物送達に必要なものよりも高くなり、かつ長いPEG SSL組成物は自己生分解の必要要件を満たさないので、SSLデザインにおいては利点ではない。DSPЕ-PEGの割合は、望ましい特性のリボソームを得るための細かい調整の主なものである。

30

40

【0152】

乾燥脂質は、有機溶媒-クロロホルム又はエタノール-クロロホルム-中で混合され、これらは次に回転蒸発器(Buchi R-200)において蒸発され、薄い脂質フィルムが形成される。リボソーム懸濁液は、溶解した物質(例えば50mM NaH₂PO₄、400mM NaCl、pH8.0)を含む水性緩衝液中に更に水和され、300～400rpm、温度+45で、30分間の攪拌時に調製される。大型多層ベシクル(MLV、300nm～1μm)及び小型単層ベシクル(SUV、80～250nm)の混合物が、生成される

50

。ペプチドなどの任意の水溶性物質の送達に関して、小型単層ベシクルが必要であり、従って超音波処理（600 mV、Avanti Polar Lipids社）、及びポリカーボネート0.4～0.2～0.1 μmメンブレン（Avanti Polar Lipids社）を通るフィルター押出の数回のサイクルが実行される。加えて、0.2～0.1 μmメンブレンを通る無菌条件（層流（laminar））及び無菌のシリンジ、メンブレン及びフラスコ）での押出は、免疫化にそのまま使用できる調製品を生じる。水性懸濁液中のリボソームのサイズ分布及び安定性は、DLS Nicomp - 380装置を使用する、動的光散乱レーザーサブミクロン粒子サイズ分析法により決定される（図17）。

【0153】

免疫化のための組換えペプチドの混合物は、脂質フィルムの水和の段階で、リボソーム組成物に導入され、ペプチド混合物は、リン酸緩衝食塩水中に溶解され、リボソームベシクルの内側水相として装荷され始める[40]。押出プロセス後、SSLは、Sephacryl S-200HR及びAkta Prime LCシステム（GE Healthcare社）を使用する、サイズ排除ゲル濾過クロマトグラフィーにより移行され、かつベシクルの外側に出現した過剰なペプチドは、分離されかつカラム内に留まる。その後SSL懸濁液は、必要ならば透析により濃縮され、免疫化にそのまま使用できるワクチン組成物を含む。

【0154】

SSLワクチン組成物の皮下投与は、MHCリボソームに対し中性の範囲外の（out of neutral）env組換えペプチドの誘発の遅延のために、免疫化作用を阻害することがある。このプロセスは、感熱性リボソーム-tSSLを用いて、調節することができる。tSSLは、特別な量的組合せのメンブレン成分、又はリボソーム膜を温度がある温度、通常40～45℃に到達すると直ちに融解するようにする、いくつかの追加のリン脂質成分を伴い、他のものから識別される。局所的加熱時に、感熱性リボソームは、破壊され、それらの内容物-ペプチド-は、その組織の外側に負荷される。例えば通常の立体的に安定化されたリボソームは、融解温度約54～58℃を有し、脂質フィルム形成のための乾燥重量混合物は、ホスファチジルコリン：コレステロール：ジステアロイル-ホスファチジルエタノール-アミン-PEGからなり、その比は、PC：Chol：DSPE-PEG-400について6.85：2.75：0.4（最大0.5）モル/%であり、及びより長いPEG鎖PC：Chol：DSPE-PEG-2000について6.9：2.95：0.15（最大0.25）モル/%である。感熱性リボソームを調製するために、本研究者らは、いくつかのパラメータを変動することができ、第一に混合物中の脂質の比を、各々、コレステロール量を27～29モル/%から30～35モル/%に増加し、PE-PEGの割合を2～5モル/%から1.5～2モル/%へ減少する。リボソーム膜を柔らかくし、かつそれらの融解温度をより低い温度にシフトする別法は、より短い脂肪酸尾部のリン脂質を使用することであり、これは：ジミリストイル-ホスファチジルコリン（DMPC、C-14）、ジステアロイル-ホスファチジルコリン（DSPC、C-16）、又はDOPCの同等部の代わりに、むしろDMPC若しくはDSPCの30～40モル/%である。

【0155】

ii) SSLのPEG-活性化された基に結合するenvペプチド；

env組換えペプチド脂質混合物のためのリボソーム担体の第二の型は、ペプチドの結合のために活性化されたより長いDSPE-PEG2000型を表している：PDP-PEG2000-DSPE/Chol/DOPC、マレイミド（フェニルブチレート）-PEG2000-DSPE/Chol/DOPC、p-ニトロフェニル（カルボニル）-PEG2000-DSPE/Chol/DOPC。これらの脂質混合物中のPEG-2000の濃度は、1.5～2モル/%を超えてはならず、その理由は比較的長いポリエチレングリコールは、比較的短い型よりもより効果的にリボソーム安定性を増大し、かつ同じ濃度は、ワクチン放出には余りにも硬いリボソーム膜及び脂質の有害な生分解を生じるからである。

【0156】

PEGの活性化された遠位端[38]とのペプチド複合の第一の方法は、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.0 ~ 5.0) 中の脂質 25 ~ 40 mg につきペプチド 1 mg の比での、リポソーム懸濁液中のペプチドアミノ基による、p - ニトロフェニル (カルボニル) - PEG - 2000 - DSPE 反応である (総懸濁液量は 5.5 ~ 9 ml)。反応は、NaOH 添加により、pH を 7.5 ~ 8.5 に上昇することにより終結され、かつ特別なペプチド処理は不要である。

【0157】

マレイミド - PEG - 2000 - DSPE との方法[39]は、Trauttt 試薬 (2 - イミノチオラン) による先行するペプチドチオール化が必要である。ICG - 25 1 mg を、Na₃BO₃ 及び EDTA を含有するホウ酸緩衝液に溶解し、次に乾燥 Trauttt 試薬 50 ~ 70 µg を添加し、この混合物を、室温で 1 時間インキュベーションし、次に過剰なタンパク質を、PBS (pH 8.0) との同時緩衝液交換を伴う限外濾過により洗浄する。サイズ及び装荷された細胞増殖抑制剤濃度が均質であるリポソーム画分は、Sepharose CL - 6B (GE Healthcare 社, スウェーデン) での液体クロマトグラフィーにより抽出される。

10

【0158】

PDP - PEG - PE 含有リポソームに結合する ODN - HIV env ペプチド

PDP - ペプチド誘導体の調製のために、ペプチドを、25 mM HEPES、140 mM NaCl、pH 7.4 に、濃度 10 mg / ml で溶解し、次にこのペプチド溶液に、DMF 中の 25 mM スクシンイミジル - 4 - MPB (SMPB) 溶液を、モル比 20 : 1 (SMPB : ペプチド) までゆっくり添加し、室温で 30 分間インキュベーションする。未結合の SMPB は、25 mM HEPES、25 mM MES、140 mM NaCl (pH 6.7) 緩衝液中での、Sephacryl S - 200 HR カラム (GE-Healthcare 社) を使用するゲル濾過により、比較的低い pH で除去される。

20

【0159】

PEG 鎖の遠位端のピリジルジチオ基は、ジチオスレイトール (DTT) の最終濃度 20 mM までの添加、及び室温で 30 分間のインキュベーションにより、減少される。DTT は、25 mM HEPES、25 mM MES、140 mM NaCl (pH 6.7) で溶離された Sephadex G - 25 カラム上のリポソームの通過により、上昇した pH 中で分離される。チオール化されたりポソームは、MPB - ペプチド誘導体と共に、ペプチド / 脂質比が約 1 : 1000 で、室温で一晩インキュベーションされる。未結合のペプチドは、25 mM HEPES、140 mM NaCl (pH 7.4) により、Sephacryl S - 200 HR カラムを通りリポソームが通過する、ゲル濾過により除去される。

30

【0160】

COOH - PEG - PE - リポソームに結合する ODN - HIV env ペプチド

MES 緩衝液 (pH 4 ~ 5.5) 中の HO₂C - PEG - PE - 含有リポソームの懸濁液の 300 µl (合計 3 µmol 脂質) へ、水中の 0.25 M 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチル - アミノプロピル) カルボジイミド溶液の 120 µl、及び 0.25 M N - ヒドロキシスルホスクシンイミド 120 µl を添加する。この混合物を、室温で 10 分間インキュベーションし、1 M NaOH により pH 7.5 に中和する。HIV env ペプチド 15 µM を、活性化されたりポソームへ添加し、この反応混合物を、穏やかに攪拌しながら、4 で 8 時間インキュベーションする。ペプチド - 結合されたりポソームを、PBS により予め平衡とされた Sephadex S - 200 HR カラム (GE Healthcare 社) 上の未結合のペプチドから分離される。空隙容量で溶離されたペプチド - 結合されたりポソームのピーク画分を収集し、プールし、必要ならば食塩水により必要な容量に希釈する。

40

【0161】

リポソーム組成物 DOPC / DOGS - NTA - Ni / Chol / DSPE - PEG - 2000 において、env ペプチドを、PC 尾部と PEG - DSPE 尾部の間に定着 (settle) されたニッケル - 修飾されたリン脂質に結合することも可能である。しかし、DOG

50

S - N T A は、粘膜及び他の B - リンパ球免疫応答を刺激することはわかっているにもかかわらず、e n v ペプチドの P E G 位置の下側への隠蔽は、その抗 - H I V 特異性を弱める。この方法は以下に説明されている。

【0162】

この複合反応において、組換 (H i s) 6 - ペプチド (10 ~ 80 μ g) は、総容量 50 μ l のリン酸緩衝液 (50 mM NaH₂PO₄、400 mM NaCl、pH 8) 中で、リボソーム (1 μ M) と一緒に、回転振盪しながら、37 °C 又は室温で 30 分間インキュベーションされる [17]。リボソームへのタンパク質複合は、複合反応の終了時の遊離タンパク質の量の測定により、間接的に定量される。未結合のタンパク質は、Microcon - 100 遠心装置を用いて分離される。遠心分離の前に、このリボソーム - ペプチド混合物は、リン酸緩衝液中に最終容量 250 μ l に希釈される。12,000 g で 13 分間の遠心分離後、濾液 20 μ l を、遊離タンパク質含量について、micro - BCA アッセイを用いてアッセイされる。リボソームに結合したペプチドの量は、使用される総量から遊離タンパク質の量を減算することにより、決定される。このリボソームに結合している H i s - タンパク質の間接定量法は、リボソーム - 結合したペプチドが、Sepharose - 200 HR ゲルマトリックス (GE Healthcare 社) において、遊離タンパク質のサイズ排除ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離後、micro - BCA アッセイを用い直接定量される直接法と比較し、同じ結果を生じる。

【0163】

iii) 可能性のある構築体 (pNL3 - 4、IRIV など) のピロソーム上に提示された e n v ペプチド

小型のウイルス及びそれらで構築されたベクターは、e n v ペプチド H I V ワクチンの発現及び提示に使用することが可能である。ピロソームは、予防ワクチン技術にあまり適してはならず、かつ H I V - 特異的免疫ブースト作用は、いずれの場合にも、ワクチン送達の新技術がもたらすものよりも低い。このワクチン組成物は、小型ウイルス表面 - ピロソーム - 上に発現された H I V e n v ペプチドのみを含み、ウイルスベクターにおいて送達された e n v ペプチドの遺伝子は含まない。アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルスのような大型ウイルスは、ピロソームの候補としては良好ではなく、その理由はこれらは、それらのキャプシド上に発現された数百のペプチドを有し、かつこれらは投与後に特異的よりもむしろより非特異的に免疫応答をブーストするからである。ピロソームベクターは、欠損 H I V 誘導体 pNL3 - 4、マラリア及び A 型肝炎ワクチンにより有効性が証明されたインフルエンザベクター I R I V、麻疹ウイルス誘導体、種々の脳炎病原体のウイルス、黄熱病ウイルスのベクター及びその他の可能性のある変種を含む。

【0164】

本発明のアジュバント及びアジュバント - 含有ワクチン組成物が有用に投与される宿主動物は、霊長類に加え、齧歯類又は他の哺乳類を含む。B a l b C マウスは、初回免疫応答ブーストバリデーションに使用された。アジュバント装荷している 2 種のリボソームは、個別に使用され、かつ種々の割合で一緒に混合されることができる。

【0165】

3 週齢の B a l b C マウスに、該動物にとって純粋なペプチドの投与量 20 ~ 50 μ g が皮下的に免疫化され、乾燥脂質 M W のための懸濁液中のアジュバント濃度は、5 mg / ml である。各群には、7 ~ 8 匹又はそれよりも多いマウスが含まれる。この免疫化は、開始時固形食を摂食しかつ体重 11 ~ 14 g である動物について 3 週齢マウスで初回、5 週齢になった後 2 週間 2 回目、マウスが 9 週齢になった時 1 ヶ月後に 3 回目が行われる。組換 g p 120 及びそのドメイン並びに組換 g p 41 及びそのエクトドメインは、個別に又は一緒に組成物を完成するために使用される。H I V e n v ペプチド抗体の力価は、r - g p 120 (g p 110、g p 160) 変種、ファージミドライブラリーバイオパンニングに関して先に使用された r - g p 41、更には未変性の H I V タンパク質混合物で、E L I S A により測定される。E L I S A 試験は、最後の皮下投与後、3 日目、14

日目及び28日目に行われる。結果の一部は、実施例4に示されている。

【0166】

二つの主要な結論を、マウスの実験から引き出すことができる：

1. B a l b C マウスにおいて皮下接種される、g p 1 2 0 及び全てのその誘導体、組換え体に加え未変性のペプチドは、高度に免疫原性であり、かつ強力にH I V - 特異的及び延長された免疫応答を誘発する。同じ様式で接種された組換えg p 4 1 及びそのエクトドメイン変種は、数倍低い力価の特異的モノクローナル及びポリクローナル抗体を誘発する。A b 力価の同じ状況が、H I V - 感染したヒト血清中において、及びファージM 1 3 上のA b ライブラリー提示において認められる。患者において、この状況は、ウイルスエンベロープ中のg p 1 2 0 下流(under)のg p 4 1 の内側位置で提供される。しかし、組換えタンパク質免疫化による同じ現象は、H I V 予防ワクチン開発のために、g p 1 2 0 配列及びその組換え体の代表の正しいアイデンティフィケーションが重要であり、かつg p 4 1 は、複合ペプチド「材料」として使用されるが、その配列の異形はあまり重要でないという本発明者らの立場を証明する。

10

【0167】

2. リポソームアジュバント組成物は、ペプチドのみの免疫化よりもより長い期間免疫応答ブーストを提供することができ、かつ同時に即時型免疫毒性反応を縮小することができ、その結果H I V - 予防的反応発生のために、ペプチド投与量を増加することができる。

本発明のアジュバント及びワクチン組成物に関する投与量の割合及び好適な剤形は、通常の抗体力価決定技術及び通常の生体有効性/生体適合性プロトコルの使用により、並びに特定のアジュバント型、望ましい治療作用、及び望ましい生体活性期間に応じて、過度な実験をすることなく、当業者により容易に決定されることができる。本ワクチン及びその成分の投与は、皮下注射、経皮、経真皮、鼻腔内及び筋肉内投与などの非経口法を含んでよい。

20

【0168】

開発されたH I V 予防ワクチンは、H I V - 抗体ライブラリーがその選択及び作製のために試行された感染者のコホートのH I V 変異株から蔓延した感染症に対するその活性に関して、個別化された医薬品に至る途中の工程である。本ワクチンは、単独のかつて開発された組成物として、蔓延しているH I V 感染症に対する普遍的武器として働くことはできない。しかし25年間にわたるH I V 研究及びA I D S との戦いで集められた全てのH I V 疫学の知識は、その実践的開発に対し多くの支持をもたらすであろう。

30

【実施例】

【0169】

実施例1：下記電気泳動データは、H I V - 特異的S c F v 抗体の断片作製を含む、ヒト組換えI g G ファージミドライブラリーの段階を図示している（ファージディスプレイ技術）：

P C R - I 結果 - 対応する部分的C 又はC L 断片を伴う、 - 及び - 可変部。
ゲルから切り出した関心対象のバンドには、矢印で印をつけている。

略号：1 V L - 部分的C L 断片を伴う 可変部

40

2 V L - 部分的C L 断片を伴う 可変部

1 V K - 部分的C 断片を伴う 可変部

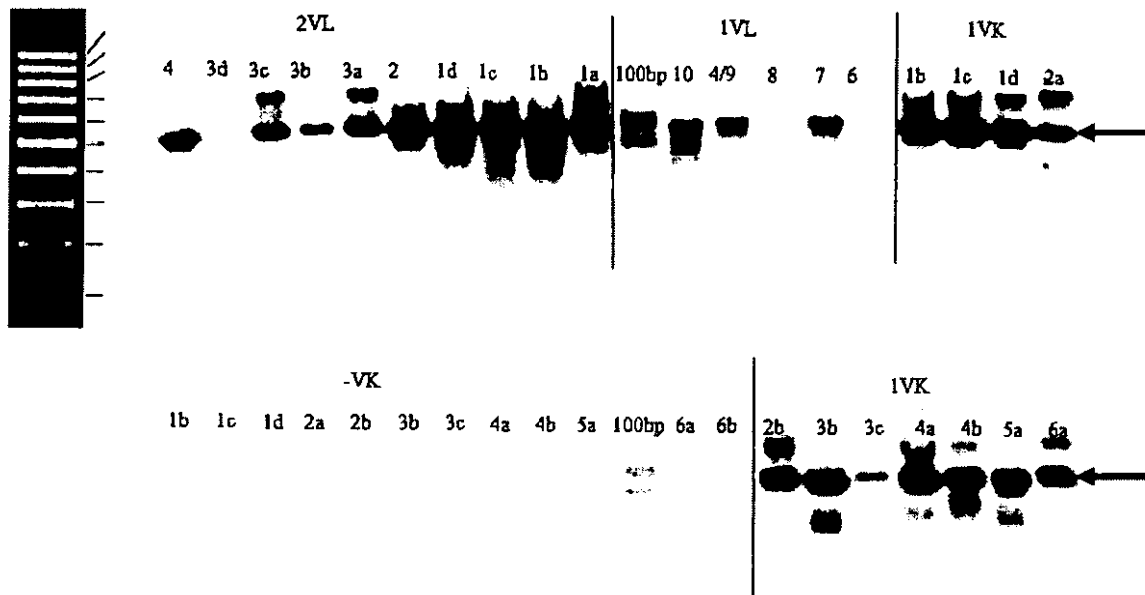
1 a - 1 0 - 種々のプライマー対

- V K - P C R 陰性対照

1 0 0 b p - GeneRuler(商標)100bp DNAラダー (Fermentas社)

GeneRuler(商標)、100bp DNAラダー

【化 1】



10

20

【 0 1 7 0 】

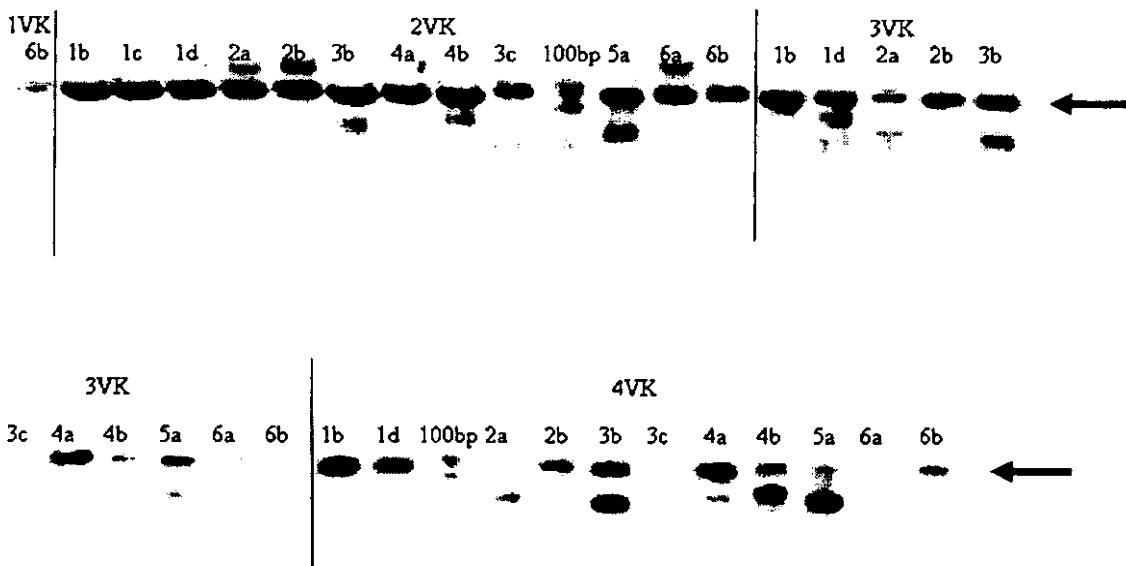
P C R - I 結果 - 部分的 C 断片を伴う 可変部、ゲルから切り出した関心対象のバンドには、矢印で印をつけている。

1 a - 1 0 - 種々のプライマー対 1 V K (2 V K、3 V K、4 V K)

部分的 C 断片を伴う 可変部

1 0 0 b p - GeneRuler (商 標) 100bp DNA ラダー (Fermentas 社)

【化 2】



30

40

【 0 1 7 1 】

P C R - I 結果 - 部分的 C L 断片を伴う 可変部、並びに部分的 C H 1 断片を伴う I g M 及び I g G 重 (H) 鎖可変部、ゲルから切り出した関心対象のバンドには、矢印で印をつ

50

けている。

1 VL - ライブラリー 1、部分的 CL 断片を伴う 可変部

1 VHM (2 VHM、3 VHM、4 VHM) - 部分的 CH 1 断片を伴う重鎖可変部 (Ig M)

1 VH G (2 VHM、3 VHM、4 VHM) - ライブラリー 1、2、3、4、部分的 CH 1 断片を伴う重鎖可変部 (Ig G)

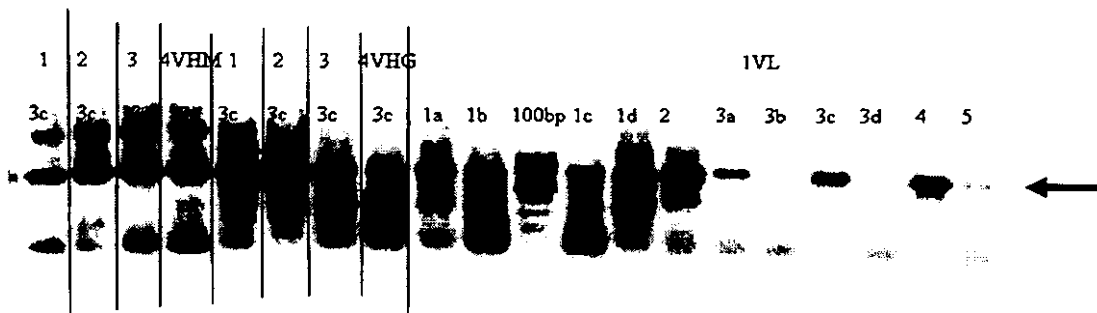
1 a - 1 0 - 種々のプライマー対

- VL ; - VH G ; - VHM - PCR 陰性対照

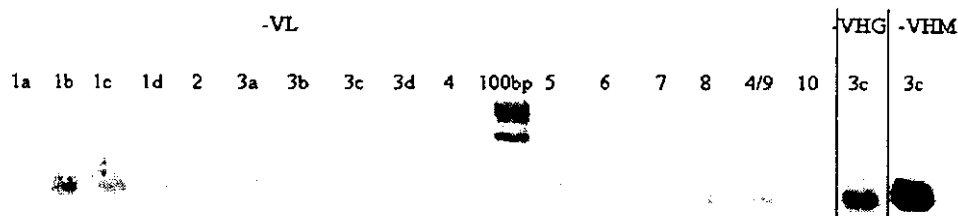
1 0 0 b p - GeneRuler(商標)100bp DNA ラダー (Fermentas 社)

【化 3】

10



20



30

【 0 1 7 2 】

PCR - II 結果 - ((Gly)₄ Ser)₃ をコードする、追加されたリンカー断片を伴う重 (H) 鎖可変部、ゲルから切り出した関心対象のバンドには、矢印で印をつけている。

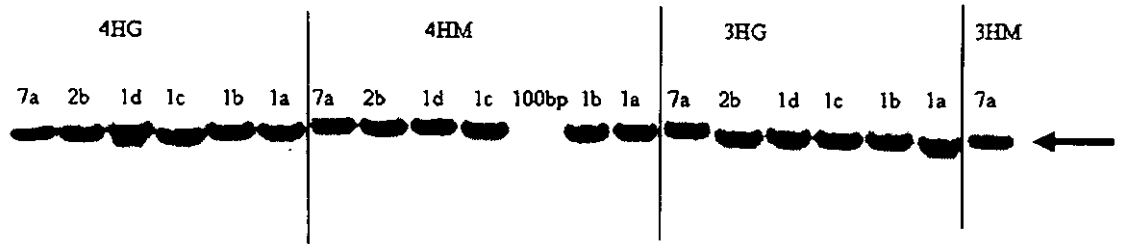
1 HG (2 HG、3 HG、4 HG) - ライブラリー 1、2、3、4、Ig G cDNA プール由来の重鎖可変部；

1 HM (2 HM、3 HM、4 HM) - ライブラリー 1、2、3、4、Ig M cDNA プール由来の重鎖可変部

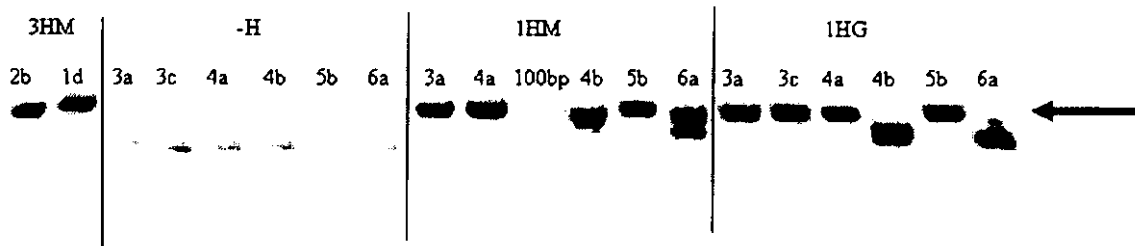
1 a - 7 a - 種々のリンカー - 含有するプライマー対

- H - PCR 陰性対照

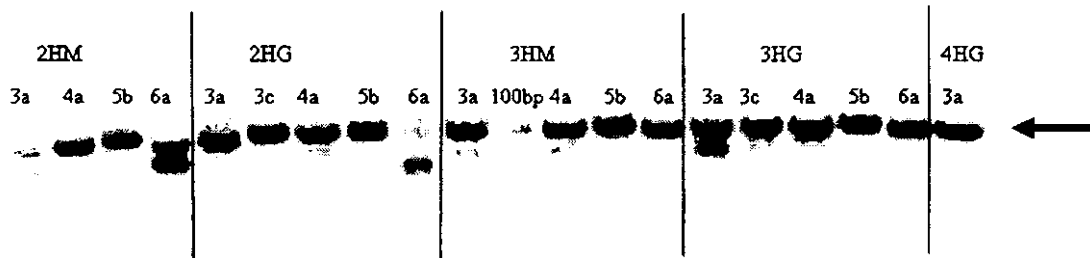
【化 4】



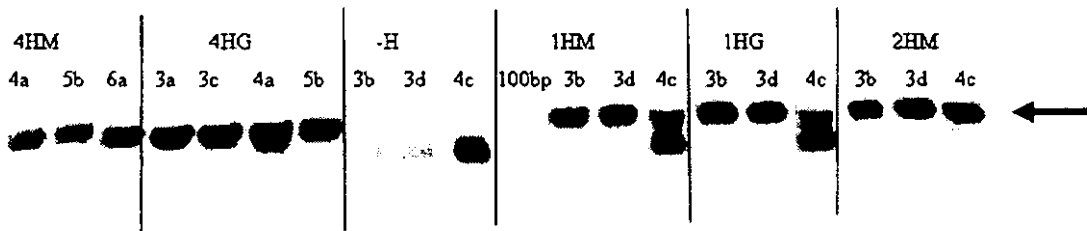
10



20



30



40

【 0 1 7 3 】

PCR - II 結果 - $((Gly)_4Ser)_3$ をコードする、追加されたリンカー断片を伴う - 及び - 可変部、ゲルから切り出した関心対象のバンドには、矢印で印をつけている。

1 K (2 K、3 K) - ライブラリー 1、2、3、 可変部

1 L (2 L、3 L、4 L) - ライブラリー 1、2、3、4、 可変部

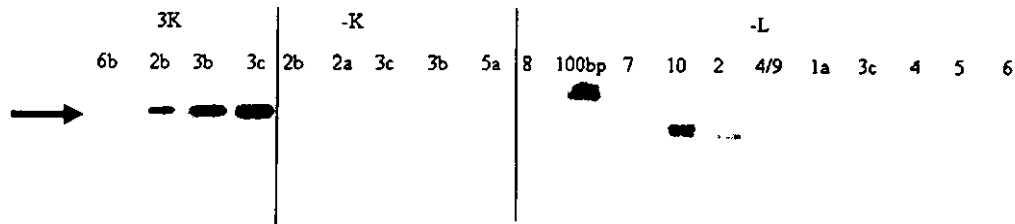
50

1 a - 8 - 種々のリンカー - 含有するプライマー対

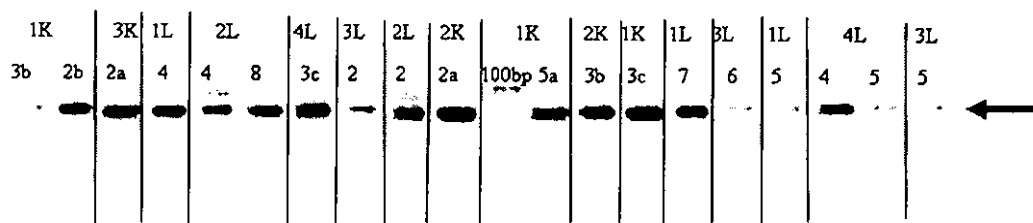
- K 及び - L - P C R 陰性対照

1 0 0 b p - GeneRuler(商標)100bp DNAラダー (Fermentas社)

【化 5】



10



20

【 0 1 7 4 】

P C R - I I 結果 - ((G l y) ₄ S e r) ₃ をコードする、追加されたリンカー断片を伴う - 、 - 、及び重鎖 (H) 可変部、関心対象のバンドには、矢印で印をつけている。

1 K (2 K 、 3 K 、 4 K) - 可変部

1 L - ライブラリー 1 、 可変部

2 H G (3 H G 、 4 H G) - ライブラリー 2 、 3 及び 4 、 I g G c D N A プール由来の重鎖可変部 ;

3 H M (4 H M) - ライブラリー 3 及び 4 、 I g M c D N A プール由来の重鎖可変部

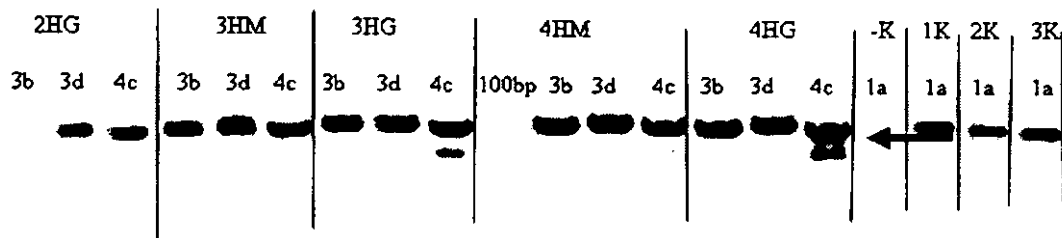
30

1 a - 8 - 種々のリンカー - 含有するプライマー対

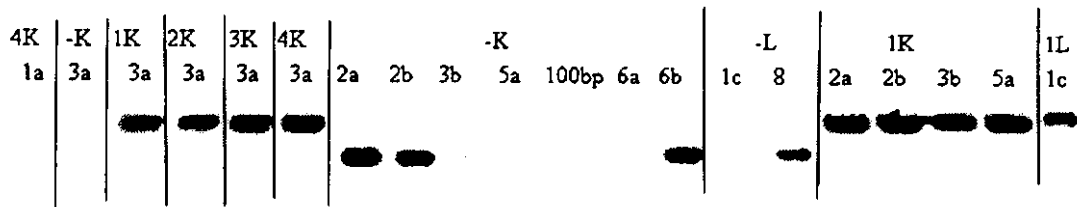
- K 及び - L - P C R 陰性対照

1 0 0 b p - GeneRuler(商標)100bp DNAラダー (Fermentas社)

【化 6】



10



20

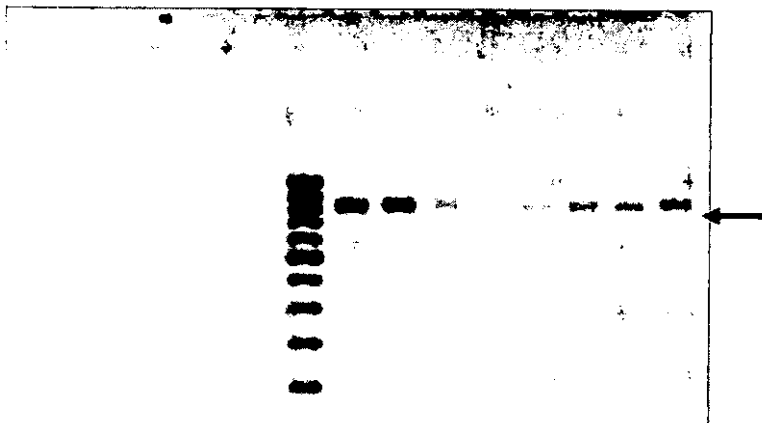
【 0 1 7 5 】

集成された S c F v 断片のゲル定量。種々の V_H - リンカー - V_{kappa} S c F v 変種 (ライブラリー 4)

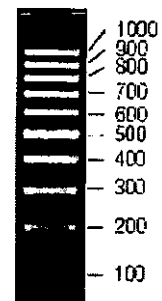
【化 7】

H1a — V_{H1a} -リンカー- $V_{kappa mix}$ ScFv 変異体

H1a H1b H1c H1d H2a H2b 100 H3a H3b H3d H4a H4b H5b H6a H7a
bp



GeneRuler™ 100 bp
DNA Ladder



30

40

【 0 1 7 6 】

V_H - リンカー - V_{kappa} S c F v 混合物 (ライブラリー 4 由来) の再増幅。ゲルから切り出した関心対象のバンドには、矢印で印をつけている。

- 100 bp V_H - リンカー - V_{kappa} S c F v 混合物

【化 8】

K



10

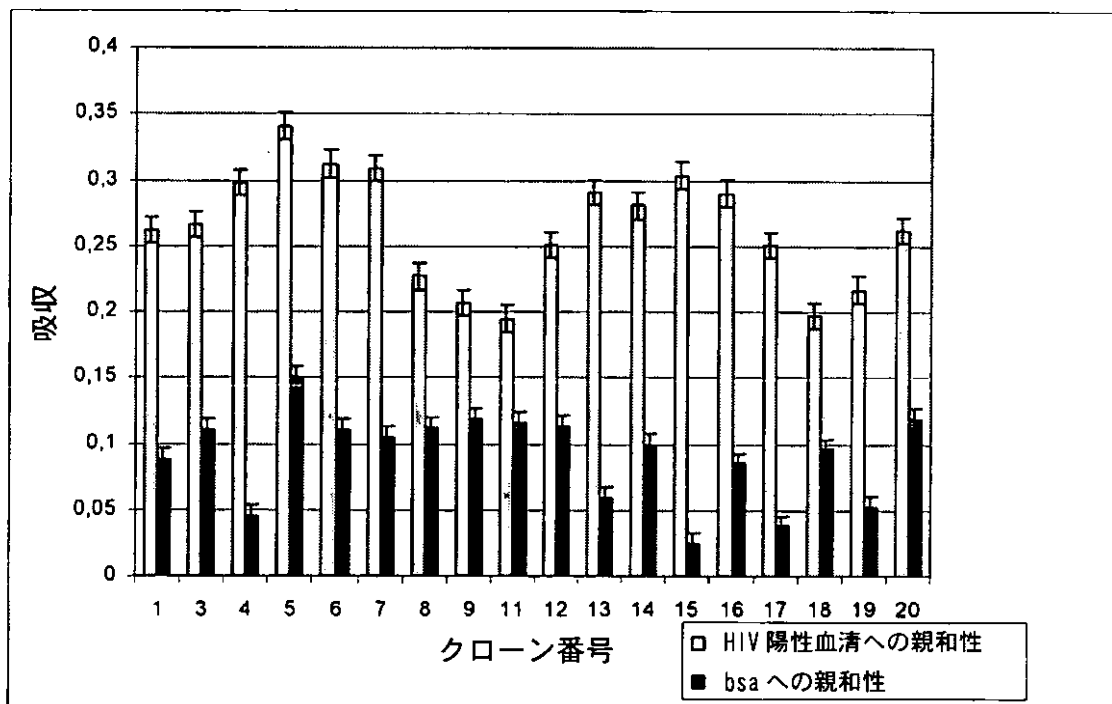
20

【 0 1 7 7 】

実施例 2：組換 HIV - 特異的ライブラリーに関する特異性定量の結果

a) HIV - 1 陽性血清による組換 mAb クローンの ELISA 結果

【化 9】



30

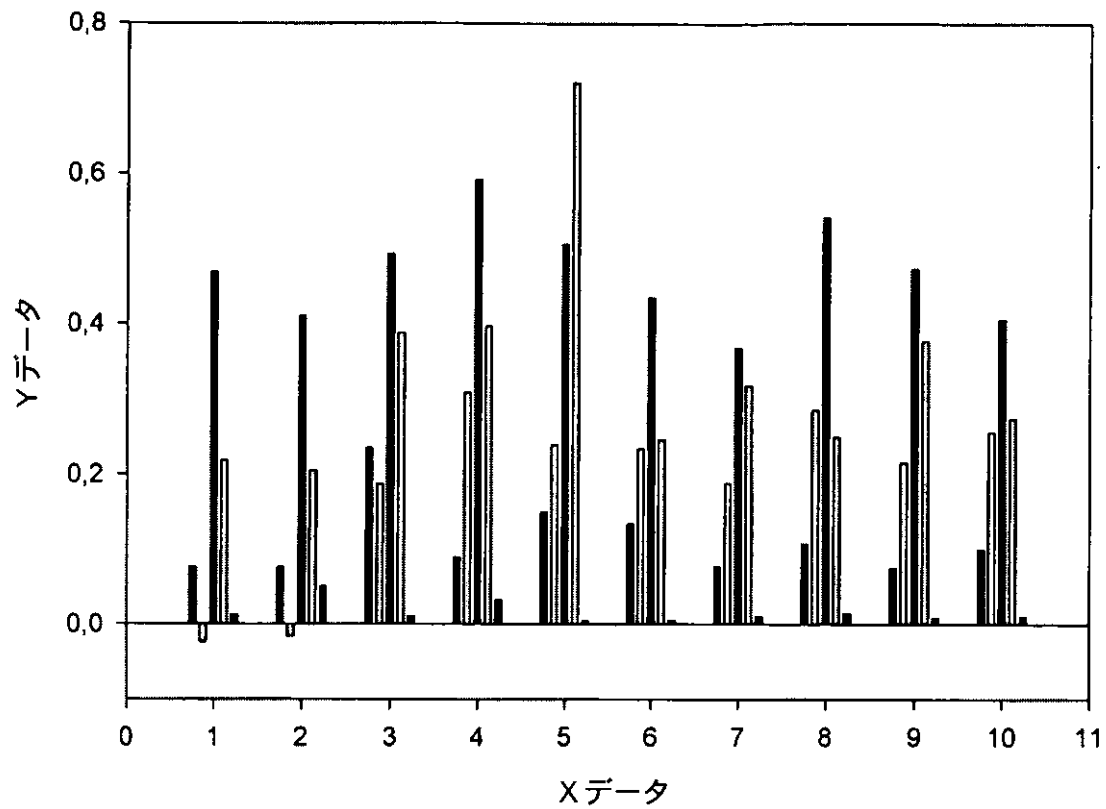
40

【 0 1 7 8 】

b) ウイルスペプチド A 4 5 5 選択されたファージライブラリー由来の 3 8 種のファージモノクローンの ELISA 結果 (SigmaPlot 10.0 統計解析)

50

【化 1 0】



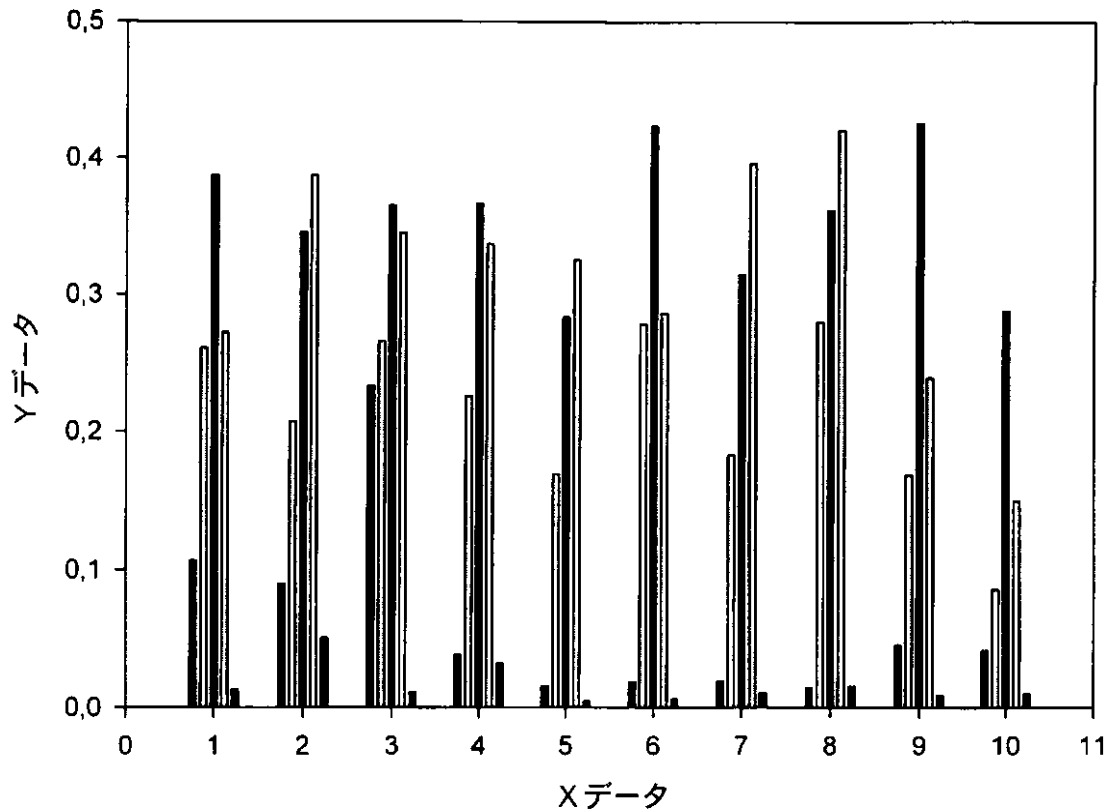
10

20

【 0 1 7 9】

c) 組換 gp 1 1 0 -、gp 1 6 0 選択されたファージライブラリー由来の 2 6 種のファージモノクローンの E L I S A 結果 (SigmaPlot 10.0 統計解析)

【化 1 1】



10

20

【0180】

実施例 3 : HIV env ペプチドの変動性

HIVは、その極めて高いペプチド配列の異原性により、他の病原性ウイルスから区別される。変更された配列ペプチドの3D構造は、非常に異なっており、かつ多くの場合、これらの変更は、ウイルスの抵抗性表現型の出現後の同じ変異により引き起こされる。従ってモノクローナル抗体ライブラリーを使用し、頻繁に合致する変種を収集し、かつ表面ウイルスタンパク質の組換え型を得ることが可能である。亜型A及びBに関するHIV env ペプチド配列の共通の異形の一部は、以下に示されている。変動性のアミノ酸は青色で、保存性のアミノ酸は赤色で印をつけている。これらの配列のいくつかは、本発明者らの実験室で以前に行われた。

30

【0181】

【表 9 A】

表 9 : E n v シングナルペプチド

gp120		gp120 inner domain	
I		I	
5	#B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU_K034 [100]	MRVKEK---Y QHLWRMGWRW GTMLLGMLMI CSAT-EKLV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
10	#A.CD.97.KCC2_AJ401034 [100]	MIVRGIQRNS QHLWTWG--- -TLIFWTIII CSAA-BELAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS HANAYEKEQH IVMATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#A.KE.95.Q168_AF407149 [100]	MKVRGIQRN- --LWKMG--- -TMLLGMMLT YSVA-EQLAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYSTEXH NIWATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
15	#A1.FI.91.FIN91121_AF219261 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TIIIGMILI CSTT-ENLAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#A1.KE.99.KNH1088_AF457063 [100]	MRVGIQRNC QPLRWG--- -TIIIGLIMI CSNA-EKLV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393 [100]	MKAKGMQRNY QHLRWG--- -XHLFWXIIIM CKAA-ENLAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
20	#A1.SE.94.SE7253_AF069670 [100]	MRVMTQMNV QHLRWG--- -TIIIGLIMI CSTA-DNLAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#A1.TZ.01.A173_AY253305 [100]	MRVGIQRNS QHLRWG--- -TMLLGLIII CSAA-DNLAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#A1.UG.92.92UG037_U51190 [100]	MRVGIQRNY PCWWTWG--- -IMILGMIII CNTA-ENLAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
25	#A1.UZ.02.02UZ0659_AY829209 [100]	MKARCMQRNY QHLRWG--- -TMLFWMIIM CKAA-ENLAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#A1.UZ.02.02UZ0663_AY829210 [100]	MKARCMQRNY QHLRWG--- -TMLFWMIIM CKAA-ENLAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
30	#A2.CD.97.97CDK510_AF286241 [100]	MRVMTQTSY QHLRWG--- -ILILGLMII CKAT--DMV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#A2.CY.94.94CY017_41_AF286237 [100]	MRVMTQTSY QHLRWG--- -ILILGLMII CKAT--DLAV TTYGVGVPMK DAETTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
35	#B.BR.89.BZ167_AY173956 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TMLLGLMII CSAA-EQLAV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#B.EC.89.EC003_AY173959 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TMLLGLMII CSAA-EQLAV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#B.GB.97.CW048_AJ418521 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TMLLGLMII CSAA-EQLAV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
40	#B.RU.04.04RU129005_AY682547 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TMLLGLMII CSAA-EQLAV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#B.US.90.WEAU160_U21135 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TMLLGLMII CSAA-EQLAV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
45	#B.US.91.DH12_3_AF069140 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TMLLGLMII CSAA-EQLAV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#B.US.98.1058_08_AY311294 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TMLLGLMII CSAA-EQLAV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
50	#C.BR.92.BR025_d_U52953 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TMLLGLMII CSAA-EQLAV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	
	#C.ET.86.ETH2220_U46016 [100]	MRVGIQRNY QHLRWG--- -TMLLGLMII CSAA-EQLAV TTYGVGVPMK EATTLILFCAS DAKAYDTEVH NVNATHACVP TDPNPQEVVL NVNTEFNMM	

10

20

30

40

【表 9 B】

5	#C.IN.95.95IN21068_AF067155 [100] #C.UG.90.UG268A2_L22948 [100] #C.ZA.01.01ZATM45_AY228557 [100] #D.XE.97.ML415_2_AY322189 [100] #D.SN.90.SE365A2_L22945 [100] #D.UG.94.94UG114_U88824 [100] #D.ZA.86.R482_AY773141 [100] #F1.BR.93.93BR020_1_AF005494 [100] #F1.FI.93.FIN9363_AF075703 [100] #F2.CM.02.02CM_0016BBY_AY371158 [100] #F2.CM.93.CA4_AJ277819 [100] #G.ES.00.X558_AF423760 [100] #G.XE.93.HH8793_12_1_AF061641 [100] #G.NG.92.92NG083_U88826 [100] #H.BE.93.VI991_AF190127 [100] #H.CF.90.056_AF005496 [100] #J.SE.93.SE7887_AF082394 [100] #J.SE.94.SE7022_AF082395 [100] #K.CD.97.EQTB11C_AJ249235 [100] #K.CM.96.MP535_AJ249239 [100]	MRVVGILRNY QOMWIKG--- -VLGFNMLMI CNVY-GNLWV TVYGVVPVK EANTTLFCAS DAKAYEKEVH NVMATHACVP TDPNPOEIVM ENVTENFNMM MRVVGIOQNC QOMWIKG--- -ILGFNMLMI CNVM-GNLWV TVYGVVPVK EANTTLFCAS DAKAYETEVEH NVMATHACVP TDPNPOEIVL ENVTESFNMM MRVVGIPRNV QOMWIKG--- -ILGFNMLLI CNVG-GNSWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYETEVEH NVMATHACVP TDPNPOEIEL ENVTENFNMM MKVVGTOQNM QNLWRWG--- -TMLGNMIII CSAA-ENLWV TVYGVVPVK EANTTLFCAS DAKSYEAEAH NIMATHACVP TDPNPOEIVL ENVTENFNMM MRAREKKNY QHLWRWG--- -TMLGNLMT CSVA-EKLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKSYETEKH NIMATHACVP TDPNPOEIEL ANVTENFNMM MRVRETKRNY QHLWRWG--- -TMLGNMIMI CSVT-GKSWV TVYGVVPVK EANTTLFCAS DAKAYKAEAH NIMATHACVP TDPNPOEIKL ENVTENFNMM MRARGIERNC QNLWRWG--- -IMLGNMIMI CSAA-GNLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYKTEAH NIMATHACVP TDPSPQEIEL NVVTENFNMM MRVVGMOQNM QHLWRWG--- -LLFLGTLII CNAA-ENLWV TVYGVVPVK EANTTLFCAS DAKSYEKEAH NVMATHACVP TDPNPOEVVL ENVTENFNMM MRVVGMOQNM QHLWRWG--- -LLFLGNMIII CKAA-DDLWV TVYGVVPVK EANTTLFCAS DAKSYEKEVH NVMATHACVP TDPNPOEVAL -NVVTENFNMM MRVVGMOQNM QHLWRWG--- -FLFLGILII CNAA-DNLWV TVYGVVPVK EANTTLFCAS DAKAYEKEAH NVMATHACVP TDPDPQEIFL DNVTENFNMM MRVVGIERNY QHLWRWG--- -TMLGNMLM TYSADNLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYDTEIH NVMATHACVP TDPSPQEIFL ENVTENFNMM MKARGTORSW QPLWRWG--- -ILILGLVII CNAS-NDLWV TVYGVVPVK EANTTLFCAS DAKAYSTESH NVMATHACVP TDPNPOEIVL ENVTENFNMM MRVVGIERNM QHLWRWG--- -TLILGLVII CSAS-NNLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYSTERH NIMATHACVP TDPDPQEIVL ENVTENFNMM MRVVGIOQNM QHLWRWG--- -TLILGLVII CSAS-DNLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKSYSEKX NVMATHACVP TDPNPOEIVL ENVTENFNMM TRVMTQRYNY PSLWRWG--- -TLILGNMIII CSVV-GNLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYDTEIH NVMATHACVP TDPNPOEIVL ENVTENFNMM TRVMTQRYNY PSLWRWG--- -TMLGNMIII CSAA-QNLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYETEKH NVMATHACVP TDPNPOEIVL ENVTESFNMM TRVMTQRYNY PSLWRWG--- -LWIFGNMIMI CKAK-EDLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYSTESH NVMATHACVP TDPSPQENNL NVVTENFNMM TRVMTQRYNY PSLWRWG--- -LWIFGNMIMI CSAR-ENLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYSTESH NVMATHACVP TDPNPOEIVL ENVTENFNMM MRAREIORNM QHLWRWG--- -ILFLGILII CSAA-NNLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYETEVEH NVMATHACVP TDPNPOEIVL ENVTENFNMM MRVVGMOQNM QTLWRWG--- -ILFLGILII CSNA-DKLWV TVYGVVPVK EAKTTLFCAS DAKAYEKEVH NVMATHACVP TDPNPOEIVM ENVTENFNMM
---	--	---

gp120

gp120 inner domain

I-----I V1 loop I-----I V2 loop

10

20

30

40

【表 9 C】

5	#B.PR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU_K034 [200]	KNDMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VSLKCTDLKN	DTNTWS----	-----SSGRMI	MEKGEIKNCS	FNISTSIRGK	VQKEYAFYK
	#A.CD.97.KCC2_AJ401034 [200]	KNNMVEQIHD	DIIRLWDRSL	QPRVKLTPLC	VTLDQCPVNS	TNN-----	-----TKV	EVPGEMTNCS	FNMTELSDK	KOKVRSIFYR
	#A.KE.95.Q168_AF407149 [200]	KNNMVEQMHT	DIISLWDQSL	RPCVKLTPLC	VTLNCTNVNN	NITN-----	-----VNNNT	GWDERKNCS	FNVTELRDK	RQKVVSIFYK
	#A1.FI.91.FIN91121_AF219261 [200]	KNNMVEQMHT	DIISLWDESL	KPCVOLITPLC	VTLNCNANA	NSINANA----	-----TSTNATAE	NEKEIKNCS	FNMTELRDK	KKKVVSIFYR
	#A1.KE.99.KNH1088_AF457063 [200]	KNKMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCSDVNV	T-----	-----NN	SMKEMKNCS	YNNTELRDK	KKKVVSIFYR
10	#A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393 [200]	KNNMVEQMOT	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCAPNS	TSSNNNS----	-----VNSNSD	SVFEMKNCT	FNMTELRDK	RKTVHSLFYK
15	#A1.SE.94.SE7253_AF069670 [200]	KNSMVEQMHT	DIISLWDESL	KPCVKLTPLC	VTLNCNANG	TQ-----	-----NVN	ITNVGRNCS	FNMTELRDK	KOKGVSLFYK
	#A1.T2.01.A173_AY253305 [200]	KNNMVEQMHT	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCNVSNN	NTDSDNSD--	-----NATNSTIIR	EMIGIKNCS	FNITTEIRDK	KOKVVSIFYK
	#A1.UG.92.92UG037_U51190 [200]	KNNMVEQMHT	DIISLWDQSL	KPCVOLITPLC	VTLDGSYNIT	NNITNS----	-----ITNSSV	NMREEIKNCS	FNMTELRDK	NRKVVSIFYK
	#A1.UZ.02.02UZ0659_AY829209 [200]	KNNMVEQMOT	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCAPNS	TSSNNNS----	-----VNSNSD	SLFKEMKNCT	FNMTELRDK	RKTVHSLFYK
	#A1.UZ.02.02UZ0663_AY829210 [200]	KNNMVEQMOT	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTEPRT	SNGN-----	-----VSSNSN	DTIEVMKNCS	FNMTELRDK	RKTVHSLFYK
20	#A2.CD.97.97CDKS10_AF286241 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCNANT	NSTNS-----	-----TSAPS	MOPGEIKNCS	FNVTEVRDK	EKKVYALFYK
25	#A2.CY.94.94CY017_41_AF286237 [200]	KNNMVEQMOE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VILNCNANT	STHSN-----	-----SSSTOS	PINEIKNCS	YNNTTILRDK	TOKVVSIFYR
30	#B.BR.89.BZ167_AY173956 [200]	KNNMVEQMOE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCCTDYN	TNTNTNT---	-----SSTVSGEK	NDRGEIKNCS	FNITTNIRNK	MORTYALFYK
	#B.EC.89.EC003_AY173959 [200]	KDDMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCCTDNA	NSTVNAT----	-----NTNNSTGK	IETGEIKNCS	FNITTDRRDK	LQKTYALFNT
	#B.GB.97.CW048_AJ418521 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCCTDVNA	TVAENATT--	-----PTSSGGL	MERGEIKNCS	FNITASIRDK	MOREYALFYK
	#B.RU.04.04RU128005_AY682547 [200]	QNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCCTDLKN	STTDNT----	-----TNNSTI	MKEEIKNCS	FNITTNIRNK	MOKEYALFYK
	#B.RU.04.04RU129005_AY751406 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVTLITPLC	VTLNKXTNLRN	TTNSGNXT--	-----NNNSSGGKM	MKXGEMKNCS	FNITTTSTRDR	XKKEVALFYK
35	#B.OS.90.WEAU160_U21135 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCCTNVNV	TNKLNETN--	-----TNSSSGGGEK	MEEGEMKNCS	FNVTTILIRNK	RKTEYALFYK
40	#B.US.91.DH12_3_AF069140 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCCTDLKN	GTNLKN----	-----GTKIIGK	SMRGEIKNCS	FNVTKNIIDK	VKKEVALFYR
	#B.US.98.1058_08_AY331294 [200]	ENNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCNDLNT	TTSNTT----	-----GTEGLT	MDKGEIKNCS	FNITTDISNK	KOKQYALFYK
	#C.BR.92.BR025_d_U52953 [200]	ENDMVEQMHO	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLHCSNRTI	DYN-----	-----NRTD	NMGGEIKNCS	FNMTEVRDK	REKVHALFYR
	#C.ET.86.ETH2220_U46016 [200]	KNDMVEQMHO	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCNAIKN	NTKVT-----	-----NNSIN	SANDEMKNCS	FNITTELRDK	KRKAYALFYK
	#C.IN.95.95IN21068_AF067155 [200]	KNDMNVQMHE	DVISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLECRNVNS	TGNGT-----	-----HCKTYN	ESMKEIKNCS	FNATTVIKDK	KQTVYALFYK
50	#C.UG.90.UG268A2_L22948 [200]	KNDMVDQMHO	DVISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCCTNVNV	NITNNANAT-	-----NSPYENGL	MEQGEIKNCS	FNVTEIRDK	KQTAHALFYK
	#C.ZA.01.01ZATM45_AY228557 [200]	KNDMVDQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCCTNATR	PVTRINTTAT	GTNTVTNCS	GSASTNNTCH	ENIEGEMKNCS	FNITTELRDK

10

20

30

40

【表 9 D】

5	#D.XE.97.MLA15_2_AY322189 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTDANA	TNVTITD---	-----	---AAADVTD	SDIGTKTSCS	TDAAE-GNK	REPGVAPLSD
	#D.SN.90.SE365A2_L22945 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTDANA	DATSNIT---	-----	---SNVTGIPM	MCKGEMQNC	FNITTEIRDK	RQNVSLFYR
	#D.UG.94.94UG114_U88824 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNMTV	D-----	-----	-----T	TNITGMANC	FNITTEIRDK	KKQVQALFYK
	#D.ZA.86.R482_AY773341 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNANI	NSTG-----	-----	-----SNALW	EPTKEVKNCS	FNVTTVVRDK	KKQVVALFYK
	#F1.BR.93.93BR020_1_AF005494 [200]	KNNMVEQMHT	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNAT	NGTNDTI---	-----	---AINDTLK	EDPEAIQNC	FNITTEIRDK	QKQVHALFYK
10	#F1.FI.93.FIN9363_AF075703 [200]	ENDMVEQMHK	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNATT	TNDTLS-----	-----	---DQSTLK	EEPQAIQNC	FNMTTEVEDK	KOKVHALFYR
	#F2.CM.02.02CM_0016BBY_AY371158 [200]	KNNMVDQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNATI	NDTNGT---	-----	---QPNNTIL	EEQGEIKNC	FNITTEIKDK	RNNEFATEFYK
15	#F2.CM.93.CA4_AJ277819 [200]	KNNMVEQMHK	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNATI	NDTNGT---	-----	---NVTTATLK	EEPGEIKNC	FNITTEIKDK	KKQVQALFYR
	#G.ES.00.X558_AF423760 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNMTV	-----	-----	---TNNT	VDKGELKNC	FNITTAIKDK	KKQVVALFYR
20	#G.KE.93.HH8793_12_1_AF061641 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTDANV	TTV-----	-----	-----ANES	VSAQEIKNCS	FNITTEIRDR	KKQVVALFYR
	#G.NG.92.92NG083_U88826 [200]	KNNMVEQMHE	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNMTV	-----	-----	---ANNTV	ENKEIKNC	FKITTERGGK	KKEEVALFYK
25	#H.BE.93.VI991_AF190127 [200]	VNDMVEQMHK	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNMTV	-----	-----	---NSTDANI	GEIQEORNC	FNVTTAIRDK	KOKVHALFYR
	#H.CF.90.056_AF005496 [200]	KNNMVEQMHT	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNMTV	-----	-----	---STSS	EAGGELTNC	FNVTTVLRDK	QKQVHALFYR
30	#J.SE.93.SE7887_AF082394 [200]	KNNMVEQMHK	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNMTV	-----	-----	---SNSSV	SSPDIMTNC	FNITTEIRNK	KQVVALFYR
	#J.SE.94.SE7022_AF082395 [200]	KNNMVEQMHK	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNMTV	-----	-----	---NSSASN	NSPEIMKNC	FNVTTEIRNK	KQVVALFYR
35	#K.CO.97.EQT811C_AJ249235 [200]	KNNMVEQMHK	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTNMTV	-----	-----	---DTNINATV	TSTDEIKNC	FNITTEIKDK	KKRVSALFYK
	#K.CM.96.MP535_AJ249239 [200]	KNNMVEQMHK	DIISLWDQSL	KPCVKLTPLC	VTLNCTDYGK	TNSTN-----	-----	---NATSTV	VSPAIEKNC	FNITTEIKDK	KKKESALFYR
gp120											
gp120 inner domain											
gp120											
II-----											
40	domain V2 loop										
	-----I										
	domain										

	gp120										
45	#B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU_K034 [300]	LDIIPID---	---NDTTS---	-----Y	KLTSCTSVI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNK	TFNGTGPCN	VSTVQCTHGI	RPVVSTQLLL
	#A.CO.97.KCC2_AJ401034 [300]	IDLVQIG---	---NNT---	---N	DSSNRSLO-Y	RLINCNTSTI	TOACPKVSE	PVPIHYCAPA	GFAILKCKDQ	EFNGTGPCN	VSTVQCTHGI
	#A.KE.95.Q168_AF407149 [300]	LDVQID---	---NSS-----	-----Y	RLINCNTSAI	TOACPKVTE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDE	KFNGTGPCN	VSTVQCTHGI	RPVVSTQLLL
50	#A1.FI.91.FIN91121_AF219261 [300]	LDVQID---	---NGTE-----	---NETYTEY	RLINCNTSAI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDE	KFNGTGPCN	VSTVQCTHGI	RPVVSTQLLL
	#A1.KE.99.KNH1088_AF457063 [300]	LDVQID---	---NSSG-----	---NSSSSEY	RLINCNTSAI	TOACPKVTE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDQ	EFNGTGPCN	VSTVQCTHGI	RPVVSTQLLL

10

20

30

40

【表 9 E】

5	[300]	#A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393	LDIVSTGS-- --NGS-----	-----GOY RLINCNSTSAM	TOACPKVTFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDT	NFTGTGFCN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#A1.SE.94.SE7253_AF069670	LDIVQINDNG --NNS-----	-----NNSSE-Y RLINCNSTSAI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCRDK	EFNGTGPCNN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#A1.TZ.01.A173_AY253305	LDVVEISNS- --NSS-----	-----QY RLINCNSTSAI	TOACPKVTFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNK	TFNGTGPCNN	VSSVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#A1.UG.92.92UG037_US1190	LDVVQINNG- --NNSNL---	-----Y RLINCNSTAL	TOAREKVTFE	PIPIHYCAPA	GVAAILKCNDK	EFNGTGLCKN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#A1.UZ.02.02UZ0659_AY829209	LDIVSTDS-- --NGS-----	-----GOY RLINCNSTSM	TOACPKVTFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDP	NFTGTGFCN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
10	[300]	#A1.UZ.02.02UZ0663_AY829210	LDIVSTDN-- --NDS-----	-----GOY RLINCNSTSM	TOACPKNFE	PIPIYCTPA	GFAILKCKDP	TFNGTGFCN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#A2.CD.97.97CDK510_AF286241	LDVVQI-----	-----NESDS--N STKDSTQ--Y	RLINCNSTSAI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCEDP	VSSVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#A2.CY.94.94CY017_41_AF286237	LDVVQLDESE NKNTSGS-NT L-----	-----Y RLINCNSTSTI	TOACPKVTFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDP	RFNGTGSCKN	VSSVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#B.BR.99.BZ167_AY173956	LDVEPIDKNK --NTR-----	-----Y RLISCNNSVI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNK	TFNGTGFCN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#B.EC.89.EC003_AY173959	LDVVPIDNDN D--NNS-----	-----Y RLINCNSTVI	TOACPKISFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNDS	TFSCGKPCTN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
20	[300]	#B.GB.97.CW048_AJ418521	LDVVPIDRD- --NTS-----	-----Y RLISCNSTVI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCRDK	KFNGTGFCN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQPLL
	[300]	#B.RU.04.04RU128005_AY682547	LDIVPIDGD- --NTS-----	-----Y MLTSXNSTVI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKEN	KFNGTGFCN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#B.RU.04.04RU129005_AY751406	LDIVPIDDAK --NSTN-----	-----Y RLISCNSTVL	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDK	KFNGTGPCTN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#B.US.90.MEAU160_U21135	LDVMPIDHD- --NTS-----	-----Y TLINCKSSTI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNDK	KFNGKGPCN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#B.US.91.DH12_3_AF069140	HDVVPIDR-- --NITS-----	-----Y RLISCNSTL	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDK	KFNGTGPCTN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
30	[300]	#B.US.98.1058_08_AY331294	LDVVQMN-- --NNS-----	-----Y RLISCNSTVI	TOACPKVSE	PIPIYCAPA	GFAILKCNDK	SFSGKSECKN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#C.BR.92.BR025_d_U52953	LDIVPLK--- --NESS-----	-----NTSGD-Y RLINCNSTAI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GVAAILKCNK	TFNGTGPCNN	VSTIQTCTHGT	KPVVSTQLLL
	[300]	#C.ET.86.ETH2220_U46016	LOIVPLN--- --NGS-----	-----TD--Y RLINCNSTSTI	TOACPKVSLD	PIPIHYCAPA	GVAAILKCRDK	TFTGTGFCN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#C.IN.95.95IN21068_AF067155	LDIVPLNEE QENDS-----	-----NSSGY RLINCNSTAL	TOACPKVTFD	PIPIHYCAPA	GVAAILKCNK	TFNGTGPCNN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#C.UG.90.UG268A2_L22948	LDVVSLEG-- --NSNT-----	-----Y RLINCNSTAI	TOACPKVTFD	PIPIHYCAPA	GVAAILKCNK	TFNGTGPCNN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
40	[300]	#C.ZA.01.01ZATM45_AY228557	LDIVPLNETR D--NSS-----	-----Y RLINCNSTSTI	TOACPKVSE	PIPIHYCAPA	GVAAILKCNK	TFNGTGPCNN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#D.KE.97.MI415_2_AY322189	LVAAPLVNGN --NNTAA---	-----F CLINGGAPT	TOQCPKGTIE	PIPIHYCAPA	GLAILKCNDK	NFSOGGCCN	ISTIHRTGG	RAPVPTKLL
	[300]	#D.SN.90.SE365A2_L22945	LDIVPIGNSN K--NST-----	-----NTS-Y RLINCNSTVI	TOACPKNFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDK	KFNGTGPCNN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#D.UG.94.94UG114_U88824	LDVVKIND-- --NDS-----	-----NTS--Y RLINCNSTAI	TOACPKNTE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNK	KFNGTGPCNN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
	[300]	#D.ZA.86.R482_AY773341	PDIVPKNDN --NRTN-----	-----Y RLICNNTAI	TOACPKSFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNK	KFNGTGPCNN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL
50	[300]	#F1.BR.93.93BR020_1_AF005494	LDIVQINKDD --NRT-----	-----Y RLINCDASTI	TOACPKVSD	PIPIHYCAPA	GVAAILKCNK	NFTGTGSCN	VSTVQCTHGI	KPVVSTQLLL

10

20

30

40

【表 9 F】

5	{300}	#F1.FI.93.FIN9363_AF075703	LDIEPISN-- --NNS-----	REE-Y RLITCNTSTI	TOACPCKVSD	PIPIHYCAPA	GYAILKCKDK	RFNGTGPCRN	VSTVQCTHGI	RPVWSTQLLL
	{300}	#F2.CM.02.02CM_0016BBY_AY371158	HDIVPIEK-- --NTTS----	Y RLITSCNTSTV	TOACPCKVSFD	PIPIYVCAPA	GYAILKCNNDK	RFNGKGLCTN	VSTVQCTHGI	KPVWSTQLLL
	{300}	#F2.CM.93.CA4_AJ277819	LDVVPI----- --NASDS---	NSSE-Y RLISCNTSTV	TOACPCKVSFE	PIPIHYCAPA	GYAILKCNNDK	GFNGTGLCKN	VSTVQCTHGI	RPVWSTQLLL
	{300}	#G.ES.00.X558_AF423760	LDIVPITDNG --NSS-----	AGD-Y RLINCNVSTI	KQACPCKVTFD	PIPIHYCAPA	GFAILKCRDK	EFNGTGPCKN	VSTVQCTHGI	KPVIWSTQLLL
	{300}	#G.KE.93.HH8793_12_1_AF061641	LDVIPINDDS S-NSTG-----	NYSNY RLINCNVSTI	KQACPCKVDFD	PIPIHYCAPG	GFAILKCKEK	EFNGTGPCON	VSTVQCTHGI	KPVWSTQLLL
10	{300}	#G.NG.92.92NG083_U88826	LDVVPIFN-G --NKT-----	S-Y RLTHCNVSTI	KQACPCKVNF	PIPIHYCAPA	GFAILKCRDK	EFNGTGPCKN	VSTVQCTHGI	KPVWSTQLLL
	{300}	#H.BE.93.VI991_AF190127	ADIVQIDEGE R-NKS-----	DNH-Y RLINCNTSVI	KQACPCKVSFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNNG	KFNGTGPCPN	VSTVQCTHGI	RPVWSTQLLL
	{300}	#H.CF.90.056_AF005496	LDVVPI-D-- --NNST-----	Q-Y RLINCNTSVI	TOACPCKVSFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNNDK	TFNGTGLCTN	VSTVQCTHGI	RPVWSTQLLL
	{300}	#J.SE.93.SE7887_AF082394	QDVVPIDSN- --NKN-----	Y ILINCNTSVI	KQACPCKVSFQ	PIPIHYCAPA	GFAILKCNNDK	NFNGTGSCNN	VSTVQCTHGI	KPVWSTQLLL
	{300}	#J.SE.94.SE7022_AF082395	QDVVPINSD- --NKS-----	Y ILINCNTSVI	KQACPCKVSFQ	PIPIHYCAPA	GFAILKCNNDK	TFNGTGPCKN	VSTVQCTHGI	KPVWSTQLLL
20	{300}	#K.CD.97.EQT811C_AJ249235	LDIVQIKOSE I-NQS-----	ESE-D RLINCNTSTV	TOACPCKVSFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNNDK	TCNGTGPCPN	VSTVQCTHGI	KPVWSTQLLL
	{300}	#K.CM.96.MP535_AJ249239	LDVLPINGEG --NNS-----	STE-Y RLINCNTSTI	TQCPCKVTFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCKDK	RFNGTGPCKN	VSTVQCTHGI	KPVWSTQLLL
	{300}									
	{300}									
	{300}									
30		gp120								
35										
40		#B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU_K034	NGSLAE-EEV VIRSVNPTDN	AKTIIVQLT	SVINICTRPN	NNTKRIRIQ	RGPGRFVTI	GK-IGNMROA	HCNISRAKWN	NTLKQIASKL R--E-QFGN-
	{400}	#A.CD.97.KCC2_AJ401034	NGSLAE-GGI KIRSANISYN	AKNIIVQLDI	PVKINCSPRN	NNTTSVRI-	-GPGQTFYAT	GDIIGNIROA	HCNLSRTAWN	DTLYNYSKAL R--E-HFP--
	{400}	#A.KE.95.Q168_AF407149	NGSLAE-KEV MIRSENFNS	AKNIIQFKE	PVKINCTRPD	NNTTSIRI-	-GPGQAFYAT	G-IIGDIROA	YCTVNGSEWN	KALQKVVEQL R--S-SFE--
	{400}	#A1.FI.91.FIN91121_AF219261	NGSLAK-EEV RIRSENIITNN	VKTIIVQLVX	PVNITCIRPN	NNTKSIHL-	-GPGRAFVAT	GDIIGNIRKA	HCIVNESEWN	EALQQVATOL G--K-YFE--
	{400}	#A1.KE.99.KNH1088_AF457063	NGSLAE-GEV RIRSENIISDN	AKTIIVQLTE	PTVINCTRPN	NNTKGIHL-	-GPGQAFYAT	GEIIGDIROA	HCNVSSSKWN	KTLQQVVTOL R--N-YW---
45	{400}	#A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393	NGSLAE-KEV MXRSENIITDN	GKXIIVQLTE	PVNITCIRPG	NNTTSIRI-	-GPGQTFYAT	XDVIGDIRKA	YCVSRAAWX	STLQKISTOL R--K-YFN--
	{400}	#A1.SE.94.SE7253_AF069670	NGSLAE-EKI MIRSENIISDN	AKTIIVQLTE	PTVINCTRPS	NNTTSIRI-	-GPGQAFYAT	GDITGDIROA	HCNVSSSWN	KTLQDITVOTOL R--V-YW---
	{400}	#A1.TZ.01.A173_AY253305	NGSLAE-GEI QIRSENIITNN	AKNIIVQFTE	PVQIICIRPN	NNTKRWHI-	-GPGQTFYAT	-DIIGNIROA	YCTVNRTEWN	TTLQKVGKQL R--DLYFN--
	{400}									
	{400}									
50										

10

20

30

40

【表 9 G】

5	#A1.UG.92.92UG037_US1190 [400]	NGSLAE-GRV MIRSINITNN VKNIIIVOLNE SVTINCTRPN NNTRSVIRI-	-GPGQTFYAT GDIIGDIRQA HCNVSGSQMN KTLHQVBEQL R--K-YMN--
	#A1.UZ.02.02UZ0659_AY829209 [400]	NGSLAE-KEV MLRSENITDN GKTIIIVOLTE PVNITCIRPG NNTRTSIRI-	-GPGQTFYAT GDIIGDIRQA YCNVSRAMN NTLQKISTQL K--K-YFN--
	#A1.UZ.02.02UZ0663_AY829210 [400]	NGSLAE-KEV MIRSENITDN GKIIIVOLNT PVNITCIRPG NNTRTSIRI-	-GPGQTFYAT GDIIGDIRQA HCNVSRATMN NTLQKISTQL R--K-HFP--
	#A2.CD.97.97CDK510_AF286241 [400]	NGSLAE-KEV MIRSENITNN AKNIIIVQFNE SVPTICIRPN NNTKSGIPI-	-GPGQVFTT SDIIGDIRQA YCSINTKMD ASLOKVAEQL R--K-HFP--
	#A2.CY.94.94CY017_41_AF286237 [400]	NGSLAEGGKI MIRSENITNN AKNIIIVQFTK PVLITCIRPN NNTKSGIRP-	-GPGQAFYT- NEIIGDIRQA HCNINKTLWN DTLQKVAEQL R--E-KFP--
10	#B.BR.89.BZ167_AY173956 [400]	NGSLAE-EGV VIRSENFDTN AKTIIVOLKE PVEINCTRPN NKARRIRI-	-GPGRTFYT- GKIVGDIRQA YCNISRAKWN NTLNQIVTKL REIE-QFK--
	#B.EC.89.EC003_AY173959 [400]	NGSLAE-KDV VIRSENFDTN VNTIIIVOLNE SVKIECIRPH NNTRESINI-	-GPGRAFYT KAIIGDIRQA HCNISVGNMT NTLQKISKYL R--E-QFG--
	#B.CB.97.CW048_AJ418521 [400]	NGSLAE-BEV VIRSVNFSDN AKTIIVOLKE AVEIKCTRPS NNTKSIPI-	-GPGRAFYT GDIIGDIRQA HCNISGEKWN NTLQKIVKKL K--E-QFE--
15	#B.RU.04.04RU128005_AY682547 [400]	NGSLAE-BEV VVRSNFSDN AKNIIIVOLKD PVQINCTRPS NNTKSIPI-	-GPGKAFYT GDIIGDIRQA HCNLSGADWT KTLQKIVKKL X--E-QY---
	#B.RU.04.04RU129005_AY751406 [400]	NGSLAE-BEV VIRSANFTNN AKTIIVOLNE SKVINCTRPN NNTKSIPI-	-GPGRAFYT GDIIGDIRQA HCNLSSTKWN DTLQKIVKKL R--E-QFG--
	#B.US.90.WEAU160_U21135 [400]	NGSLAE-EDI VIRSENFDTN AKNIIIVOLNV SIEINCTRPN NNTKSIPI-	-GPGRVLYTT GEIIGDIRQA HCNLSRTSN NTLQKIVKKL R--E-IFKPK
20	#B.US.91.DH12_3_AF069140 [400]	NGSLAE-BEV VIRSSNFDTN AKIIIVOLNE TVEINCTRPN NNTKGIITL-	-GPGRVFYT GEIIGDIRQA HCNISKVKWH NTLKRVVEKL R--E-KFE--
	#B.US.98.1058_08_AY331294 [400]	NGSLAE-EDV IIRSDNFDTN AKTIIVOLNE TVDHCIRPN NNTKRIITM-	-GPGKVYTTT GQIIGDIRQA HCNLSEAKWN NTLKRVVKKL R--E-KF---
	#C.BR.92.BR025_d_U52953 [400]	NGSLAE-BEI IIRSKNLTNN VTKIIIVOLNE SVEINCTRPN NNTKSIPI-	-GPGQAFYT GEIIGDIRQA HCNISRTAWN KTLQKIVKKL A--E-HFP--
25	#C.ET.86.ETH2220_U46016 [400]	NGSLAE-GET IIRFENLTNN AKIIIVOLNE SVEITCTRPS NNTRESIRI-	-GPGQTFYAT GDIIGDIRQA HCNISEKWN KTLQKIVKKL Q--K-HFP--
	#C.IN.95.95IN21068_AF067155 [400]	NGSLAE-CGI IIRSENLTTN VTKIIIVOLNQ PVEINCTRPN NNTKSIPI-	-GPGQTFYAT GDIIGDIRQA HCNISEDKWN ETLQKIVKKL A--E-HFP--
	#C.UG.90.UG268A2_L22948 [400]	NGSLAE-BEI IIRSENLTTN AKIIIVOLNK SVEINCAREN NNTRESIRI-	-GPGQTFYAT GDIIGDIRQA YCNISRNWN ITLQWVREKL K--R-HFP--
30	#C.ZA.01.01ZATM45_AY228557 [400]	NGSLAE-ENV IIRSDNMTNA ATTIIVOLKD PVEIVCTRPN NNTREVGI-	-GPGQTFYT GDIIGDIRQA HCNITSEKWN KTLQKIVKKL E--K-HFP--
	#D.KE.97.ML415_2_AY322189 [400]	NGSLAE-EDI VIRSENLTTN AKIIIVOLKQ SVEITCTRPN NNTKSVHI-	-GPGRALYTI-ELVGDIRQA HCAINGTRWN DTLQKIVATKL G--A-FLT--
	#D.SN.90.SE365A2_L22945 [400]	NGSLAE-BEI IIRSENLTTN AKTIIVOLNE SVMINCTRPN NNTKQRTPI-	-GLGQVLTHT RV-KGDIRQA HCNISERWN KTLQKIVKKL K--D-LF---
35	#D.UG.94.94UG114_U88824 [400]	NGSLAE-BEI IIRSENLTTN AKIIIVOLNE SVPINCIREY NNTKQSTRI-	-GPGQALFTT KV-IGDIRQA HCNISGAGWN KTLQKIVAEKL G--N-LL---
	#D.ZA.86.R482_AY773341 [400]	NGSLPE-BEI IIRSENLTTN AKNIIIVOLNA SVKINCTRPN EIRQKTSI-	-GOGOALNTN KRIIRDNRQA NCTISGEKWN KTLQKIVATKL G--N-LL---
	#F1.BR.93.93BR020_1_AF005494 [400]	NGSLAE-CEI VIRSONISDN AKTIIVOLNE SVQINCTRPN NNTKRIISL-	-GPGRVFYT GEIIGDIRQA HCNVSGTQWR NTLAKVAKL G--S-YFP--
40	#F1.FI.93.FIN9363_AF075703 [400]	NGSLSE-CGI IIRSONLSDN AKTIIVOLNE SVQINCTRPN NNTKSIPI-	-GPGQSFYAT GEIIGDIRQA HCNISGEQWN KTLDRVAKL K--L-HF---
	#F2.CM.02.02CM_0016BBY_AY371158 [400]	NGSLAE-KXI IIRSENLTTN AKTIIVOLNE SVKINCTRPN NNTKSIPI-	-GPGQVFTT GEIIGDIRQA HCTINGTLWN ATLNKVAEV K--N-LT---
	#F2.CM.93.CA4_AJ277819 [400]	NGSLAE-ENI TIRSENLTTN IKIIIVOLNR SVEINCTRPN NNTKSIPI-	-GPGQVFTT GDIIGDIRQA YCSINTLWN ETLQKIVVEEF K--K-LDH--

10

20

30

40

5

#G.ES.00.X558_AF423760	(400)	NGSLAE-EEI	IIRSENIITDN	TKNIIVOLKE	AIDIICTRPN	NNTRKSISL-	-GPGQAFYAT	GAIIGDIRQA	HCNISRXKWD	NMIXNVSEKL	E--R-IP----
#G.XE.93.HH8793_12_1_AF061641	(400)	NGSLAE-GEI	IIRSENIITDN	TKVIIVOLNE	TVEITCVAPRN	NNTRKSISHL-	-GPGQALYAT	GDIIGNIRQA	HCDVSGRWNS	NMIEKVKAQL	R--K-IP----
#G.NG.92.92NG083_U88826	(400)	NGSLAE-EDI	IIRSENFITDN	TKVIIVQLNN	STEINCIRPN	NNTRKSITPI-	-GPGQAFYAT	GDIIGDIRQA	HCNVSRIKWR	EMLNKNTAQL	R--K-IV----
#H.BE.93.VT991_AF190127	(400)	NGSLAEVEEV	IIRSKNITDN	TKNIIVOLNE	PVQINCTRTG	NNTRKSIRI-	-GPGQAFYAT	GDIIGDIRRA	YCNISGKQWN	ETLHKVITKL	G--S-YFD--
#H.CF.90.056_AF005496	(400)	NGSLAE-EQI	LIIRTKNISON	TKNIIVOLKT	PONITCTRPN	NNTWTSISHL-	-GPGRAFYAT	GDIIGDIRQA	HCNISRTDWN	KTILHQVVTQL	G--I-HLN--
#J.SE.93.SE7887_AF082394	(400)	NGSLAE-GDI	IIRSENIISON	AKNIIVOLNK	TVEIVCVYRPN	NNTRKKGIIHM-	-GPGQVLYAT	GEIIGNIRET	HCNISERDWS	NTLRRVATKL	R--E-HF----
#J.SR.94.SE7022_AF082395	(400)	NGSLAE-GDI	IIRSENIISON	AKNIIVQLND	TVEIVCTRPN	NNTRKKGIIHM-	-GPGQVLYAT	GEIIGDIRKA	YCNISRKDWN	NTLRRVAKKL	R--E-HF----
#K.CD.97.EOTB11C_AJ749235	(400)	NGSLAE-EEI	IIRSEDIYN	TKNIIVOLNE	AVEINCTRPS	NNTRKSITHI-	-GPGRAFYAT	GDIIGDIRQA	HCNISGGQWN	KTYNQVKKEL	G--K-HF----
#K.CW.96.MP535_AJ749239	(400)	NGSLAE-EEI	IIRSENIITDN	TKNIIVOLNE	TVQINCTRPN	NNTRKSIIHM-	-GPGKAFYTT	GDIIGDIRQA	HCNISGEKWN	MTLSRVKEXL	K--E-HPK--

gp120

gp120 outer domain

y4 loop

.....

WBA.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU_K034	[500]	NKT-IIFKQS S-GGDPEIVT HSFNCGGEFF YCNSQGLFNS TWJ----	NST-	-----	WSTEGS-	NTEGSD----	---TITLPCR	IKOIINMHQK	VGRANYAPPI
NKT-IIFNKS S-GGDLEVTQ HMFICGGEFF YCNTSGLFNS SWAP--	[500]	NGS-	-----	MIN----	NIGSRE----	-N	DT--MTLPCR	IKOIINMHQR	VEQANYAPPI
NKT-IIFPNS S-GGDEIYTT HSFNCGGEFF YCNTSGLFDS TW----	[500]	NDTD	SR-QE-	-----	NGT-	-----	---ITLPCR	IKOIINMHQR	TGOAIYAPPI
NKT-INFTSP S-GGDLEVTT HSFNCGGEFF YCNTSGLFNS TWYS--	[500]	NNT-	---GKYYS-	-----	NSTRENP--	---	NITLPCR	IKOIINMHQR	AGQAIYAPPI
NKT-IAFTPS S-GGDIETTT HSFNCGGEFF YCNTSGLFNS TYSW--	[500]	NET-	---VS-	-----	NSTES----	-N	DT--ITLPCR	IKOIINMHQR	TGOANYAPPI
NKT-IAFKNS S-GGDLEVTT HSFNCGGEFF YCNTTDLFNS TW----	[500]	DXGX	TXT----	---	XITKA----	-N	GT--ITLPCR	IKOIINMHQR	VGOANYAPPI
NRT-IIFNSS S-GGDEIYTT HSFNCGGEFF YCNTSGLFNS TW\$Q--	[500]	NDT-	---GVS-	-----	NSTES----	-N	DT--IILPCR	IKOIINMHQR	AGQAIYAPPI
NKT-IIFTSS S-GGDLEITT HSFNCGGEFF YCNTSGLFNG LF----	[500]	NGT-	---WNGNHT-	-----	NSTEL----	-N	ST--IILQCK	IKOIINMHQR	AGQAIYAPPI
NNT-IIFNSS S-GGDLEIYTT HSFNCAGEFF YCNTSGLFNS TWV----	[500]	NGTT	SSTS-----	---	NGT-	-----	---ITLPCR	IKOIINMHQR	VGOANYAPPI
NKT-IIFKNS S-GGDLEVTT HSFNCGGEFF YCNTTDLFNS TWG----	[500]	NVT-	-----	---	NVTKA----	-N	ET--TITLPCR	IKOIINMHQR	VGOANYAPPI
NKT-IIFKNS T-GGDLEVTT HSFNCGGEFF YCSTTALFNS TWDE--	[500]	NSTV	T-----	---	NDTKA----	-N	ET--ITLPCR	IKOIINMHQR	VGOANYAPPI
NKT-INFTXP S-GGDLEIYTT HSFNCGGEFF YCNTTSLFNS TWXN--	[500]	GATI	---QE-	-----	NSTETNG---	---	---ITLPCR	IKOIIVDMQCE	VGOANYAPPI
KKT-IIFTNS S-GGDPEIYTT LSPNCAGEFF YCNTTGLFNG TWXN--	[500]	NGT-	---	---MNGPVT	NNT-----	-N	GS--IILPCR	IKOIINMHQR	VGRANYAPPI

10

20

30

40

【表 9 I】

[500]	NKT-IVFNQS	S-GGDPEIVM	HSFNCRGCEFF	YCNSTOLFNS	TW----	NST----	WVYDERS	NDTAT-----	-----	LKLPCR	IKQFVNMQE	VGRAMYAPPI	
#B.BR.89.	B2167	AY173956											
[500]	NKT-IVFNRT	S-GGDPEITM	HTFNCGGCEFF	YCNVTKLFNS	TWHT--	NGSS NY-----	NTSGV-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#B.EC.89.	EC003	AY173959											
[500]	NST-IVFNQS	S-GGDPEIVM	HSFNCGGCEFF	YCNSTOLFNS	IW----	NSTE-----	KT-----	-----	-----	IITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#B.GB.97.	CW048	AJ418521											
[500]	NKT-IVFKQS	S-GGDPEIXM	HSFNCGGCEFF	YCNVTKLFNS	TWEN--	NST-----	NSTXNETG-N	XT--	IITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI		
#B.RU.04.	04RU128005	AY682547											
[500]	NKT-IFKNQS	S-GGDPEIVM	HSFNCGGCEFF	YCNSTOLFNS	TW----	NSSH-----	GDSTERS	NTNES-----	-----	TITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#B.RU.04.	04RU129005	AY751406											
[500]	NKT-IVFKQS	S-GGDPEIVM	HSFNCGGCEFF	YCNSTOLFNS	TWHA--	NGT-----	WKNT-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#B.US.90.	WEAUI60	U21135											
[500]	NKT-IVENKS	S-GGDPEIVM	HSFNCGGCEFF	YCNVTKLFNS	TW----	NGTE	GSYNIEG----	-----	-----	IITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#B.US.91.	DH12_3	AF069140											
[500]	NKT-IVFNQS	S-GGDPEIVM	HTFNCGGCEFF	YCNSTOLFNS	IWD--	NNK-----	DSTXNETG	PK--	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI		
#B.US.98.	1058_08	AY311294											
[500]	NKA-IXFAKH	S-GGDLEIIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	TYTP--	NSTE-----	NITOTENS--	-----	-----	IITIPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#C.ET.86.	ETH2220	U46016											
[500]	NKT-IEFKPS	S-GGDLEIIT	HSFNCGGCEFF	YCNVTKLFNS	TKLB--	LFNS ST--NL-----	-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#C.IN.95.	95IN21068	AF067155											
[500]	NKT-IFNNS	S-GGDLEIIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	TYMP--	NDT-----	KS-----	NSSS-----	N	PHANITIPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#C.UG.90.	U2628A2	L22948											
[500]	NKT-INTOP	S-GGDLEIIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	SDN--	NNST-----	-----	-----	-----	IITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#C.ZA.01.	01ZATW45	AY228557											
[500]	NKT-IQFKPH	S-GGDLEIIT	HSFTCSGCEFF	YCNVTKLFNS	SMS---	NLT-----	Y-----	NNTDNTD--N	PTQ--	IITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#D.KE.97.	ML415_2	AY322189											
[500]	XKE-IXFKPS	S-GGDPEIIT	HSFNCGGCEFF	YCNVTKLFNS	IWNV--	TNGTS	-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#D.SN.90.	SN365A2	L22945											
[500]	NKT-IFEPS	S-GGDPEIAT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	TW----	KTKS	GD-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#D.UG.94.	94UG114	U88824											
[500]	NQTIIFKPS	S-GGDPEIIT	HSFNCGGCEFF	YCNVTKLFNS	TWKR--	NNSE-----	WRS-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#D.ZA.86.	R482	AY773341											
[500]	NKTIPRPP	S-GGDPEIIT	HSFNCGGCEFF	YCNVTKLFNS	TWQD--	NSNR T--WS-----	-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#F1.BR.93.	93BR020_1	AF005494											
[500]	NAT-IFNNS	S-GGDLEIIT	HNFNCGCEFF	YCNVTKLFNS	TKF--	NDT-----	GF-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#F1.ET.93.	FIN9363	AF075703											
[500]	NKT-IFKNSS	S-GGDLEIIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	TVPN--	NGT-----	-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#F2.CM.02.	02CM_00168BY	AY371158											
[500]	NIT-IFEPS	S-GGDLEIIT	HSFSCGCEFF	YCNVTKLFNS	TLL---	NTT-----	MDN-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#F2.CM.93.	CA4_AJ277819												
[500]	NITNIFEPS	S-GGDPEIIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	MEKT--	NNNT-----	-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#G.ES.00.	X558	AF423760											
[500]	NKN-ITFNPP	S-GGDLEIIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	XLS---	NSG-----	NXT-----	NGSKD-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#G.KE.93.	HH8793_12_1	AF061641											
[500]	NKT-ITFDSS	A-GGDLEIIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	ETIS--	NGT-----	-----	-----	-----	IITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#G.NG.92.	92NG083	U88826											
[500]	NNKNITFNSS	A-GGDLEIIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	NIS---	NIN-----	NET-----	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	
#H.BE.93.	V1991	AF190127											
[500]	NKT-IILQPP	A-GGDLEIIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	TWT---	NSSY T--NDTYS--	-----	-----	-----	ED	ITGNITLOCK	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI
#H.CF.90.	0356	AF005496											
[500]	NRT-ISFKEN	S-GGDMEVIT	HSFNCRGCEFF	YCNVTKLFNS	SWENHTNYS	-----	NDTKGNE	-----	-----	NITLPCR	IKQIINMQE	VGRAMYAPPI	

10

20

30

40

0

20

【表 9 K】

5	#B.RU.04.04RU129005_AY751406 [600]	RQOISCSNI TGLLLTRDGG A----	NNSTT -----	EVFRP GGGMRDNXR SELYKYXVVK	IEPLGVXPTK AKRRVV-QRE	KXAV---LGA	MFLGFLGAAG
	#B.US.90.WEAU160_U21135 [600]	EGQIRCLSI TGLLLTRDGG SSEE-NQT--	-----	EIFRP GCGNMKNMR SELYKYKVVK	IEPLGVAPT KARRVV-QRE	KBAVGM-LGA	MFLGFLGAAG
	#B.US.91.DH12_3_AF069140 [600]	SGOIWCSNI TGLLLTRDGG K-----	NSST- -----	EIFRP GCGMRDNMR SELYKYKVVV	VEPLGIAPT KARRVV-QRE	KRAV-G-IGA	VFLGFLGAAG
	#B.US.98.1058_08_AY331294 [600]	RGOIRCTSI TGLLLTRDGG KN---NGT--	NGT--	EVERP GGENMKDNK SELYKYKVVK	IEPLGVAPT KARRVV-QRE	KBAV-T-LGA	LFLGFLGAAG
	#C.BR.92.BR025_d_U52953 [600]	EGILTCRSNI TGLLLTRDGG TGM---HDT--	-----	EIFRP EGGMRDNMR SELYKYKVE	IKPLGIAPT KARRVV-ERE	KRAV-G-IGA	VFLGFLGAAG
10	#C.ET.86.ETH2220_U46016 [600]	EGIIMCRSI TGLLLTRDGA KE---PHSTK	-----	EIFRP EGGMRDNMR SELYKYKVE	IKPLGVAPT KARRVV-ERE	KBA--LGA	LFLGFLGAAG
	#C.IN.95.95IN21068_AF067155 [600]	EGKITCRSI TGLLLTRDGG EDK---NNTET	-NKT-ETFRP	GCGMRDNMR SELYKYKVE	VKPLGVAPT KARRVV-ERE	KRAV-G-IGA	VFLGFLGAAG
	#C.UG.90.UG268A2_L22948 [600]	KGKITCRSI TGLLLTRDGG ETSETNST--	-----	ETFRP GCGMRDNMR SELYKYKVE	VKPLGVAPT KARRVV-ERE	KBAV-G-IGA	VFLGFLGAAG
	#C.ZA.01.012ATM45_AY228557 [600]	AGNITCSNI TGLLLTRDGG SGE---NNT--	-----	ETFRP GCGMRDNMR SELYKYKVE	IKPLGIAPT KARRVV-ERE	KRAI-G-IGA	VFLGFLGAAG
	#D.KE.97.ML415_2_AY322189 [600]	AGIICSSNI TGLLLTRDGG AD---NSSQ	-----	NETFRP GCGMRDNMR SELYKYKVV	VEPLGIAPT KARRVV-ERE	KBAI-G-LGA	MFLGFLGAAG
20	#D.SN.90.SE365A2_L22945 [600]	EGVISCSNI TGLLLTRDGG IH---NTS--	-NET-ETFRP	GCGMRDNMR SELYKYKVV	LEPLGVAPT KARRVV-KRE	KRAI-G-LGV	MFLGFLGAAG
	#D.UG.94.94UG114_U88824 [600]	EGFINCSNI TGLLLTRDGG AI---NSSQ	-----	NETFRP GCGMRDNMR SELYKYKVV	LEPLGIAPT KARRVV-ERE	KBAI-G-LGA	LFLGFLGTAG
	#D.ZA.86.R482_AY771341 [600]	QGTLRCSNI TGLLFTRDGG N-----	NSSV- -----	NETFRP GCGTDNMR SELYKYKVQ	IEPRGAAPT KARRVV-ERE	KRAI-R-LGA	MFLGFLGAAG
	#F1.BR.93.93BR020_1_AF005494 [600]	AGNITCSNI TGLLLTRDGG L-----	NST- -----	NETFRP GCGMKDNMR SELYKYKVE	IEPLGVAPT KARRVV-KRE	RBAV-G-LGA	LFLGFLGAAG
	#F1.FI.93.FIN9163_AF075703 [600]	AGNITCSNI TGLLLTRDGG QS-----	NNSDS -----	ETFRP GCGMKDNMR SELYKYKVE	IEPLGVAPT KARRVV-ERE	RBAV-A-IGA	VFLGFLSAAG
30	#F2.CM.02.02CM_0016BBY_AY371158 [600]	AGKIQCSNI TGLLLTRDGG SKA---NNT--	-----	DILRP ICGEMDNMR SELYKYKVQ	IQPLGIAPSR AKRRVV-KRE	RBAV-G-IGA	VFLGFLGAAG
	#F2.CM.93.CM4_AJ277819 [600]	AGQIQCSNI TGLLLTRDGG ENT---NGS--	-----	ETLRP GCGMRDNMR SELYKYKVV	IEPLGVAPT KARRVV-ORG	KRAV-G-IGA	VFLGFLGAAG
	#G.ES.00.X558_AF423760 [600]	AGNITCRSI TGLLLTRDGG TX---NKT--	-NGT-EIFRP	AGGMDKNMR SELYKYKIVK	IKPLGVAPT KARRVV-ERE	KRAV-G-LGA	VLLGFLGAAG
	#G.KE.93.HH8793_L2_1_AF061641 [600]	ARNITCSNI TGLLLTRDGG NAN---NASET	-----	ETFRP AGNMKNMR SELYKYKVV	IKPLGVAPT KARRVV-ORE	KRAV-G-VGA	VFLGFLGAAG
	#G.NG.92.92NG083_U88826 [600]	AGNLVCSNI TGLLITRDGG NN---NDSTE	-----	ETFRP GCGMRDNMR SELYKYKVV	IKSLGVAPT KARRVV-ERE	KBAV-G-LGA	VFLGFLGAAG
40	#H.BE.93.VI991_AF190127 [600]	RGNITCSNI TGLLITDR- -----	NNTNN -----	VTFRP GCGMRDNMR SELYKYKVV	IEPLGVAPTE KARRVV-ERE	KRAV-G-MGA	PFLGFLGAAG
	#H.CF.90.056_AF005496 [600]	OQNIMCVSNI TGLLITDEG -----	NASAE N----	YTFRP GCGMRDNMR SELYKYKVV	IEPLGIAPT KARRVV-ERE	KBAV-G-MGA	SFLGFLGAAG
	#J.SE.93.SE7887_AF082394 [600]	AGNITCSNI TGLLLTRDGG NRG---NGSE-	-NGT-ETFRP	TGCMKNMR SELYKYKVE	IEPLGVAPT KARRVV-ERE	KRAV-G-IGA	VFLGFLGTAG
	#J.SE.94.SE7022_AF082395 [600]	AGNITCSNI TGLLITRDGG NR---NGSE-	-NGT-ETFRP	TGCMKNMR SELYKYKVE	LEPLGVAPT KARRVV-ERE	KBAV-G-IGA	VFLGFLGTAG
	#K.CD.97.EQTB11C_AJ249235 [600]	AGNITCRSI TGMILTRDGG ND---NNTFT	E-----	ETFRP GCGMRDNMR SELYKYKVQ	IEPLGIAPT KARRVV-ORE	KRAV-G-IGA	LFLGFLGAAG
50	#K.CM.96.MP535_AJ249239 [600]	AGSINCSNI TGMILTRDGG -----	NNTNN -----	ETFRP GCGMRDNMR SELYKYKVQ	IEPLGIAPT KARRVV-ORE	KRAV-G-LGA	VFFGFLGAAG

10

20

30

40

【表 9 L】

5	gp41	
	gp41 ectodomain	
10	#B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU_K034 [700]	STMGAAASMTL TVQARQLLSG IVQQQNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ ARILAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPMNASWSNK SLEQIWNHRTT
	#A.CD.97.KCC2_AJ401034 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLAG IVQQSNLLK AIEAQHLLR LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTT VPMNSSWSNK SQDEIWNMT
	#A.KE.95.Q168_AF407149 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLSG IVQQSNLLK AIEAQHLLR LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNSSWSNK SQSEIWNMT
15	#A1.FI.91.FIN91121_AF219261 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNSSWSNK SYEQIWDNMT
	#A1.KE.99.KNH1088_AF457063 [700]	STMGAAASITL TVQVRLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNSSWSNK SQSEIWDNMT
20	#A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393 [700]	STMGAAASMTL TVQARQLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNSSWSNK SQSEIWDNMT
	#A1.SE.94.SET253_AF069670 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNSSWSNK SHDDIWNMT
25	#A1.TZ.01.A173_AY253305 [700]	STMGAAASVTL TVQARQLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNSSWSNK SQNEIWDNMT
	#A1.UG.92.92UG037_U51190 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNSSWSNK SHDDIWNMT
30	#A1.UZ.02.02UZ0659_AY829209 [700]	STMGAAASMTL TVQARQLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNSSWSNK SQSEIWDNMT
	#A1.UZ.02.02UZ0663_AY829210 [700]	STMGAAASMTL TVQARQLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNSSWSNK SQSEIWDNMT
35	#A2.CD.97.97CDKS10_AF286241 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLSG IVQQSNLLK AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTT VPMNSSWSNK TYEIIWNMT
	#A2.CY.94.94CY017_41_AF286237 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLK LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTT VPMNSSWSNK SQDEIWDNMT
40	#B.BR.89.BZ167_AY173956 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLSG IVQQQNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPMNTSWSNR SHDSIWNMT
	#B.EC.89.EC003_AY173959 [700]	STMGAAASMTL TVQARQLLSG IVQQQNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPMNASWSNK SFNEIWNMT
	#B.GB.97.CW048_AJ418521 [700]	STMGAAASMTL TVQARQLLSG IVQQQNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPMNTSWSNK SIDAIIWNMT
45	#B.RU.04.04RU128005_AY682547 [700]	STMGAAASMTL TVQARQLLSG IVQQQNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPMNASWSNK SLNEIWDNMT
	#B.RU.04.04RU129005_AY751406 [700]	STMGAAASVTL TVQARQLLSG IVQQQNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTN VPMNTSWSNK SXNXIWDNMT
	#B.US.90.WEAU160_U21135 [700]	STMGAAASMTL TVQARQLLSG IVQQQNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTT VPMNASWSNR SQDYIWNMT
50	#B.US.91.DH12_3_AF069140 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLSG IVQQQNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTT VPMNTSWSNK SIDAIIWNMT
	#B.US.98.1058_08_AY331294 [700]	STMGAAASMTL TVQARQLLSG IVQQQNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ ARVLAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPMNASWSNK SRSEIWNMT
	#C.BR.92.BR025_d_U52953 [700]	STMGAAASITL TVQVRLLSG IVQQSNLLR AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ TRVLATERYL RDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPMNSSWSNR SQDEIWNMT
	#C.ET.86.ETH2220_U46016 [700]	STMGAAASITL TVQARQLLSG IVQQSNLLK AIEAQHLLQ LTVGKIKQLQ TRVLATERYL RDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPMNSSWSNK SQDEIWDNMT

10

20

30

40

【表 9 M】

[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ TRVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTA VPMNSSWSNR TOKEIWDNMT
[700] #C.IN.95.95IN21068_AF067155
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ TRVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTA VPMNSSWSNK SLGDIWDNMT
[700] #C.UG.90.UG268A2_L22948
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTS VPMNSSWSNK TLGEIWNMT
[700] #C.ZA.01.01ZATM45_AY228557
[700] STMGAASVTL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTT VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #D.KE.97.ML415_2_AY322189
[700] STMGAASWAL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGRHICTTN VPMNSSWSNK SLTEIWNMT
[700] #D.SN.90.SE365A2_L22945
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGRHICTTN VPMNSSWSNK SVDEIWNMT
[700] #D.UG.94.94UG114_U88824
[700] STMGAASETR TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGRHICTTT VPMNSSWSNK TOTEIWNMT
[700] #D.ZA.86.R482_AY773341
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SLEEIWNMT
[700] #F1.BR.93.93BR020_1_AF005494
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #F1.FI.93.FIN9363_AF075703
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #F2.CM.02.02CM_00168BY_AY371158
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #F2.CM.93.CA4_AJ77819
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #G.BS.00.X558_AF423760
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #G.KE.93.HH8793_12_1_AF061641
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #G.NG.92.92NG083_U88826
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #H.BE.93.VI991_AF190127
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #H.CF.90.056_AF005496
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #J.SE.93.SE7887_AF082394
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #J.SE.94.SE7022_AF082395
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #K.CD.97.EOTB11C_AJ249235
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SQEEIWNMT
[700] #K.CH.96.MP535_AJ249239
[700] STMGAASITL TVQARQLSS IVQOQSNLLR AIEAQOHLQ LTVMGIKOLQ ARVLAIBERYL KDOQLLGIWG CSGLICTTN VPMNSSWSNK SWEIWNMT

gp41

gp41 ectodomain

-----I

#B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU_K034 WMEWDREINN YTSLIHSLIE ESONQOEKNE OELLELDKWA SLWNFNFTN WLWYIKLFIM IVGGIVGLRI VFAVLIVNR VRQGYSPLSF QTHLPTPRGP
[800]

10

20

30

40

【表 9 N】

5	#A.CD.97.KCC2_AJ401034 [800]	WMQMDKEINN YTEIIYGLIE ESQOQEKNE FELLELDKWA NLWNFEISN WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTIPTSPGPG
	#A.XE.95.Q168_AF407149 [800]	WLQWKEISN YTIQIYTLIE ESQOQEKNE QDALLADKWA SLWNWFDISK WLWIRIFIM IVGGLIGLRI VFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLIPAPRGP
	#A1.FI.91.FIN91121_AF219261 [800]	WMQMDKEISN YTOTIYNLIE KSOIQOQEKNE QDALLADKWT NLMTWFDISN WLWYIKIFIM IIGGLIGLRI VFAVLSAINR VRQGYSPLSF QTHTPNPEGL
	#A1.KE.99.KNH1088_AF457063 [800]	WLQMDKEVSN YTOMIYOLIE ESQOQEKNE QDALLADKWA SLWNWFDITR WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFAVLSIINR VRQGYSPLSF QTHTPNPGGL
	#A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393 [800]	WMQMDKEVIN YTXIIYDLIE KSNQOQEKNE QDALLADKWA SLWNWFDISN WLWYIKIFII IVGSLIGLRI XFAVLYIINR ARQGYSPLSL QTLTPHPGPG
10	#A1.SE.94.SE7253_AF069670 [800]	WLQMDREISN YTEIIYKLIE ESQOQEKNE QDALLADKWA NLWNFEITK WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFAVFSVINR VRQGYSPLSF QTHTPDPGRGL
	#A1.TZ.01.AL73_AY253305 [800]	WLQMDKEISN YTOIYINLIE ESQOQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDISN WLWYIRIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIINR VRQGYSPLSF QTHTPNPRDL
	#A1.UG.92.92UG037_U51190 [800]	WLQMDKEISN YTIKIYELIE ESQOQEKNE KDLLELDKWA SLWNWFDISK WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFAVLSVINR VRQGYSPLSF QTHTPNPRGL
	#A1.UZ.02.02UZ0659_AY829209 [800]	WMQMDKEVIN YTNIIYDLIE KSNQOQEKNE QDALLADKWA SLWNWFDISN WLWYIKIPII IVGGLIGLRI VFAVLSIINR ARQGYSPLSL QTLTPHPGPG
	#A1.UZ.02.02UZ0663_AY829210 [800]	WMQMDKEVIN YTNIIYELIE OSQOQEKNE QDALLADKWA SLWNWFNITN WLWYIKIFII IVGGLIGLRI VFAVLSIINR VRQGYSPLSL QTLIPHPEGP
20	#A2.CD.97.97CDXS10_AF286241 [800]	WLQMDREISN YTNIIYNLIE ESQOQEKNE QDALLADKWA SLWNWFSITN WLWYIRIFIM IVGGLIGLRI VMAIISVNR VRQGYSPLSF QIPTNPPEGL
	#A2.CY.94.94CY017_41_AF286237 [800]	WLQMDKEISN YTNIIYRLIE ESQOQEKNE QDALLADKWA DLWNWFNISH WLWYIRIFIM IVGGLIGLRI VFAIITVNR VRQGYSPVSF QIPTSPGPG
	#B.BR.89.BZ167_AY173956 [800]	WMQWREISN YTGIIYTLIE ESQOQEKNE QELLELDKWA SLWNWFDITN WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHLTPTRGP
	#B.EC.89.EC003_AY173959 [800]	WMQWREISN YTNISYSLIE KSNQOQEKNE QELLELDKWA SLWNWFDITN WLWYIKIFII IVGGLVGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPISF QTRLPTPRGP
	#B.CB.97.CW048_AJ418521 [800]	WMQWREISN YTXTIYNLIE ESQOQEKNE QELLELDKWA SLWNWFDITN WLWYIKIFII IVGGLVGLRI VFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHLPARRGP
30	#B.RU.04.04RU128005_AY682547 [800]	WMQWREISN YTDIYNLIE KSNQOQEKNE QELLELDKWA SLWNWFDITN WLWYIKIFIM IVGGLVGLRI VFTVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLRAPRGP
	#B.US.90.WBAU160_U21135 [800]	WMQWREISN YTGIIYNLIE ESQOQEKNE QELLELDKWA SLWNWFDISN WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFTVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHLPAPRGP
	#B.US.91.DH12_3_AF069140 [800]	WMQWKEISN YTGIIYNLIE ESQOQEKNE QELLELDKWA SLWNWFNISN WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFSVLSIVNR VRQGYSPLSF QTRPPASRGP
	#B.US.98.1058_08_AY331294 [800]	WMQMDKEISN YTNIIYTLIG ESQOQEKNE QELLGLNKWA SLWNWFDITK WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFTVLSIMNR VRQGYSPLSF QTRLPTQRGP
	#C.BR.92.BR025_d_U52953 [800]	WMQMDREISN YTNIIYRLIE DSNQOQEKNE QDALLADKWO NLMTWFGITN WLWYIKIFIK IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLTPNPRGP
40	#C.ET.86.ETH2220_U46016 [800]	WMQMDREISN YTDIYNLIE VSNQOQEKNE KDLALDKWE NLWNWFNITN WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLIPHPRGP
	#C.IN.95.95IN21068_AF067155 [800]	WMQMDREISN YTNIIYRLIE ESQOQEKNE KDLALDSWK NLWNWFDITK WLWYIKIFII IVGGLIGLRI IFAVISIVNR VRQGYSPLSF QTLTPNPGGP
	#C.UG.90.UG268A2_L22948 [800]	WMQMDREISN YTGIIYRLIE DSNQOQEKNE KDLALDKWO NLWNWFDITK WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLTPTRGP
	#C.ZA.01.01ZATM45_AY228557 [800]	WMQMDREISN YTHIIYOLIE ESQOQEKNE KELLALDSWK NLWNWFDISN WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLTPSPREP
	#D.XE.97.ML415_2_AY322189 [800]	WMQWREISN YTDIYTLIE KSNQOQEKNE HELLUKDKWA SLWNWFSITQ WLWYIKIFIM IVGGLIGLRI VFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLTPVPRGP

10

20

30

40

【表 90】

#D.SN.90.SE365A2_L22945
[800] WMEEREIDN YTGIIYSLIE ESQOQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM VVEGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLTPAPRGP
#D.UG.94.94UG114_U08824
[800] WMEEREIDN YTELIVSLLIE VSQIOEKNE QELLALDKWA SLWNWFSITO WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLTPAPRGP
#D.ZA.86.R482_AY773341
[800] WYONEREIEN YTGIIYSLIE ESQOQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDKTS WMTYIKIFIM LLRGLIRFRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTLTPAPRGP
#F1.BR.93.93BR020_1_AF005494
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITO WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#F1.FI.93.FIN9363_AF075703
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#F2.CM.02.02CM_0016BBY_AY371158 WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#F2.CM.93.CA4_AJ277819
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#G.ES.00.X558_AF423760
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#G.KE.93.HH8793_12_1_AF061641
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#G.MG.92.92MG083_U08826
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#H.BE.93.VI991_AF190127
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#H.CF.90.056_AF005496
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#J.SE.93.SE7887_AF082394
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#J.SE.94.SE7022_AF082395
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#K.CD.97.EQTB11C_AJ249235
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP
#K.CM.96.MP535_AJ249239
[800] WMEWEKEYSN YSKEIYRLIE DSONQEKNE QELLALDKWA SLWNWFDITN WMTYIKIFIM IVGGLIGLRI IFAVLSIVNR VRQGYSPLSF QTHIPSREP

9P41

#B.FR.83.HXB2_LAI_I1IB_BRU_K034 DRPGIEBEG GERDRRSIR LVNGSLALI WDLRSICLFS YHRLDLILI VTRIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYMSQELKNS AVSLNATAI
[900] DRPGIEBEG GERDRRSIR LVNGSLALI WDLRSICLFS YHRLDLILI VTRIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYMSQELKNS AVSLNATAI
#A.CD.97.KCC2_AJ401034
[900] DRPGIEBEG GERDRRSIR LVNGSLALI WDLRSICLFS YHRLDLILI VTRIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYMSQELKNS AVSLNATAI
#A.KE.95.Q168_AF407149
[900] DRPGIEBEG GERDRRSIR LVNGSLALI WDLRSICLFS YHRLDLILI VTRIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYMSQELKNS AVSLNATAI
#A1.FI.91.FIN91121_AF219261
[900] DRPGIEBEG GERDRRSIR LVNGSLALI WDLRSICLFS YHRLDLILI VTRIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYMSQELKNS AVSLNATAI
#A1.KE.99.KXH1088_AF457063
[900] DRPGIEBEG GERDRRSIR LVNGSLALI WDLRSICLFS YHRLDLILI VTRIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYMSQELKNS AVSLNATAI
#A1.RU.03.OJRU20_06_13_AY500393 DRPGRIKEEG GERDRRSIR LVNGSLALI WDLRSICLFS YHRLDLILI VTRIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYMSQELKNS AVSLNATAI

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

10

20

30

40

5

#A1.SE.94.SE7253_AF069670
 [900]
 DRPRTEEEG GEQGRGRSIR LVSGFLALAW DOLRSCLUPS YHRLRHFIIL ATTVELLGH SSLKGLRLGW EGLKYLGNUL LYWGQELKLS AISLFDTPA
 #A1.TZ.01.A173_AY253305
 [900]
 DRPGRIEEG GEQGRDRSIR LVSGFLALAW DOLRSCLUPS YHRLRDFTLI VARTVELLGH NSLKGRLRGW EGLKYGNLL VYWGQELKSS AINLLDTIAI
 #A1.UG.92.92UG037_U51190
 [900]
 DRPGRIEEG GEQDRGRSIR LVSGFLALAW DOLRNLCUPS YHRLRDFILI AARTVELPGH SSLKGLRLGW EGLKYGNLL LYWGRELKIS AINLLDTIAI
 #A1.UZ.02.02UZ020659_AY829209
 [900]
 DRPGRIEEG GEQGRDRSVR LVSGFLALAW DOLRSCLUPS YHRLRDFISI AARTVELLGR SSLKGLRLGW EGLKYGNLL GYWGQELKSS AINLLDTIAI
 #A1.UZ.02.02UZ020663_AY829210
 [900]
 DRPGRIEEG GEQGRDRSVR LVSGFLALAW DOLRSCLUPS YHRLRDFISI AARTVELLGR SSLKGLRLGW EGLKYGNLL GYWGQELKSS AINLLDTIAI
 #A2.CD.97.97CDKS10_AF286241
 [900]
 DRHGRIEEG GEQDRTRSIR LVSGFLALAW DOLRSCLUPS YHRLRDFILI VARTVELLGH SSLKGLRLGW EGLKYGNLL LYWGRELKNS AISLINSTAI
 #A2.CY.94.94CY017_41_AF286237
 [900]
 DRPRGTEEG GEQGRDRSIR LVNGFFALAW DOLRSCLUPS YHRLRDCILI AARTVELLGH CSLKGLRLGW EGLKNLWNL LYWGRELKNS AISLFDITAV
 #B.BR.89.B2167_AY173956
 [900]
 DRPGTIEEG GERDRDRSVR LVDFFLALIW DOLRNLCUPS YHRLRDLILI LARIVELLGR -----RGW EILKYWNLL QYWSQELKNS AVSLINATAI
 #B.EC.89.EC003_AY173959
 [900]
 DRPGTIEEG GEKGRDRSGV LVTFGLALIW DOLRSFLUPS YHRLRDLILI VARIVEILGH -----RGW ELLKYWNLL QYWSQELKNS AVSLINATAI
 #B.GB.97.CW048_AJ418521
 [900]
 DRPGTIEEG GGRDRGGSSR LVDFFLALFW DOLRSCLUPS YHRLRDLILI VTRIVELLGR -----RGW EVLYKWNLL QYWSQELKNS AVSLINTTAI
 #B.RU.04.04RU128005_AY682547
 [900]
 DRPEGTIEEG GERDRDKSGR LVDFFLAIW VDLXSLCUPS YHRLRDLILI VTRIVELLGR -----RGW EILKYWNLL QYWSQELKNS AISLINATAI
 #B.RU.04.04RU129005_AY751406
 [900]
 DRPEGTIEEG GEXDRDRSKH LVDFFLAIW VDLRSCLUPS YHRLRDLILI ITRIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYWSQELKXS AISLINATAI
 #B.US.90.WEAU160_U21135
 [900]
 DRPEGTIEEG GERDRDRSGR LVDFFLTLIW VDLRSCLFL YHRLRDLILI AKRIVELLGR -----RGW EALKYCNLL QYWSQELKNS AVSLINATAI
 #B.US.91.DH12_3_AF0693140
 [900]
 DRPEGTIEEG GDRDRDRSP LVDFFLAIW VDLRTFLUPS YHRLRDLILI VTRIVELLGR -----RGW ELLKYWNLL QYWSQELKNS AVSLINATAI
 #B.US.98.1058_08_AY331294
 [900]
 DRPEGTIEEG GERDRDRSGP LVDFFLAIW VDLRSCLFL YHRLRDLILI VTRIVELLGR -----RGW EILKYWNLL QYWSQELKNS AVSLINATAI
 #C.BR.92.BR025_d_U52953
 [900]
 DRLGTEEEG GEQDRDRSIR LVSGFLALAW DOLRSCLUPS YHRLRDLILI AARAVELLGR SSLRGLQRGW EILKYLGSLV QYWSLELKKS AISLFDITAI
 #C.ET.86.ETH2220_U46016
 [900]
 DRLGTEEEG GEQGRDRSIR LVNGFLAIFW DOLRSCLUPS YHRLRDLILI AARTVELLGR SSLKGLQRGW ETIKYLGSLV QYWGLELKKS AINLLNTAI
 #C.IN.95.95IN21068_AF067155
 [900]
 DRLGRIEEG GEQDKDRSIR LVSGFLALFW DOLRNLCUPS YHRLRDFILV AARVLELLGR RSLRGLQRGW EALKYLGSLV QYWGLELKKS AINLLDRIAI
 #C.UG.90.UG260A2_L22948
 [900]
 DRPEGTIEEG GEQDRDRSVR LISGFLALAW DOLRSCLUPS YHRLRDLILI AARAVELLGR SSLRGLQRGW EALKYLGSLV QYWGQELKKS AISLDDITAI
 #C.ZA.01.01ZATW45_AY228557
 [900]
 DRLRGTEEEG GEQDKGRSIR LVQGLALAW DOLRSCLUPS YHRLRDFISI AARVVEVLGH SSLRGLQRGW EALKYLSLV QYWGLELKKS AVSLDDITAI
 #D.XE.97.ML415_2_AY322189
 [900]
 DRPEGTIEEG GEQGRDRSIR LVHGFSALIW DOLRNLCUPS YHRLRDFILI ATRIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYWGQELKNS AISLNTTAI
 #D.SN.90.SE365A2_L22945
 [900]
 DRPEGTIEEG GEQGRDRSIR LVNGFSALIW DGLRNLCUPS YHRLRDLILI AARIVELLGR -----RGW EVLYKWSLL QYWIQKKNK AISLDTIAI
 #D.UG.94.94UG114_U88824
 [900]
 DRPEGTIEEG GERDRGRSIR LVNGLSALIW DDLRNLCUPS YHRLRDLILI AARIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYWGQELKNS AVSLNTTAI
 -----G GEQGRDKYIR LMRGFSALIW DDLRNLCFLG YHRSROLILL AARIVELLGR -----RGW EALKYWNLL QYWSQELKNS VISLDTIAI
 #D.ZA.86.R482_AY773341
 [900]
 DRPEGTIEEG GEQGRDRSVR LVNGFLALVW DDLRNLCUPS YHRLRDFILI AARIVDRGLR -----RGW EALKYGNII QYWSQELKNS AISLNTTAI
 #F1.BR.93.93BR020_1_AF005494
 [900]
 DRPEGTIEEG GEQGRDRSVR LVTFGLALAW DDLRNLCUPS YHRLRDFILI AARIVDRGLK -----RGW EALKYGNLT QYWGQELKNS AISLINATAI
 #F1.FI.93.FIN9363_AF075703
 [900]
 DRPEGTIEEG GEQGRDRSVR LVNGFLALVW DDLRNLCUPS YHRLRDFILI AARIVDRGLR -----RGW EALKYGNII QYWSQELKNS AISLNTTAI

【表 9 Q】

#F2.CM.02.02CM_0016BBY_AY371158 DRPGIEEG GEQDKRSVR LVSGFLALAW DDLRSCLFS YHRLDFVLI AARTVD-----RGLKGGW EVLKYLWNL QYWGRELKYS AISLINTTAT
[900]
#F2.CM.93.CM4_AJ277819 DRPGIEEG GEQDKRSIR LVNGLSALW DDLRSCLFS YHRLDFVLI AARSVDLLGR-----RGM EALKYLWNL QYWSQELKNR AISLIDATAI
[900]
#G.ES.00.X558_AF423760 DRPGIEEG GEQDKRSIR LVSGFPALAW DDLRSCLFS YHRLDFVLI AARTVELLGR SSLKGLRGM EGLKYLWNL QYWGRELKYS AINLIDTVAL
[900]
#G.KE.93.HH8793_12_1_AF061641 DRPERIEEG GEQDKRSIR LVSGFLALAW DDLRSCLFS YHRLDFVLI AARTVELLGR SSLKGLRGM EGLKYLWNL QYWGRELKYS AINLIDTVAL
[900]
#G.NG.92.92NG083_U88826 DRPGIEEG GEQDKRSIR LVSGFLALAW DDLRSCLFS YHRLDFVLI AARTVELLGR SSLKGLRGM EGLKYLWNL QYWGRELKYS AINLIDTVAL
[900]
#H.BE.93.VI991_AF190127 DRPERIEEG GEQDKRSIR LVNGFLPLVW EDLRSCLFS YHRLDFVLI AARTVELLGR -----RGM EALKYLWNL QYWGRELKYS AISLINTTAT
[900]
#H.CF.90.056_AF005496 DRPGIEEG GEQDKRSVR LVNGFLPLVW DDLRSCLFS YHRLDFVLI VRTVELLGR -----RGM EALKYLWNL QYWGRELKYS AISLINTTAT
[900]
#J.SE.93.SE7887_AF082394 DRPGIEEG GEQDKRSIR LVNGFLALAW DDLRSCLFS YHRLDFVLI AARTVGTGL -----RGM EALKYLWNL QYWGRELKYS AISLINTTAT
[900]
#J.SE.94.SE7022_AF082395 DRPGIEEG GEQDKRSIR LVNGFLALAW DDLRSCLFS YHRLDFVLI AARTVGTGL -----RGM EALKYLWNL QYWGRELKYS AISLINTTAT
[900]
#K.CD.97.EQTB11C_AJ249235 DRPGIEEG GEQDKRSVR LVSGFLALAW DDLRSCLFS YHRLDFVLI ATRILD-----RGLKGM EALKYLWNL QYWGRELKYS AISLINTTAT
[900]
#K.CM.96.MP535_AJ249239 DRPGIEEG GEQDKRSVR LVSGFLALAW DDLRSCLFS YHRLDFVLI VTRILE-----RGLKGM EALKYLWNL QYWGRELKYS AISLINTTAT
[900]

25

30

gp41
-----I

#B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU_K034 AVAEGTDRVI EVQACRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A.CD.97.KCC2_AJ401034 TVAEGTDRVI EVQACRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A.KE.95.Q168_AF407149 AVAEGTDRVI EVQACRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A1.FI.91.FIN91121_AF219261 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A1.KE.99.KNH1088_AF457063 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A1.SE.94.SE7253_AF069670 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A1.TZ.01.A173_AY253305 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A1.UZ.02.02UZ0659_AY829209 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A1.UZ.02.02UZ0663_AY829210 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A2.CD.97.97CDK510_AF286241 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#A2.CY.94.94CY017_41_AF286237 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#B.BR.89.BZ167_AY173956 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#B.EC.89.EC003_AY173959 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#B.GB.97.CW048_AJ418521 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#B.RU.04.04RU128005_AY682547 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#B.RU.04.04RU129005_AY751406 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#B.US.90.WEAU160_U21135 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#B.US.91.DH12_3_AF069140 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]
#B.US.98.1058_08_AY331294 AVAGMTDRVI EIGORIGRAI RHIPRIROG LERILL [936]

35

40

45

50

10

20

30

40

【表 9 R】

#C.BR.92.BR025_d_U52953	AVAEGTDRII	EVIQIWRAI	CNIPRIROG	FEAALQ	[936]
#C.ET.86.ETH2220_U46016	VVGEGRFI	ELIQIRAF	CNIPRIROG	LEAALQ	[936]
#C.IN.95.95IN21068_AF067155	AVAEGTDRII	ELVQICRAI	RNIPRIROG	FEAALQ	[936]
#C.UG.90.UG268A2_L22948	AVSEGTDRII	EVGGIGRAI	LHIPRIROG	FEAALQ	[936]
#C.ZA.01.01ZATW45_AY228557	AVGEGTDRII	ELIQICRAI	RNIPRIROG	FEAALQ	[936]
#D.KE.97.ML415_2_AY322189	VVAEGTDRAI	EIIQRAFRF	LNIPTRIROG	LERALL	[936]
#D.SN.90.SE365A2_L22945	AVAEGTDRII	DWQACRAI	LHIPTRIROG	LERALL	[936]
#D.UG.94.94UG114_U88824	AVAEGTDRAI	ELVQACRAI	LNIPTRIROG	LERALL	[936]
#D.ZA.86.R482_AY773341	ATAEGTDRVI	EVLIRACRAI	LNIPRIROG	FERILL	[936]
#F1.BR.93.93BR020_1_AF005494	AVAEGTDRVI	EALQACRAI	LNIPRIROG	LERALL	[936]
#F1.FI.93.FIN9363_AF075703	VVAEGTDRVI	EALQACRAI	LNIPRIROG	VERALI	[936]
#F2.CM.02.02CM_0016BBY_AY371158	VVAEGTDRVI	EILQACRAI	LNIPRIROG	FERALL	[936]
#F2.CM.93.CA4_AJ277819	AVAEGTDRII	EIIQRTFRAI	LNIPRIROG	LERALL	[936]
#G.ES.00.X558_AF423760	AVANWTDRAI	EVQVGRF	FNIPTRIROG	LERILL	[936]
#G.XE.93.HH8793_12_1_AF061641	AVANWTDRAI	EIVQAFRAF	LNIPTRIROG	LERALL	[936]
#H.NG.92.92NG083_U88826	ATANGTDRVI	EVAQACRAI	LNIPTRIROG	LERALL	[936]
#H.BE.93.VI991_AF190127	AVAEGTDRII	ELVQACRAI	LHIPRIROG	FERALL	[936]
#H.CF.90.056_AF005496	AVAEGTDGII	VIVQACRAI	LHIPRIROG	FERSLL	[936]
#J.SE.93.SE7887_AF082394	AVAEGTDRII	EIAQACRAI	LHIPRIROG	LERALL	[936]
#J.SE.94.SE7022_AF082395	AVAEGTDRII	EIAQACRAI	LHIPRIROG	LERALL	[936]
#K.CD.97.EQTBI1C_AJ249235	AVAEGTDRII	EIVQAFRAF	LHIPRIROG	FERILL	[936]
#K.CM.96.MP535_AJ249239	AVAGGTDRII	EIQACRAI	LHIPRIROG	LERALL	[936]

10

20

30

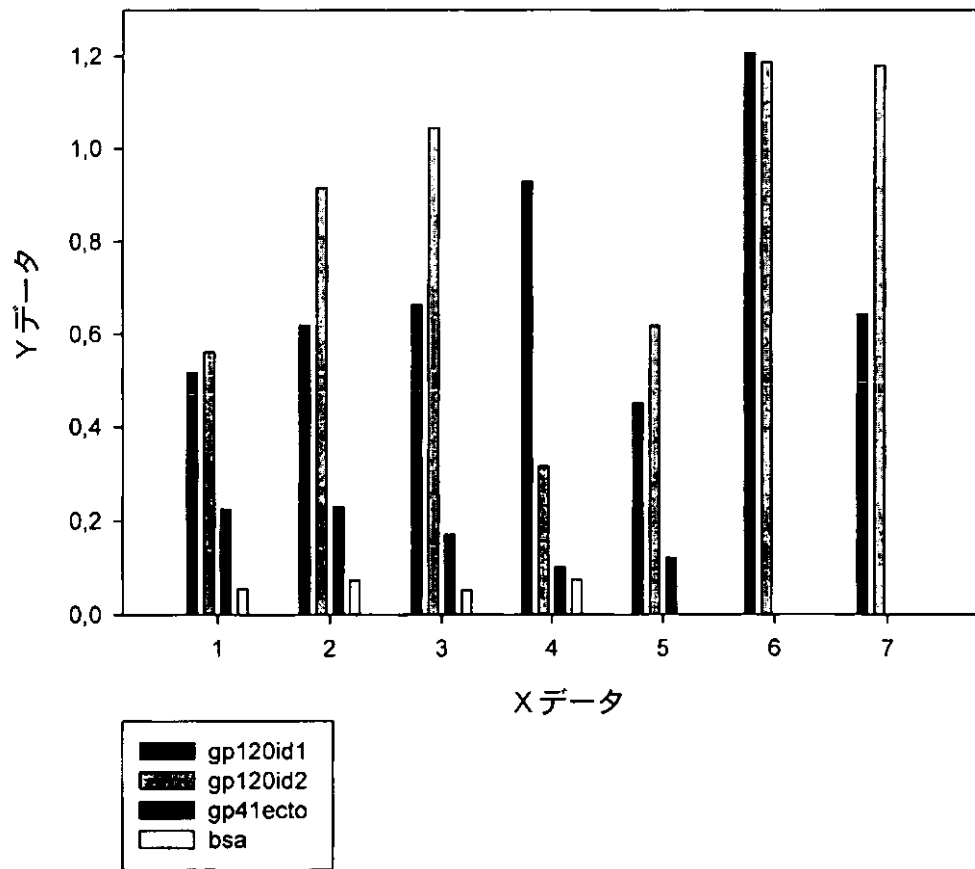
【 0 1 8 2 】

実施例 4：動物の免疫化の予備的結果(SigmaPlot 10.0統計解析)

体重 11 ~ 14 g の 3 週齢の B a l b C マウスを、該動物にとって純粋なペプチドの投与量 20 ~ 50 μ g で皮下により免疫化し、脂質濃度 MW は 5 mg / ml であった。この免疫化は、3 週齢マウスにおいて行い、それらが 5 週齢になった後 2 週間 2 回目を、マウスが 9 週齢になった時 1 ヶ月後に 3 回目を行った。組換え gp 120 は、組換え gp 41 エクトドメインよりも、平均で 5 倍高いレベルの免疫応答を誘発した。患者の血清から単離されたヒトポリクローナル抗体を、同濃度の組換え gp 120 及び gp 41 の E L I S A 染色に使用した場合にも、特異抗体力価の同じ差異が認められた。

40

【化 1 2】



10

20

【 0 1 8 3】

参考文献

30

【表 10A】

1. Abram M.E., Parniak M.A. "Virion Instability of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase (RT) Mutated in the Protease Cleavage Site between RT p51 and the RT RNase H Domain" Journal of virology, September 2005, v. 79, No18, 11952-11961;
2. Aguilar M-I. "HPLC of Peptides and Proteins" "Methods in Molecular Biology Seri", v.251, Humana Press, 2004; 10
3. Amicosante M., Cappelli G. "Method of Antigenic Peptide Identification and Relative Use for the Preparation of a Vaccine Anti HIV-1" Uni Degli Studi di Roma Tor Ve (IT), WO2005075679, 2005-08-18;
4. Barbados C.F. et al. "Phage Display: A Laboratory Manual", 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press;
5. Berman P.W., Fendly B.M. et al. "HIV Env Antibodies" Applicant Genetech INC, US patent US 7041293 B1, 2006-05-09; 20
6. Berman P.W., Nakamura G.R. "Preparation of an HIV GP 120 Subunit Vaccine Involving Determining a Neutralising Epitope in the V2 and/or C4 Domains", Applicant Genetech INC, US patent NZ267838, 1997-12-19;
7. Bongiovanni M. et al., "Long Term Immunologic Outcome in HAART-Experienced Subjects Receiving Lopinavir/Ritonavir", AIDS Research and Human Retroviruses, 2006, 22(11), pp 1099-1105;
8. Butera S.T. "HIV Chemotherapy. A Critical Review", Caister Academic Press, 2005, U.K; 30
9. Capodici J. et al., "Large-Scale Beta-Propiolactone Inactivation of HIV for Vaccines" Bioprocess Int., 2006, Feb., pp 36-41;
10. Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, et al. "Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages", J Virol, 2006 Sep;80(18):9039-52;
11. Emini, E., Shiver J., Casimiro, D. R. et al. "Therapeutic Immunization of HIV-infected 40

【表 10B】

- individuals” Appl.: MERCK&CO., INC. A01N 43/04 (2006.01), WO/2005/027835, 31.03.2005;
12. Franchini G., Hel Z., Pavlakis G. et al. “Improved immunogenicity using a combination of DNA and Vaccinia virus vaccines” Appl.: The Government of USA, A61K 39/21 (2006.01), WO/2001/082964, 08.11.2001; 10
13. Haynes B., Desaire F., Heather F. et al. “Carbohydrate-based vaccines for HLV” Appl.: Duke University, US Patent A61K 39/00 (2006.01), WO/2008/033500, 20.03.2008;
14. Herschhorn A. et al., 2003, “Recombinant human antibodies against the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type-1” Biochim Biophys Acta, 1648:154-163;
15. Honda M., Matsuo K. “A Method of Prime-boost Vaccination”, Appl.: Japan Science&Tech Agency (JP); JP Nat Inst of Infectious Disease (JP), Patent WO2006057454, 2006.06.01; 20
16. Humphreys R., Macmillan D., Zinckgraf J. „Ii-key enhanced vaccine potency” US Patent A61K 48/00, Applicant: Antigen Express, Inc. ,WO 2008/060385, 22.05.2008;
17. Ghania G. et al., “Attaching histidine-tagged peptides and proteins to lipid-based carriers through use of metal-ion-chelating lipids”, Biochimica et Biophysica Acta 1567 (2002) 204– 212;
18. Grundner,C. et al., “Factors limiting the immunogenicity of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins” J. Virology, 2004.Dec.5.;330.(1.):233.-48; 30
19. Karn J. “HIV Volume 1: Virology and Immunology” Oxford University Press, 1995, reprinted 2001, 63-75;
20. Karp N.M. “Immunogenic Composition and Method of Developing a Vaccine Based on Psoralen Inactivated HIV” Appl.: NMK RES LLC (US), US Patent WO2005040353, 2005-05-06;
21. Kirschner M., Monroe V., Paluch M., Techodamrongsin N., Rethwilm A., Moore J. „ The production of cleaved, trimeric human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelop glycoprotein vaccine antigens and infectious pseudoviruses using linear polyethylenimine as a transfection reagent” Prot. Expres. Purification, Jul. 2006, 48(1), 61-68;- 40
22. Kwong P.D. et al. “Structure of an HIV-1 gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody”, Nature, (1998) 393:649–

【表 10C】

- 59;
23. Maniatis et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", 1991, Cold Spring Harbor Laboratory Press;
 24. Leitner T. "HIV Sequence Compendium 2006-2007", Los Alamos National Laboratory annual issue;
 25. Liu B., Marks J.D. "Applying phage antibodies to proteomics: selecting single chain Fv antibodies blotted on nitrocellulose" *Analytical Biochem.* 2000, 286, 119-128;
 26. Lu X., Dropulic B. "Lentivirus vector-based approaches for generating an immune response to HIV humans" US Patent, Appl.: VIRXSYS Corporation, WO/2005/023313, 17.03.2005;
 27. Martin L., Stricher F., Descours A. et al. "CD4 mimic peptides and their uses" Appl.: Commissariat A L'Energie Atomique, C07K 14/705, WO/2007/144685, 21.12.2007;
 28. Marks J. D. et al. "By-passing Immunization Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage" 1991, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597;
 29. Peluso R., Arnold S., Wustner J. Et al. "Recombinant AAV-based vaccine methods" US Patent C12N 15/864, Applicant: Targeted Genetics Corporation, WO 2006/073496, 13.07.2006;
 30. Picker, L. J., Jarvis, M., Nelson, J, A. "SIV and HIV vaccination using RHCMV- and HCMV-based vaccine vectors" US Patent C12N 15/63 (2006.01), Appl.: Oregon Health and Science University, WO/2006/031264, 23.03.2006;
 31. Poignard P. et. al., "Heterogeneity of envelope molecules expressed on primary human immunodeficiency virus type 1 particles as probed by the binding of neutralizing and non-neutralizing antibodies" *J. Virol.* 2003. Jan.; 77.(1.): 353-65;
 32. <http://iavireport.org/specials/OngoingTrialsOfPreventiveHIVVaccines.pdf>, NIAID's report 2007 "Ongoing Trials of Preventive AIDS Vaccines" ;
 33. Sala M. Greco, R. et al. "Polynucleotides allowing the expression and secretion of recombinant HbSag virus-like particles containing a foreign peptide, their production and use" Appl.: Institute Pasteur, WO Patent 2008/020331, C07K 14/43, 21.02.2008;
 34. Sanders R.W. et al., "Mutational Analyses and Natural Variability of the gp4143. Ectodomain", *The 2002 HIV Sequence Compendium*;

10

20

30

40

【表 1 0 D】

35. Sidhu S.S. "Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery", 2005, Taylor & Francis group;
36. Soerensen B. "HIV peptides, antigens, vaccine compositions, immunoassay kit and a method of detecting antibodies induced by HIV", Appl.: BIONOR AS (NO), Patent WO0052040, 2000.09.08;
37. Steinbrook R. "One Step Forward, Two Steps Back — Will There Ever Be an AIDS Vaccine?" New England Journal of Medicine, Dec. 27, 2007(26), 357:2653-2655;
38. Torchilin VP, Levchenko TS, Lukyanov AN, Khaw BA, Klibanov AL, Rammohan R, Samokhin GP, Whiteman KR. "p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups", Biochim Biophys Acta. 2001 Apr 2;1511(2):397-411;
39. Torchilin V.P. "Liposomes: A Practical Approach" Edition: 2, Publisher: Oxford Univ. Press, publ. 08/01/2003;
40. Wyatt R. et al., Sodroski J. The antigenic structure of the human immunodeficiency virus gp120 envelope glycoprotein. Nature, (1998) 393:705-11;
41. Wyatt R. et al., Sodroski J.G. "Structure of the Core of the HIV-1 gp120 Exterior Envelope Glycoprotein" The Human Retroviruses and AIDS Compendium, 1998;
42. <http://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/vaccine/public/> Los Alamos HIV vaccine trials database.

10

20

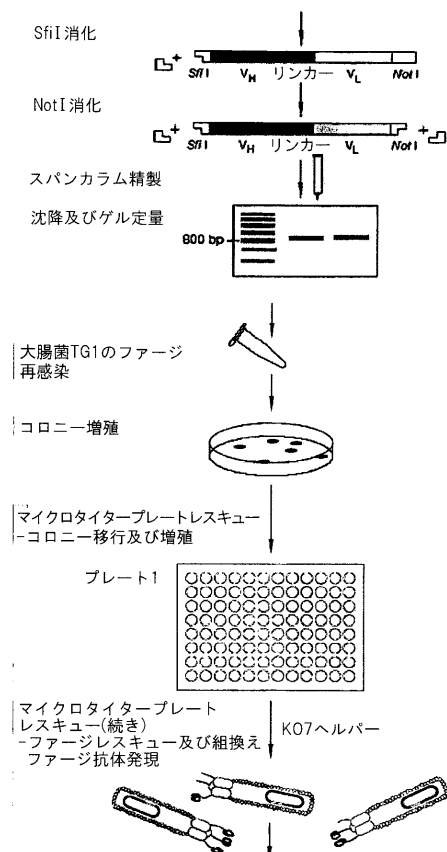
30

【 図 2 A 】

図2：本発明の方法の好ましい実施態様に従うファージミドDNAライブラリーの獲得手法のスキーム；

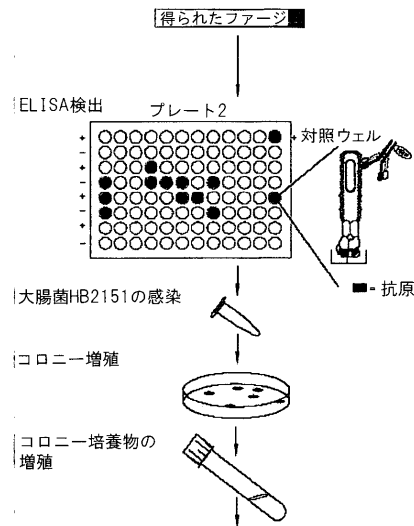
-
- B細胞
- 軽鎖mRNA
- 重鎖mRNA
- mRNA精製
- QuickPrep(商標) mRNA精製キット
- 重鎖(H)mRNA
- 軽鎖(L)mRNA
- 第一鎖cDNA合成
- 逆転写酵素+pd(N)₆
- cDNA
- 増幅1
- プライマー
- V_H C_{H1} C_{H2} C_{H3} V_L C_L
- AmpliTaq(登録商標)
- +dNTP
- 30サイクル
- V_H C_{H1} V_L C_L
- ゲル分析、バンド分離、ゲル精製
- 増幅2(リンカー-含むプライマーによる)
- V_H C_{H1} V_L C_L

【 図 2 C 】



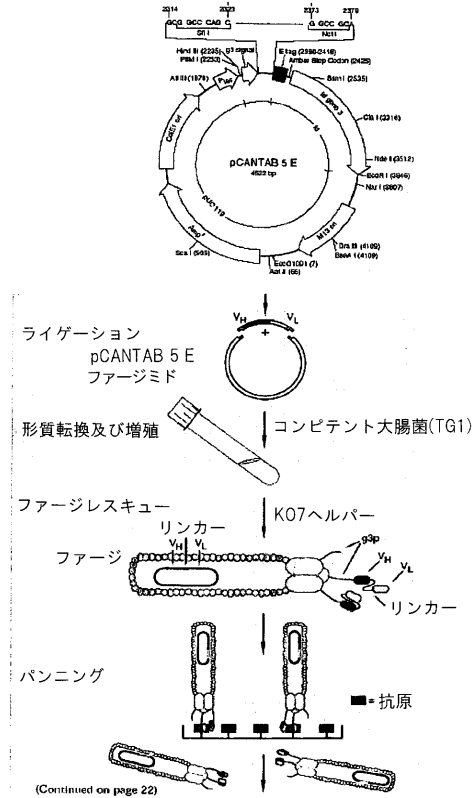
【 図 3 】

図3：本発明の好ましい実施態様に従うELISA技術による陽性抗体産生クローンの選択を示す図



【 図 4 】

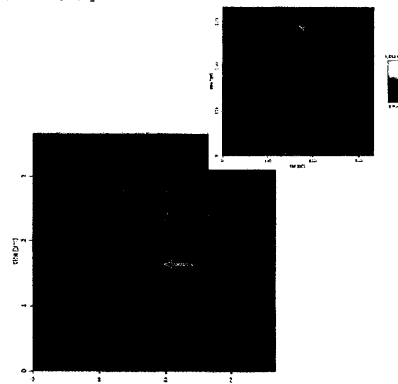
図4：組換えファージライブラリー形成及びパンニング選択；



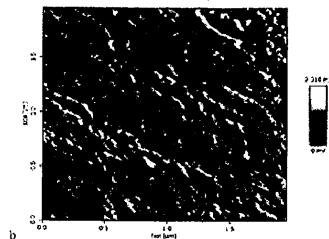
【 図 5 】

図5a-b：「ヘッド」上に提示された濃厚化されたHIV envペプチド-特異抗体ライブラリーを伴う、組換えヘルパー-M13ファージの構造。走査型プローブ顕微鏡(SPM又はAFM)接触モードは、Nikon Eclipse 2000UをベースにしたNanoWizard(JPK Instruments社、独国)を用い、スティンガカンチレバーCSC17/noAl、共振振動数12kHz(MicroMash社、エストニア)で行った。ファージの長さは平均800nm、厚さは40~50nmであり、HIV-特異的ScFvライブラリーの提示は、1個のファージ粒子につき2~10抗体分子である；この「ヘッド」の測定されたサイズは、平均200~250nmである。

a)組換えM13ファージ、及び提示されたHIV-特異抗体ライブラリーを伴うその「ヘッド」



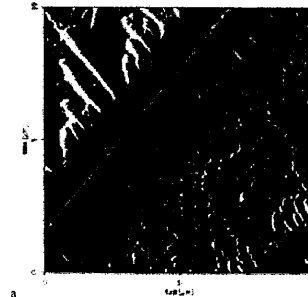
b)対照M13K07ヘルパーファージ



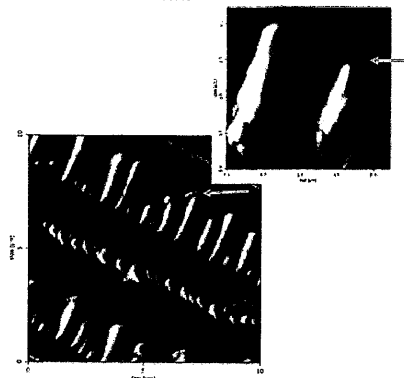
【 図 6 】

図6a-b：リバースパンニング技術に使用された、アフィニティ超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ活性化されたカラムの構造。走査型プローブ顕微鏡(SPM)接触モードは、スティンガカンチレバーCSC17/noAlで、NanoWizard接触モードを用いて行った。

a)組換えファージ包埋以前の、超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ-活性化された吸着剤



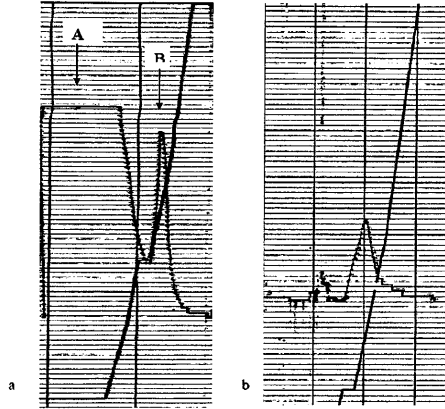
b)M13 mAb包埋後の、提示された組換えファージHIV-特異的ScFvライブラリーを伴う、超マクロ多孔質モノリス構造のエポキシ-活性化された吸着剤；



【図 7】

図7a、b: HIV envペプチドを収集するためのリバースバンニング技術:

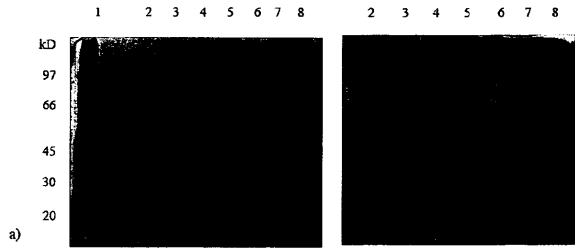
- a) RPアフィニティカラムから溶離された画分のプロファイル(亜型Aプール単離物、PEG-沈降及びそれに続く20%ショ糖勾配中100000gでの超遠心を、濃縮に使用した)。ピークA及びBは、ポリクローナル抗-HIV抗体を使用するウェスタンブロットにより特異的envペプチドの存在についてチェックした;
- b) RPアフィニティカラムから溶離された画分のプロファイル(亜型Aプール単離物、限外濾過を、上清の濃縮に使用した)。ピークは、ポリクローナル抗-HIV抗体を使用するウェスタンブロットによりチェックした;



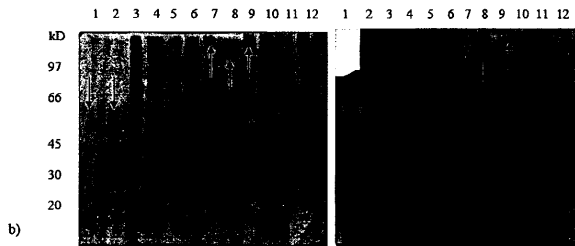
【図 8】

図8a-b: リバースバンニングカラムからのHIV亜型A envペプチドプールの溶離された画分のSDS-PAGE及びウェスタンブロット(ECL検出):

- a) 1-ハイレンジマーカー; 2-画分番号4; 3-画分番号5; 4-画分番号6; 5-画分番号7; 6-画分番号8; 7-画分番号11; 8-画分番号9; -全てのアッセイは、 β -メルカプトエタノール(β -ME)と共に調製した



- b) 1-画分番号1 β -MEあり; 2-画分番号2 β -MEあり; 3-HIV-PEG β -MEあり; 4-HIV-沈降物 β -MEあり; 5-HIV-上清 β -MEあり; 6-ハイレンジマーカー; 7-fr No1 β -MEなし; 8-画分番号2 β -MEなし; 9-画分番号6 β -MEなし; 10-HIV-PEG β -MEなし; 11-HIV-沈降物 β -MEなし; 12-HIV-上清 β -MEなし



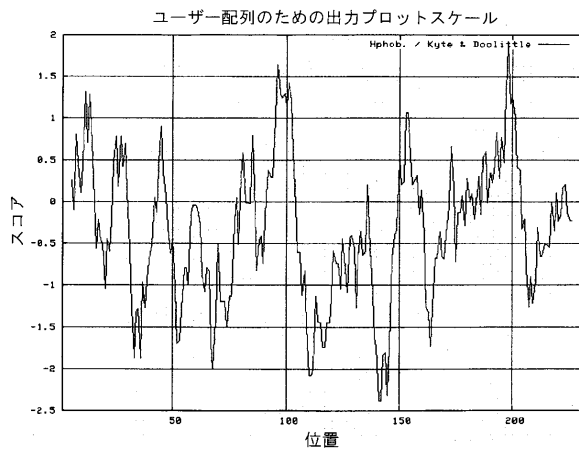
【図 9 A】

図9a-c: 配列決定及び2D分析による、Envシグナルペプチドgp120構造の再構築:

- a) #A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393
MKAKGMQRNYQHILWRGXMLFWXIM

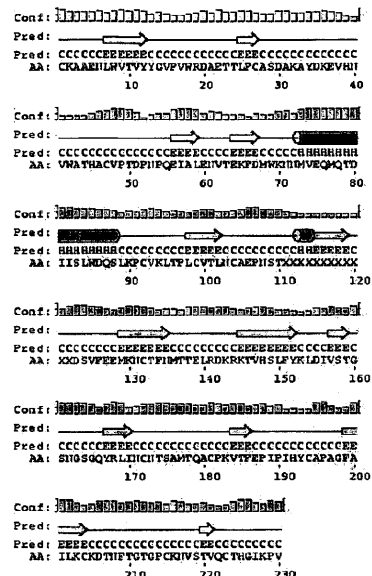
gp120内部ドメイン
#A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393

CKAAENLVVYVYGVVWRDAETLFCASDAKAYDKEVHNWVHACVPTDNPQZIALENVTEKFDWKNMVMQ
QIDILSLDQSLKPCVKLTPLCVTLN...VEEFMKNC...MTETSDERKTIVGLSC...
EIVSTGSGS...NTSAMTOACPRVTFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDINFITGPKCKNVSTVQCTHGKIPV



【図 9 B】

gp120内部ドメイン
#A1.RU.03.03RU20_06_13_AY500393

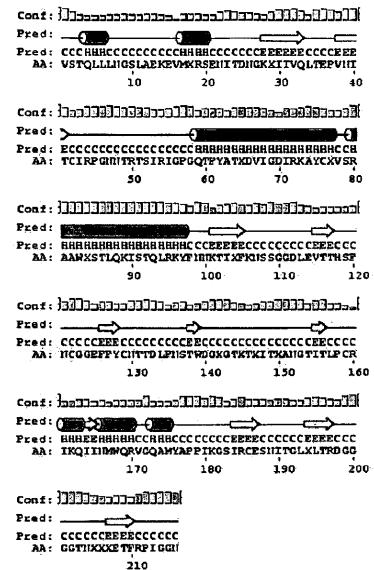
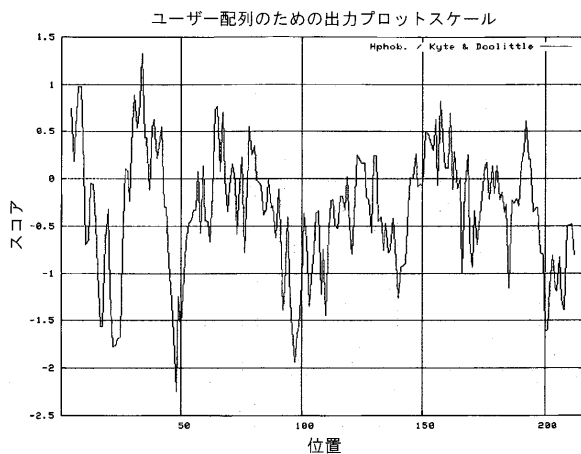





リガンド:
-ヘリックス Conf: 1.0000 - 推定の信頼性
-鎖 Pred: 推定された二次構造
-コイル AA: 標的配列

【 図 9 D 】

gp120外部ドメイン v5
#A1.RU.03.03RU20 06 13 AY500393



VS TOLLNGSLAFKEVMXRSENITDNGKXIIVOLTEPVNITCIRFGNNRTSIRIGPGOTFYATXDVIGDIRKAYCX
VSRAANXSTLQKISTQLRKXYFNKTIKFNKSSGGDLEVTIHSFNCGGEFFY
RIKQIINMWQVRVGQAMYAPPIKGSIRCESNITGLXLRDGGGGTNNXXNETFRIGGN



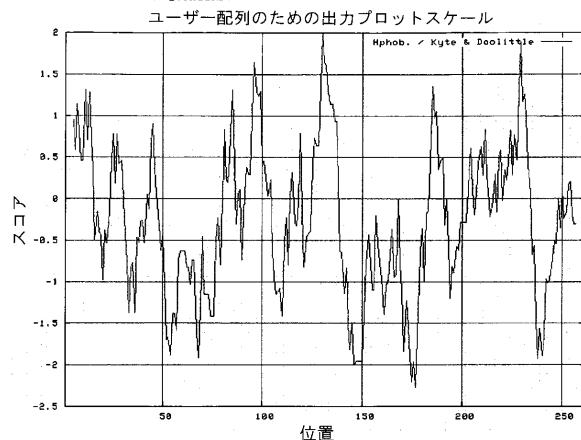
リガンド：
 -ヘリックス Conf: 3.00001 -推定の信頼性
 -鎖 Fold: 推定された二次構造
 -コイル AA: 標的配列

【 図 9 F 】

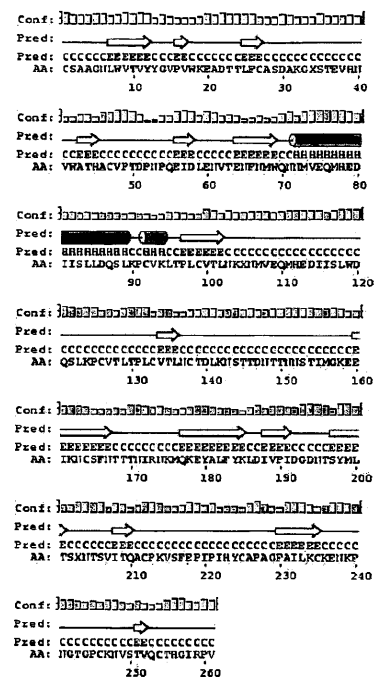
b) B.RU.04.04RU128005_AY682547
MRARGIRKNYQGLLRWGTLLLGILMI

gp120内部ドメイン  
B.RU.04.04RU128005_AY682547



CSAAGNLVIVYGVVPWFKEADTLFCAQKXSTEVHNVWATHACVPIDPNOEIDLNVLENFNHGNMVEQM
HEDIISLLDQSLKPCVKLPLCVLTLNKNMVEQMREDIISLLDQSLKPCVLTLPCLVTLMGKLEKIN
SGKEEKINSPTTINIRNTHQDALEYALKVLIVILGDNTSYMLTSKNTSVITQAQVFSEPIPHYCAGAFA
ILCKRCEKPGNGIPGNSVTVCTOCHGRFP



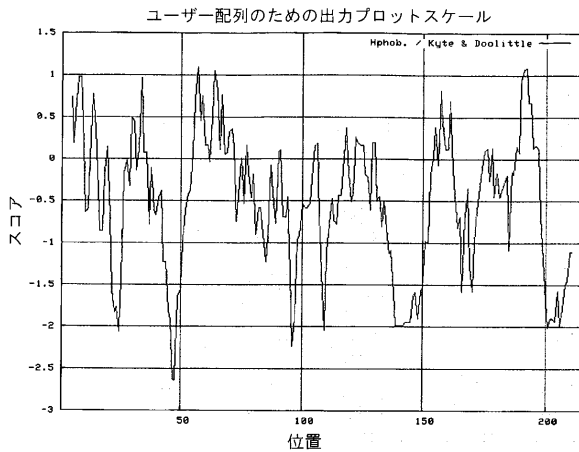
gp120内部ドメイン u2
B.RU.04.04RU128005 AY682547





【図 9 G】

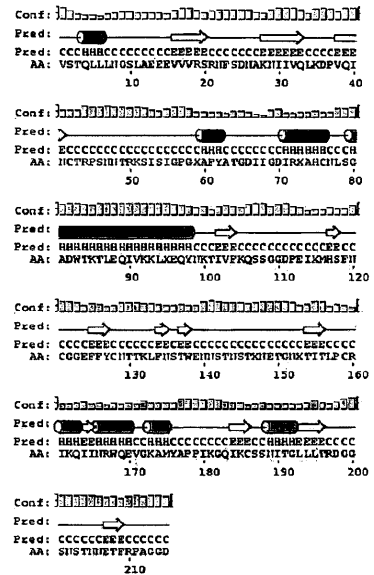
gp120外部ドメイン  
B.RU.04.04RU129005_AY682547






VSTQLLNGSLAEFVVVRSRNFSDNAKNIIVQIKDPVQINCTRPSSNIRKSIIGPGXAFYATGDIIGDIRXAHCV
LSGADIKITILEQIVKKLXEQYNKIIVFKQSSGGDPEIMMHSFNCGEFFV
NIQIINRWQEVGRAMYPPIKQIKCSNITGLLLTRDGGSSNINNETFRZAGGD



【図 9 H】

gp120外部ドメイン  
B.RU.04.04RU129005_AY682547





リガンド:
 - ヘルックス  - 推定の信頼性
 - 鎖  - 推定された二次構造
 - コイル AA: 標的配列

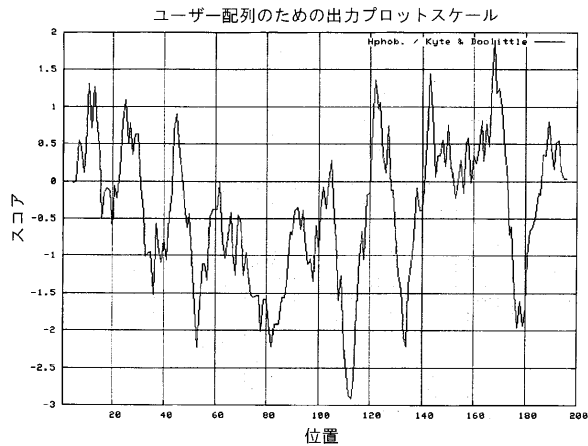
pic. B.RU.04.04RU129005_AY682547

【図 9 I】



c) #B.RU.04.04RU129005_AY751406
MRAKGTRKNYQRLWRWGMLLM

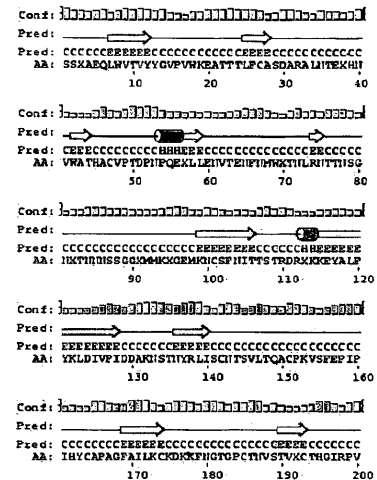
gp120内部ドメイン  
#B.RU.04.04RU129005_AY751406






SSXAEQLVTVVYGVVWKEATITLFCASDARALNTEKHNVWATHACVETDPNPQEXLLENVNFNNG
NENRQSGGQGGGKXGEMKNGENITSTRDRKKK7ALT7KLDIVETCDARVSTMYRLISNTSVLTQACPKV
SFEPIPIHYCAPAGFAILCKCKDKKFKNGIGPCINVTXCTHGRPV





【図 9 J】

gp120内部ドメイン  
#B.RU.04.04RU129005_AY751406

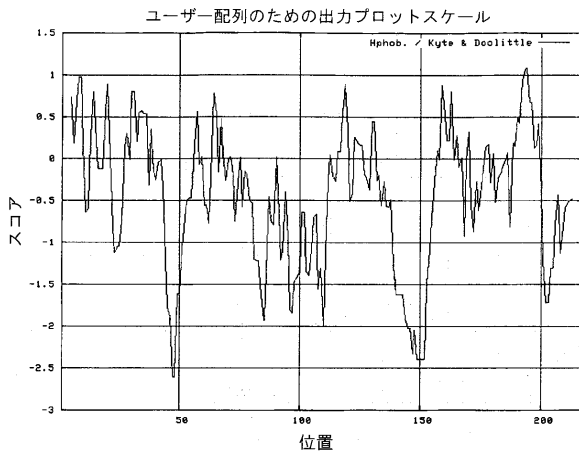


リガンド:
 - ヘルックス  - 推定の信頼性
 - 鎖  - 推定された二次構造
 - コイル AA: 標的配列



【図 9 K】

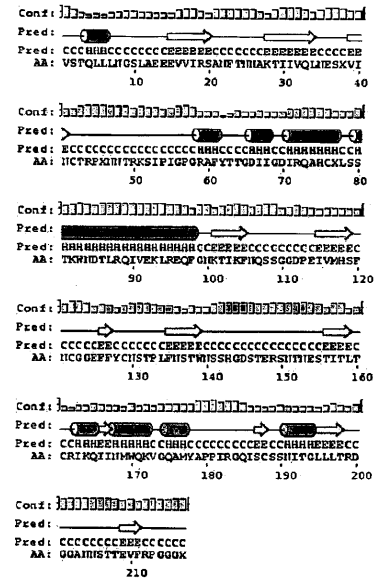
gp120外部ドメイン   v5
#B.RU.04.04RU129005_AY751406







VSTQLLLNGSLAEFEVVRISANFTNNAKTIIVOLNESXVINCFKXNNTKSTIPIGPGRFYITGDIIGDIRQARCK
LSSTKNNDTINQIVZKLREQFGWTKIKFVQSSGDDPEIVMSEFACGGEFFI
V3:RIKQIINMQRVQAMVAPPTRGQISCSNITGLLLIRDGGAYNSTIIVFRPQGGX



【図 9 L】

gp120外部ドメイン   v5
#B.RU.04.04RU129005_AY751406

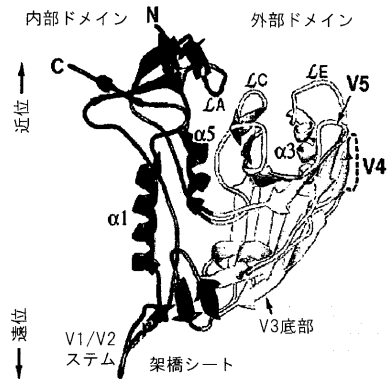


リガンド:
 - ヘリックス Conf:  - 推定の信頼性
 - 鎖 Pred:  - 推定された二次構造
 - コイル AA:  - 標的配列

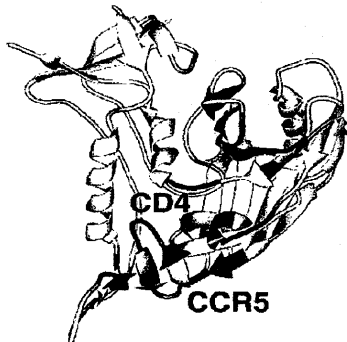
【図 10 A B】

図10a-d: HIV-1エンベロープペプチドの概略的3D構造

a)gp120コアの概略的3D構造[40,41]

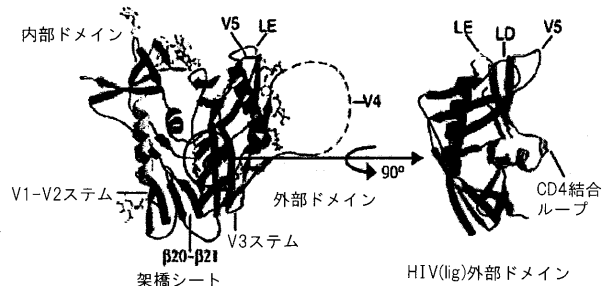


b)gp120 CD4-CCR5結合エピトープの概略的3D構造[24]



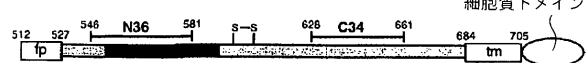
【図 10 C】

c)CD4-結合ループ形成におけるgp120形質転換の概略的3D構造[22]

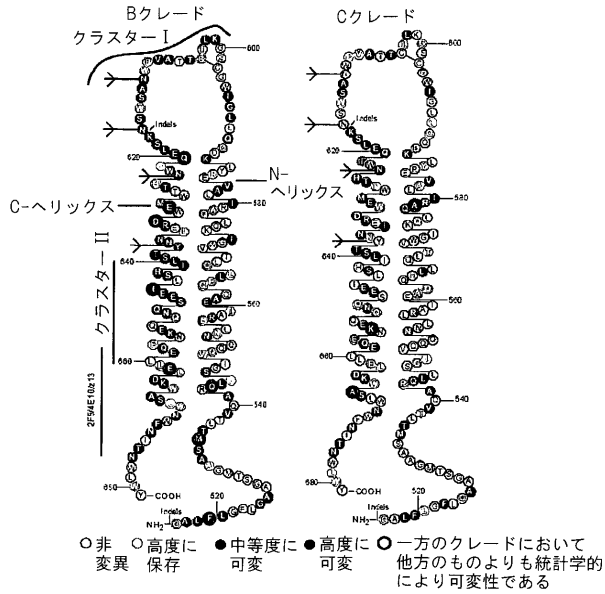


【図 1 0 D】

d)gp41エクトドメインの構造及び変動性[34]

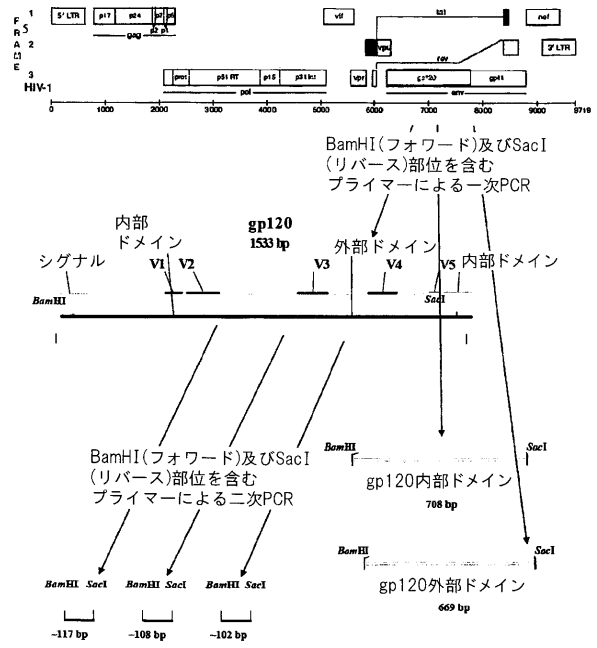


gp41配列におけるアミノ酸位置に番号付けしているHXB2参照鎖配列；
エクトドメイン-512-684残基；膜貫通ドメイン-684-705残基

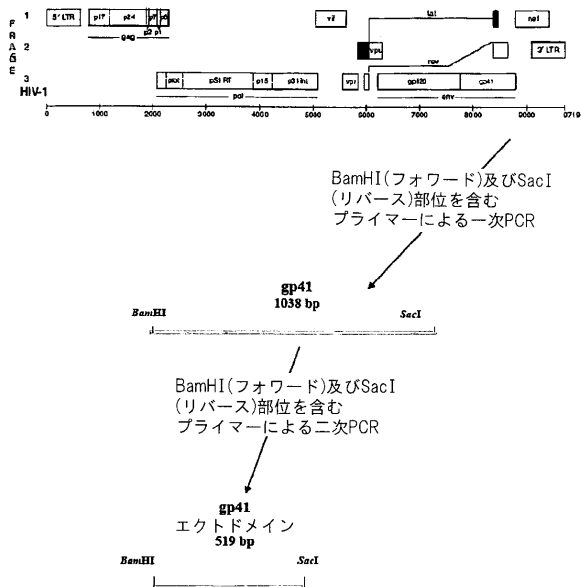


【図 1 1 A】

図11a-b：下記をコードしているHIV envペプチドDNA断片のPCR増幅：
a)全gp120、gp120内側及び外部ドメイン、並びにV2、V3及びV4ループ



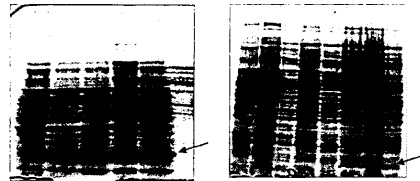
【図 1 1 B】



【図 1 2】

図12：様々な発現システムにおけるHIV envペプチド及びそれらの断片の生成：

a)誘導性発現のgp120内部ドメイン、gp41エクトドメイン、SD-PAGE

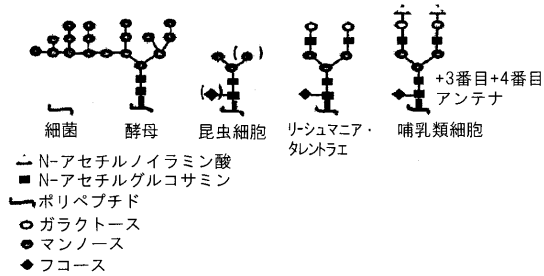


b)永久発現のgp120、gp41、SDS-PAGE及びECLウェスタンブロット検出



【図 1 3】

図13：他のタンパク質発現システムにおけるグリコシル化と比較した、リーシュマニア・タレントラエ細胞(LEXSY発現システム)におけるタンパク質のN-グリコシル化のスキーム。レター(Jena Bioscience社)において、哺乳類細胞及びリーシュマニア・タレントラエにおいて得られたグリコシル化パターンは、糖鎖末端のN-アセチルノイラミン酸の存在のみ異なる；



【図 1 4】

図14：1kbスタッファー断片を置換する標的遺伝子のクローニング部位を持つ、pLEXSY I-2ベクターファミリーのマップ。5' odc及び3' odcは、発現プラスミドのSwaIによる線状化後の、宿主染色体への相同組換え領域である。Lタレントラエaprtの0.4k-IR由来のutr1、1.4k-IR camCB由来のutr2、及び1.7k-IR由来のutr3は、最適化された遺伝子-フランキング非翻訳領域であり、これは、LEXSY宿主T7-TRにおける標的遺伝子及びマーカー遺伝子の発現のための転写後mRNAプロセスのためのスプライシングシグナルを提供する。SPIは、Lメキシカナ分泌された酸性ホスファターゼLMSAP1(7)のシグナルペプチドを、及びH6はヘキサヒスチジンストレッチを意味する。代替りのクローニング戦略は、標的タンパク質のサイトソル型(c)又は分泌型(s)発現を生じる。サイトソル型発現の5'挿入部位は、BglII、NcoI、又はSalIであり、かつ分泌型発現については、SalI又はXbaIである。このスタッファー断片の3'末端で、NheI、MspCI、又はKpnIの制限部位は、C-末端His6ストレッチへの融合を生じるのに対し、NotIクローニング部位の利用は、このHis6ストレッチを無効にする。マーカーとして、ble(プレオマイシン耐性)遺伝子及びneo(アミノグリコシドリン酸転移酵素)遺伝子が利用可能である(Jena Bioscience社)；

5' odc 3' odc

utr1 utr2 utr3

SP1

H6

ble

neo

NotI

MspCI

KpnI

NheI

SalI

XbaI

BglII

NcoI

SalI

T7Po

ori

E.c.

5' odc

utr1

SP1

stuffer

H6

utr2

marker

utr3

BamHI

SpeI

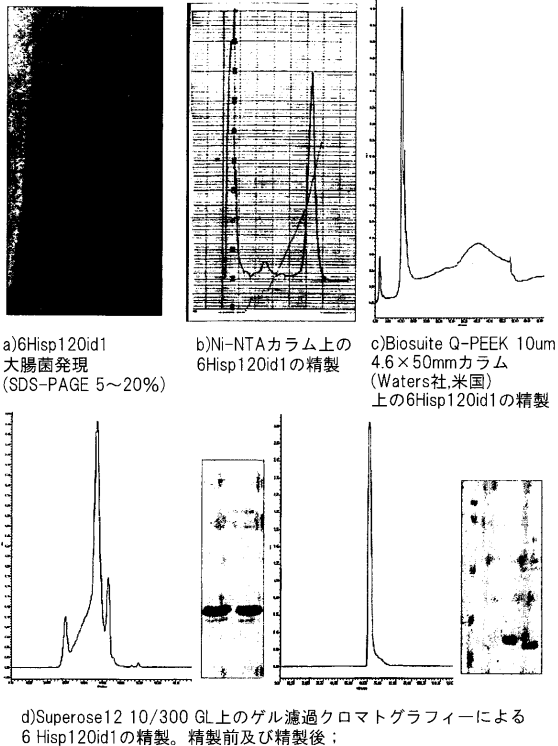
Swal

8.5 kbp

pLEXSY I-2

【図 1 5】

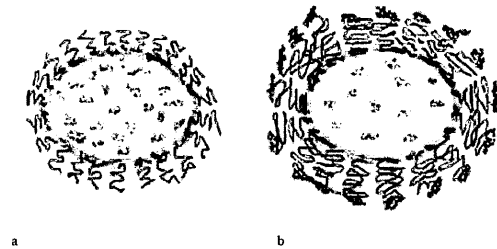
図15a-d：HIV env組換えペプチドのクロマトグラフィー精製の工程：



【図 1 6】

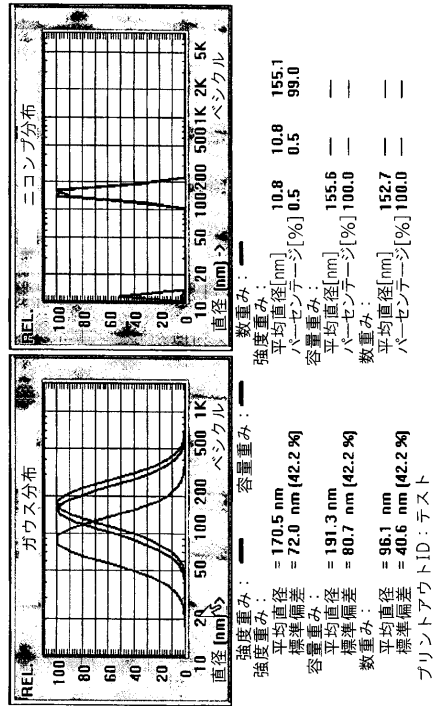
図16a-b：HIV env組換えペプチド免疫ブーストのためのリボソームアジュバントの種類：

- c) ベシクルの水相の内側に装荷された組換えHIV envペプチドを伴う、立体的に安定したリボソーム150nm、PEG-400の概略図
- d) PEG活性化された遠位端に結合された組換えHIV envペプチドを伴う、立体的に安定化されたリボソーム200nm、PEG-2000の概略図；



【 図 1 7 】

図17：SSLワーク成分のガウス及びニコソンプサイズ分布：ベシクルの平均直径は、155nmである



【 配 列 表 】

2010540674000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/008544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/10 A61K39/21		
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) C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPQ-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG X. ET AL.: "Construction of human combinatorial antibody library and screening of monoclonal antibody Fabs to human immunodeficiency virus type I." CHINESE SCIENCE BUL., vol. 44, no. 4, February 1999 (1999-02), pages 352-356, XP002515243 the whole document ----- -/--	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 February 2009		Date of mailing of the international search report 20. 03. 2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Galli, Ivo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/008544

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ZHANG M-Y ET AL: "Broadly cross-reactive HIV neutralizing human monoclonal antibody Fab selected by sequential antigen panning of a phage display library"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 283, no. 1-2, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 17-25, XP004476975</p> <p>ISSN: 0022-1759</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
X	<p>ZHANG ET AL: "Selection of a novel gp41-specific HIV-1 neutralizing human antibody by competitive antigen panning"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 317, no. 1-2, 28 November 2006 (2006-11-28), pages 21-30, XP005782716</p> <p>ISSN: 0022-1759</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
X	<p>CHOUDHRY ET AL: "Cross-reactive HIV-1 neutralizing monoclonal antibodies selected by screening of an immune human phage library against an envelope glycoprotein (gp140) isolated from a patient (R2) with broadly HIV-1 neutralizing antibodies"</p> <p>VIROLOGY, ACADEMIC PRESS,ORLANDO, US, vol. 363, no. 1, 5 May 2007 (2007-05-05), pages 79-90, XP022065040</p> <p>ISSN: 0042-6822</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/008544**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.: 15-18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 18 is directed to a method of treatment of the human/animal body. Such claims can only be searched by reference to the alleged effects of the compound/composition.
--
2. ☒ Claims Nos.: 15-18
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2008/ 008544

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claim 18 is directed to a method of treatment of the human/animal body. Such claims can only be searched by reference to the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 15-18

--

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 15-18

Claims 15-18 relate to compounds defined only by their desired function, contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly. Claims 15-18 have been excluded from the search.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

フロントページの続き

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

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 フィリノファ, エレナ ユ.

ロシア連邦, 1 0 3 0 4 5 モスコー, スレテンカ 2 6 / 1, アパートメント 1 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA35 BA51 CA01 CA11 DA06 EA03 EA04 GA11 HA03

4C085 AA03 BA69 CC08 DD62 EE06