



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I861023 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：108138840

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 28 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/10 (2006.01)*  
*C12N15/13 (2006.01)* *C12N15/63 (2006.01)*  
*A01K67/033 (2006.01)* *A61P31/18 (2006.01)*

(30)優先權：2018/10/29 日本 2018-203114  
 2019/09/12 日本 2019-166040

(71)申請人：日商免疫生物研究所股份有限公司(日本) IMMUNO-BIOLOGICAL  
 LABORATORIES CO., LTD. (JP)

日本

國立大學法人熊本大學(日本) NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION  
 KUMAMOTO UNIVERSITY (JP)

日本

日商丘阿德股份有限公司(日本) CURED INC. (JP)

日本

國立研究開發法人醫藥基盤 健康 營養研究所(日本) NATIONAL INSTITUTES  
 OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION (JP)

日本

(72)發明人：富田正浩 TOMITA, MASAHIRO (JP)；清水衛 SHIMIZU, MAMORU (JP)；松下修  
 三 MATSUSHITA, SHUZO (JP)；桑田岳夫 KUWATA, TAKEO (JP)；道下真弘  
 MICHISHITA, MASAHIRO (JP)；保富康宏 YASUTOMI, YASUHIRO (JP)；岡村  
 智崇 OKAMURA, TOMOTAKA (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

網路文獻，株式会社免疫生物研究所，株式会社CUREDとの共同開発契約締結のお  
 知らせ，株式会社免疫生物研究所，平成30(2018)年3月16日。 [https://www.ibl-japan.co.jp/direct/topics/topics\\_pdf\\_download/topics\\_id=4947&di](https://www.ibl-japan.co.jp/direct/topics/topics_pdf_download/topics_id=4947&di)

審查人員：葉士緯

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：6 共 64 頁

(54)名稱

抗 HIV 抗體及其製造方法

(57)摘要

本發明者等人對以高機率對投予群藉由單次或數次單獨投予而長期控制 HIV 病毒之抗體進行了  
 銳意研究，其結果驚奇地發現，藉由少次單獨投予由使蠶中生產報告為 1C10 之抗體基因所獲得之  
 SW-1C10 抗體，而於被投予之全部個體中，不僅血中病毒於早期被抑制於檢測界限以下，而且血  
 中病毒 RNA 持續 12 週長期維持於檢測界限以下。進而，迄今為止，關於利用蠶之抗體之生產  
 量，每 1 個繭為數百  $\mu\text{g}$ ，每 1 mg 繭為數  $\mu\text{g}$  左右，未進行進一步提高生產性之研究。本發明者等

人為了自多種抗 HIV 抗體中發現於絹絲蟲中之生產量高之抗體而反覆進行研究，結果發現，以優於先前生產量之量於絹絲蟲之絲中生產出作為抗 HIV 抗體之 1C10 抗體及 1D9 抗體。



## 公告本

I861023

## 【發明摘要】

## 【中文發明名稱】

抗HIV抗體及其製造方法

## 【中文】

本發明者等人對以高機率對投予群藉由單次或數次單獨投予而長期控制HIV病毒之抗體進行了銳意研究，其結果驚奇地發現，藉由少次單獨投予由使蠶中生產報告為1C10之抗體基因所獲得之SW-1C10抗體，而於被投予之全部個體中，不僅血中病毒於早期被抑制於檢測界限以下，而且血中病毒RNA持續12週長期維持於檢測界限以下。進而，迄今為止，關於利用蠶之抗體之生產量，每1個繭為數百 $\mu\text{g}$ ，每1 mg繭為數 $\mu\text{g}$ 左右，未進行進一步提高生產性之研究。本發明者等人為了自多種抗HIV抗體中發現於絹絲蟲中之生產量高之抗體而反覆進行研究，結果發現，以優於先前生產量之量於絹絲蟲之絲中生產出作為抗HIV抗體之1C10抗體及1D9抗體。

## 【指定代表圖】

無

## 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

抗HIV抗體及其製造方法

### 【技術領域】

#### 【0001】

本發明係關於一種高效率之抗HIV(Human Immunodeficiency Virus，人類免疫缺陷病毒)抗體之製造方法。更具體而言，本發明係關於一種利用蠶之高效率製造抗HIV抗體之方法。

### 【先前技術】

#### 【0002】

曾有嘗試藉由於蠶之絲膠蛋白啟動子之下游配置抗體基因，使抗體分子於繭中表現，而利用蠶製造治療用抗體(非專利文獻1及2等)。尤其是已知由於在蠶繭中表現之抗體於糖鏈中不含核心岩藻糖，故而顯示優異之ADCC(Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity，抗體依賴性細胞介導之細胞毒作用)活性(專利文獻1及2)。

#### 【0003】

又，於HIV治療戰略中，期待藉由單次或數次之抗體投予後能夠長期控制HIV之抗體。例如，於非專利文獻3中，報告有單次投予PGT121之4隻恆河獼猴中，1隻恆河獼猴之病毒RNA(Ribonucleic Acid，核糖核酸)於約70天內被抑制於檢測界限以下。

#### 【0004】

又，開發了識別HIV之包膜蛋白gp120之V3環的人類化抗體KD247，亦實施了臨床試驗。於投予3次KD247之患者中，確認到病毒之

抑制，但未將病毒長期抑制於檢測界限以下。如此，仍未開發出可藉由以單劑進行單次至數次投予而以較高之機率長期將病毒抑制於檢測界限以下之抗體。

### 【0005】

因此，進行具有與KD247相同之抗原識別部位之人類抗體1C10抗體之開發。1C10抗體係自體內具有能夠對廣泛之HIV株進行中和之抗體，即便25年以上長期未進行治療亦抑制症狀的患者單離之抗體，期待藉由將其作為抗體醫藥品向HIV感染患者投予而發揮較高之治療效果(專利文獻2及非專利文獻4)。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

### 【0006】

[專利文獻1]日本專利特開2014-12024號

[專利文獻2]國際公開WO2009/066702號

[非專利文獻]

### 【0007】

[非專利文獻1]Masashi Iizuka, et al., FEBS Journal; 276: 5806 - 5820 (2009)

[非專利文獻2]Minoru Toda, et al., mABs; 7(6): 1138 - 1150 (2015)

[非專利文獻3]Dan H. Barouch, et al., Nature; 503 (7475): 224 - 228 (2013)

[非專利文獻4]Kristel Paola Ramirez Valdez, et al., Virology; 475: 187 - 203 (2015)

**【發明內容】****【0008】**

本發明者等人對以高機率對投予群藉由單次或數次單獨投予而長期控制HIV病毒之抗體進行了銳意研究，其結果驚奇地發現，藉由少次單獨投予由使蠶中生產報告為1C10之抗體基因所獲得之SW-1C10抗體，而於被投予之所有個體中，不僅血中病毒於早期被抑制於檢測界限以下，而且血中病毒RNA持續12週長期維持於檢測界限以下。進而，於蠶中生產之抗體與於CHO(Chinese Hamster Ovary，中國倉鼠卵巢)細胞中生產之抗體相比，確認到其結構差異在於糖鏈結構。由此，本發明者等人發現，缺漏岩藻糖給1C10抗體帶來於投予全例中長期抑制病毒之極其優異之效果。過去未報告此種於投予全例中能夠長期控制病毒增殖之情況，本發明者等人首次成功發現藉由少次之單獨投予而廣泛且穩定地對投予對象抑制病毒之抗體。

**【0009】**

進而，迄今為止，關於藉由蠶之抗體生產量，每1個繭為數百 $\mu\text{g}$ ，每1 mg繭為數 $\mu\text{g}$ 左右，並未進行進一步提高生產性之研究。本發明者等人為了於多種抗HIV抗體中發現於絹絲蟲中之生產量更高之抗體而反覆進行研究，結果發現於絹絲蟲之絲中以優於先前之生產量之量生產出作為抗HIV抗體之1C10抗體及1D9抗體，從而完成了本發明。

**【0010】**

因此，於一態樣中，本發明係關於一種抗體，其具有對HIV之結合能力；且與該抗體結合之糖鏈不含岩藻糖；且該抗體具有藉由對HIV感染者之單次投予或數次投予而以90%以上之機率將該HIV感染者之血中HIV抑

制於檢測界限以下的作用。調查某抗體是否具有對HIV之結合能力之方法於本技術領域中廣為人知。例如，可藉由使該抗體與固相化有HIV之載體接觸，檢測與該固相結合之抗體而進行確認。

#### 【0011】

於一態樣中，本發明係關於一種抗體，其係IgG抗體，具有：包含序列編號7所記載之胺基酸序列、與其具有80%以上同一性之胺基酸序列、或者該胺基酸序列中置換、缺失、附加、及/或插入數個胺基酸而成之胺基酸序列的重鏈，以及包含序列編號9所記載之胺基酸序列、與其具有80%以上同一性之胺基酸序列、或者該胺基酸序列中置換、缺失、附加、及/或插入數個胺基酸而成之胺基酸序列的輕鏈；具有對HIV之結合能力；且與該抗體結合之糖鏈不含岩藻糖。

#### 【0012】

較佳為本發明之抗體之重鏈具有序列編號7所記載之重鏈胺基酸序列中之3個CDR序列，且輕鏈具有序列編號9所記載之胺基酸序列中之3個CDR序列。關於CDR序列之決定方法，可藉由與Kabat等人之編號系統(Kabat, E.等人，U.S. Department of Health and Human Services，(1983)及其後續版)、Chothia等人之編號系統(Chothia及Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901 - 917 (1987))、Honegger等人之編號系統(Honegger, A等人，J. Mol. Biol. 309: 657 - 670 (2001))、接觸(contact)定義法(Mac Callum et al., J Mol Biol, 262 (5): 732 - 745 (1996))、IMGT(International ImMunoGeneTics Information System，國際免疫遺傳學資訊系統)資料庫(<http://www.imgt.org/>)之編號系統、或者已知序列資料庫進行比對而決定。例如，本發明之抗體之CDR序列可為CDRH1：

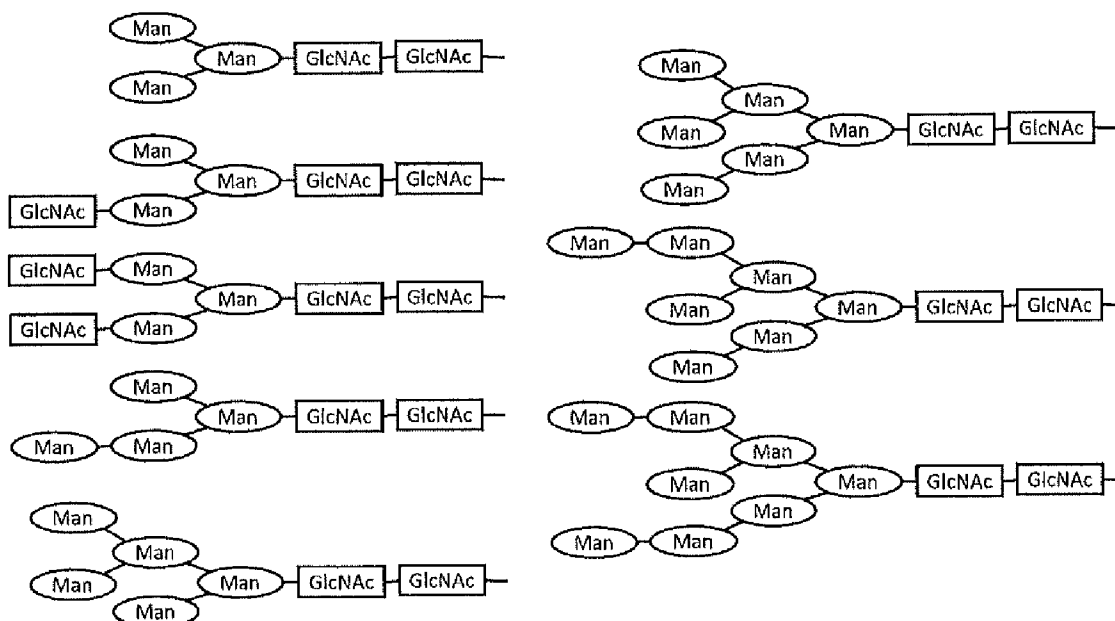
GFMFSNYA(序列編號14)；CDRH2：ISNDGSDK(序列編號15)；  
CDRH3：CARDLDQTIPDLTAPAFEV(序列編號16)及CDRL1：  
QSLHSDGNN(序列編號17)；CDRL2：LTS(序列編號18)；CDRL3：  
MQLQTWT(序列編號19)。更佳為本發明之抗體具有包含序列編號7所  
記載之胺基酸序列之重鏈、以及包含序列編號9所記載之胺基酸序列之輕  
鏈。

### 【0013】

本發明之抗體於結合之糖鏈不含岩藻糖。例如，本發明之抗體可具  
有選自以下之糖鏈結構。

### 【0014】

[化1]



### 【0015】

於一態樣中，本發明係關於一種表現單元，其含有與絲腺特異性基  
因啟動子之下游功能性結合之選自以下(i)~(x)之任一多核苷酸：

(i)具有序列編號6所記載之鹼基序列及/或序列編號8所記載之鹼基序  
列之多核苷酸；

(ii)具有與序列編號6所記載之鹼基序列於嚴格之條件下雜交之鹼基序列、及/或與序列編號8所記載之鹼基序列於嚴格之條件下雜交之鹼基序列的多核苷酸；

(iii)編碼序列編號7所記載之胺基酸序列之多核苷酸、及/或編碼序列編號9所記載之胺基酸序列之多核苷酸；

(iv)編碼與序列編號7所記載之胺基酸序列具有80%以上同一性之胺基酸序列之多核苷酸、及/或編碼與序列編號9所記載之胺基酸序列具有80%以上同一性之胺基酸序列之多核苷酸；

(v)編碼序列編號7所記載之胺基酸序列中置換、缺失、附加、及/或插入數個胺基酸而成之胺基酸序列之多核苷酸、及/或編碼序列編號9所記載之胺基酸序列中置換、缺失、附加、插入數個胺基酸而成之胺基酸序列之多核苷酸；

(vi)具有序列編號10所記載之鹼基序列及/或序列編號12所記載之鹼基序列之多核苷酸；

(vii)具有與序列編號10所記載之鹼基序列於嚴格之條件下雜交之鹼基序列、及/或與序列編號12所記載之鹼基序列於嚴格之條件下雜交之鹼基序列的多核苷酸；

(viii)編碼序列編號11所記載之胺基酸序列之多核苷酸、及/或編碼序列編號13所記載之胺基酸序列之多核苷酸；

(ix)編碼與序列編號11所記載之胺基酸序列具有80%以上同一性之胺基酸序列之多核苷酸、及/或編碼與序列編號13所記載之胺基酸序列具有80%以上同一性之胺基酸序列之多核苷酸；以及

(x)編碼序列編號11所記載之胺基酸序列中置換、缺失、附加、插入

數個胺基酸而成之胺基酸序列之多核苷酸、及/或編碼序列編號13所記載之胺基酸序列中置換、缺失、附加、及/或插入數個胺基酸而成之胺基酸序列之多核苷酸。

### 【0016】

於本說明書中，1C10抗體係具有包含序列編號7所記載之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號9所記載之胺基酸序列之輕鏈的抗體。再者，序列編號7所記載之胺基酸序列中，第1至第19號為訊息序列。本說明書中記載之抗體之重鏈、及/或輕鏈亦可不含本說明書中記載之訊息序列。或者，亦可包含本說明書中記載之訊息序列以外之訊息序列。因此，於本說明書中，「包含序列編號7所記載之胺基酸序列之重鏈」之表述可適當改成「包含序列編號7之第20至第474號胺基酸序列之重鏈」。同樣地，序列編號9所記載之胺基酸序列中，第1至第20號為訊息序列。因此，於本說明書中，「包含序列編號9所記載之胺基酸序列之輕鏈」之表述可適當改成「包含序列編號9之第21至第238號胺基酸序列之輕鏈」。又，於本說明書中，1D9抗體係具有包含序列編號11所記載之胺基酸序列之重鏈、及包含序列編號13所記載之胺基酸序列之輕鏈的抗體。再者，序列編號11所記載之胺基酸序列中，自第1至第19號為訊息序列。因此，於本說明書中，「包含序列編號11所記載之胺基酸序列之重鏈」之表述可適當改成「包含序列編號11之第20至第472號胺基酸序列之重鏈」。同樣地，序列編號13所記載之胺基酸序列中，第1至第20號為訊息序列。因此，於本說明書中，「包含序列編號13所記載之胺基酸序列之輕鏈」之表述可適當改成「包含序列編號9之第21至第238號胺基酸序列之輕鏈」。

### 【0017】

作為編碼1C10抗體之DNA(Deoxyribonucleic Acid, 去氧核糖核酸)序列, 例如可列舉序列編號6所記載之鹼基序列(重鏈)及序列編號8所記載之鹼基序列(輕鏈)。如上所述, 序列編號6所記載之鹼基序列(重鏈)中, 57個鹼基編碼訊息序列。因此, 於本說明書中, 「序列編號6所記載之鹼基序列」之表述可適當改成「序列編號6所記載之鹼基序列中, 自第58至第1425號鹼基序列」。同樣地, 序列編號8所記載之鹼基序列(輕鏈)中, 60個鹼基編碼訊息序列。因此, 於本說明書中, 「序列編號8所記載之鹼基序列」之表述可適當改成「序列編號8所記載之鹼基序列中, 自第61至第717號之鹼基序列」。又, 作為編碼1D9抗體之DNA序列, 例如可列舉序列編號10所記載之鹼基序列(重鏈)及序列編號12所記載之鹼基序列(輕鏈)。如上所述, 序列編號10所記載之鹼基序列(重鏈)中, 57個鹼基編碼訊息序列。因此, 於本說明書中, 「序列編號10所記載之鹼基序列」之表述可適當改成「序列編號10所記載之鹼基序列中, 自第58至第1419號鹼基序列」。同樣地, 序列編號12所記載之鹼基序列(輕鏈)中, 60個鹼基編碼訊息序列。因此, 於本說明書中, 「序列編號12所記載之鹼基序列」之表述可適當改成「序列編號12所記載之鹼基序列中, 自第61至第717號鹼基序列」。

### 【0018】

於本說明書中, 「於嚴格之條件下雜交」意指於業者通常使用之雜交條件下雜交。例如, 可藉由Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2012)或Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Online Library等中記載之方法決定是否雜交。例如, 雜交之條件可為於6×SSC(0.9M NaCl、0.09M 檸檬

酸三鈉)或6×SSPE(3M NaCl、0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、20mM EDTA(ethylene diamine tetracetic acid, 乙二胺四乙酸)-2Na, pH值7.4)中於42°C下雜交, 其後於42°C下藉由0.5×SSC洗淨。

### 【0019】

於一態樣中, 本發明係關於一種多核苷酸, 其編碼與序列編號7所記載之胺基酸序列及序列編號9所記載之胺基酸序列、或序列編號11所記載之胺基酸序列及序列編號13所記載之胺基酸序列(於本段落中, 稱為「序列編號7所記載之胺基酸序列等」)各者具有80%以上同一性之胺基酸序列。胺基酸序列之同一性意指於2種蛋白質間, 作為比較對象之胺基酸序列範圍中之種類為同一胺基酸數之比率(%), 例如可使用BLAST、FASTA等公知之程式確定。作為上述同一性, 可為高於80%以上之同一性, 例如可為85%以上、90%以上、95%以上、98%以上或99%以上之同一性。或者, 本發明之多核苷酸可為編碼與序列編號7所記載之胺基酸序列等在Blast中之相同性得分中顯示200以上之胺基酸序列者。相同性得分可比對序列編號7等所記載之胺基酸序列與目標蛋白質之胺基酸序列, 自得分矩陣求出作為比較對象之各胺基酸之分數, 計算其總和(參照<http://www.gsic.titech.ac.jp/supercon/supercon2004-e/alignmentE.html>)。例如, 相同性得分可使用公知之BLAST程式確定。作為得分矩陣, 已知BLOSUM62或PAM32等, 於本說明書中較佳為BLOSUM62。

### 【0020】

置換、缺失、附加、及/或插入之胺基酸之數只要為不對上述抗體之生物學活性產生影響之數則並無特別限定, 例如可設為1~10個、1~5個、1

~4個或1~3個。胺基酸之置換較佳為保守性胺基酸彼此之置換(參照 *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science ; 第6版)。

### 【0021】

「絲腺特異性基因啟動子」係於絹絲蟲之絲腺中特異性表現之基因之啟動子。作為此種啟動子，可列舉：絲蛋白質基因啟動子、例如後部絲腺特異性基因啟動子及中部絲腺特異性基因啟動子等，例如絲膠蛋白基因啟動子(絲膠蛋白1基因啟動子、絲膠蛋白2基因啟動子及絲膠蛋白3基因啟動子)或絲蛋白基因啟動子(絲蛋白重鏈基因啟動子、絲蛋白輕鏈基因啟動子及纖維六聚素(Fibrohexamerin)啟動子)。較佳為包含絲膠蛋白1基因啟動子、絲膠蛋白2基因啟動子及絲膠蛋白3基因啟動子、MSG啟動子及PSG啟動子(WO2017135452A1)。與啟動子之下游功能性地結合係指以結合之基因能夠藉由啟動子之活化而表現之方式進行結合。

### 【0022】

於另一態樣中，本發明係關於一種含有上述表現單元之質體載體。質體載體只要為可導入至絹絲蟲細胞並維持之載體則並無特別限制。例如，可列舉結合來自粉紋夜蛾(*Trichoplusia ni*)之DNA型轉位子piggyBac之質體載體(Tamura, T等人，*Nature Biotechnology*, 18: 81 - 84(2000))。例如，作為載體，可列舉pPIGA3GFP(Tamura, T等人，*Nature Biotechnology*, 18: 81 - 84(2000))或pBac [3xP3-DsRed/pA](*Nature Biotechnology*, 21: 52 - 56(2003))。又，本發明之載體例如亦可藉由於利用美國專利公開公報2008/0301823中記載之方法製作之載體(pMSG1.1MG)之限制酵素切割部位插入上述表現單元而製作。或者，例如載體可為絹絲蟲轉形用載體pMSG3.1MG(日本專利特開2012-

182995)。

### 【0023】

於某一態樣中，本發明係關於一種於染色體中結合有上述表現單元之基因轉殖絹絲蟲。於本說明書中「絹絲蟲」只要為具有絲腺，可吐出絲之昆蟲則並無特別限制，於鱗翅目昆蟲、膜翅目昆蟲、脈翅目昆蟲、毛翅目昆蟲等中，主要係於幼蟲期為了營巢、營繭或移動而吐絲之種類。作為絹絲蟲，較佳為可吐出大量絲之鱗翅目昆蟲，可列舉屬於蠶蛾科、天蠶蛾科、水蠟蛾科、帶蛾科、枯葉蛾科、蓑蛾科、燈蛾科或夜蛾科等之種類。又，絹絲蟲包含蠶、野桑蠶、樗蠶、蓖麻蠶、天蠶蛾、柞蠶、合目天蠶蛾 (*Caligula boisduvali*)、大水青蛾等。本發明之基因轉殖絹絲蟲於絲(繭)(較佳為絲膠蛋白層)中產生(分泌)上述抗體。

### 【0024】

於另一態樣中，本發明係關於一種藉由上述基因轉殖絹絲蟲產生之抗體。該抗體可為包含具有序列編號7所記載之胺基酸序列之重鏈、及/或具有序列編號9所記載之胺基酸序列之輕鏈的抗體，或者亦可包含具有序列編號11所記載之胺基酸序列之重鏈、及/或具有序列編號13所記載之胺基酸序列之輕鏈。或者，該抗體亦可包含具有與序列編號7及/或序列編號9、或者序列編號11及/或序列編號13各者具有80%以上同一性之胺基酸序列之各重鏈及/或輕鏈。或者，本發明之抗體亦可包含具有與序列編號7及/或序列編號9、或者序列編號11及/或序列編號13各者在Blast中之相同性得分顯示200以上之胺基酸序列之各重鏈及/或輕鏈。或者，本發明之抗體亦可具有包含序列編號7及/或序列編號9、或者序列編號11及/或序列編號13各者中置換、缺失、附加、及/或插入數個胺基酸而成之胺基酸序列之

各重鏈及輕鏈。又，於本說明書中，「抗體」之用語只要包含Fc(Fragment crystallizable，可結晶片段)及抗原結合部位即可，可為抗體之一部分或片段或改型體，例如可為單鏈抗體(例如重鏈抗體)或雙特異性抗體。

### 【0025】

已知於蠶繭中產生之抗體於糖鏈中未結合岩藻糖。又，本技術領域中廣泛知曉未附加岩藻糖之抗體之ADCC活性優異。關於ADCC活性與利用抗體投予之病毒抑制迄今為止無報告，但本發明之此種效果存在由ADCC活性帶來之可能性。因此，於一態樣中，本發明可包含一種抗HIV抗體組合物，其特徵在於包含如下IgG抗體，該IgG抗體具有包含序列編號7所記載之胺基酸序列、與其具有80%以上同一性之胺基酸序列、或者該胺基酸序列中置換、缺失、附加、及/或插入數個胺基酸而成之胺基酸序列的重鏈，以及包含序列編號9所記載之胺基酸序列、與其具有80%以上同一性之胺基酸序列、或者該胺基酸序列中置換、缺失、附加、及/或插入數個胺基酸而成之胺基酸序列的輕鏈；具有對HIV之結合能力，且為了提高ADCC活性而修飾了Fc區；該抗HIV抗體組合物之ADCC活性高於在CHO細胞中產生之野生型抗體；該抗HIV抗體組合物具有藉由對HIV感染者之單次投予或數次投予而以90%以上之機率將該HIV感染者之血中HIV抑制於檢測界限以下的作用。

### 【0026】

又，顯示Fc與FcγR之關係對ADCC活性產生影響，亦報告藉由Fc區之胺基酸置換可提高與FcγR之親和性。已知尤其是與FcγRIIIa等活性型FcγR之結合較高，與FcγRIIb等抑制型FcγR之結合弱之Fc之效應子功能優異。作為此種變異，報告有F158V、A330L、S239D及I332E(Greg

ALazar等人，PNAS (2006) 103 (11): 4005 - 4010)或F243L、D270E、R292P、S298N、Y300L、V305I、A330V及P396L(Cancer Res (2007) 67 (18): 8882 - 8890)。本發明之抗體之Fc區可具有此種變異，例如可具有選自A330L、S239D、I332E、F243L、D270E、R292P、S298N、Y300L、V305I、A330V及P396L中之1~10個變異。

### 【0027】

於另一態樣中，本發明係關於一種包含IgG抗體之組合物，該IgG抗體具有對HIV之結合能力，且該IgG抗體之80%以上為於抗體結合糖鏈中不含岩藻糖之抗體。即，於本發明之組合物中，無需於所有之(100%之)抗HIV抗體中不含岩藻糖，至少於80%以上(較佳為85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上)之抗HIV抗體中不含岩藻糖即可。較佳為該組合物具有藉由對HIV感染者之單次投予或數次投予而以90%以上之機率將該HIV感染者之血中HIV抑制於檢測界限以下的作用。該組合物具有之抗HIV抗體所具有之序列等之特徵與上述本發明之抗HIV抗體相同。

### 【0028】

於本說明書中，是否「具有藉由對HIV感染者之單次投予或數次投予而以90%以上(較佳為92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上或100%)之機率將該HIV感染者之血中HIV抑制於檢測界限以下的作用」可藉由依據常法、例如利用PCR(Polymerase Chain Reaction，聚合酶鏈反應)之方法，檢測向複數個HIV感染者投予受檢抗體後之血中HIV而進行確認。於投予了受檢抗體之HIV患者之90%以上未檢測出血中HIV之情形時，可判定具有藉由對HIV

感染者之單次投予或數次投予而以90%以上之機率將該HIV感染者之血中HIV抑制於檢測界限以下的作用。是否將血中HIV抑制於檢測界限以下之判定時期理想為於抗體之投予全部結束後，較佳可設為投予完成後12週、16週、20週、24週、28週、32週、36週、40週、1年、2年、3年、4年或5年之時點。

### 【0029】

於進而另一態樣中，本發明係關於一種含有上述抗體作為有效成分之HIV感染症之治療藥或預防藥(醫藥組合物)。本發明之醫藥組合物只要為可向患者投予之製劑即可，可採用經口或非經口之任何製劑。作為用以非經口投予之組合物，例如可列舉：注射劑、滴鼻劑、栓劑、貼布劑、軟膏等。較佳為注射劑。本發明之醫藥組合物之劑型例如可列舉液劑或冷凍乾燥製劑。於將本發明之醫藥組合物作為注射劑使用之情形時，可視需要加入丙二醇、乙二胺等溶解助劑，磷酸鹽等緩衝材，氯化鈉、甘油等等張劑，亞硫酸鹽等穩定劑，苯酚等保存劑，利多卡因等鎮痛劑等添加物(參照「醫藥品添加物事典」藥事日報社、「Handbook of Pharmaceutical Excipients Fifth Edition」APhA Publications公司)。又，於將本發明之醫藥組合物作為注射劑使用之情形時，作為保存容器，可列舉：安瓿、小瓶、預填充式注射器、筆式注射器用筒及點滴用袋等。

[發明之效果]

### 【0030】

本發明之抗體可利用蠶而高效率地進行生產，因此可提供生產成本更低廉之HIV感染症治療用抗體。

### 【圖式簡單說明】

## 【0031】

圖1係利用SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, 十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳)後之CBB(Coomassie Brilliant Blue, 庫馬斯亮藍)染色將基因轉殖蠶之表現量進行比較之照片。A: 全部提取液; B: 中性緩衝液提取液。照片左側之數值表示分子量(kDa), 照片之上部表示使用之抗體之種類。

圖2係表示測定藉由基因轉殖蠶生產之各抗體對HIV-1 BaL株之結合活性所得之結果之圖。縱軸表示平均螢光強度(MFI), 橫軸表示抗體濃度( $\mu\text{g/mL}$ )。

圖3係表示測定來源不同之各抗體對HIV-1 BaL株之中和活性所得之結果之圖。縱軸表示抑制比率(抑制%), 橫軸表示抗體之Log濃度( $\mu\text{g/mL}$ )。下方之表表示各抗體之各濃度下之抑制比率(抑制%)。

圖4表示自質譜推定蠶繭中表現之抗體與CHO細胞中產生之抗體之糖鏈結構所得之結果。示出主要糖鏈結構及其存在比率。

圖5係表示測定以0.2、2、20  $\mu\text{g/mL}$ 向HIV-1 BaL株添加SW-1C10、293A-1C10、CHO-1C10及KD-247時之ADCC活性所得之結果之圖(A)及表(B)。關於ADCC活性, SW-1C10最高, 其次為CHO-1C10。

圖6係表示為了評估急性感染期中之SW-1C10之效力, 向接種了強毒性SHIV(Simian-Human Immunodeficiency Virus, 人猴嵌合免疫缺陷病毒)89.6P(Reimann K. A. et al., J. Virol. 70, 6922 - 6928.)之食蟹獼猴投予SW-1C10所得之結果之圖。左圖表示SW-1C10投予群(n=3), 右圖表示無處理群(n=2)。上圖之縱軸表示血漿1 ml中之病毒RNA複製數( $\log_{10}$  copies/mL), 下圖之縱軸表示CD4+T細胞數(count/ $\mu\text{L}$ )。使全身感染成

立。全部圖之橫軸表示病毒感染後之經過期間(週)。於病毒接種後第3天、第10天、第17天經由靜脈進行SW-1C10之投予。

### 【實施方式】

#### 【0032】

##### 1. 抗體

於一態樣中，本發明包含：包括使蠶中表現本發明之抗體基因的本發明之抗體之製造方法、及藉由該方法製造之抗體。本發明之製造方法具體而言可藉由以下記載之方法實施。

#### 【0033】

(表現單元之製作)

本發明之包含與在蠶之絲腺細胞中引起基因表現之啟動子區域功能性連結之抗體基因的表現單元可藉由業者周知之基因重組技術使編碼在蠶之絲腺細胞中引起基因表現之啟動子區域之多核苷酸與選自上述(i)~(x)之任一多核苷酸結合而製作。在蠶之絲腺細胞中引起基因表現之啟動子區域之多核苷酸例如可藉由將自蠶細胞提取之基因組DNA作為模板，使用對應於目標啟動子之啟動子進行PCR而獲得。例如，絲膠蛋白1基因啟動子之獲取方法記載於美國專利公開公報2008/0301823中。

#### 【0034】

於本發明之表現單元包含增強子、絲蛋白重鏈基因之-1860~-1127之區域及/或-5000~-3848之區域、編碼桿狀病毒同源區(homologous region)之多核苷酸、構成桿狀病毒多角體蛋白之5'非轉譯區之多核苷酸、及/或編碼桿狀病毒IE1之多核苷酸等之情形時，可藉由利用業者周知之方法(例如藉由利用限制酵素切割部位)使該等多核苷酸以及與在蠶之絲腺細

胞中引起基因表現之啟動子區域功能性連結之抗體基因結合而獲得。例如，本發明之表現單元可依據日本專利特開2004-344123、美國專利公開公報2008/0301823、日本專利特開2008-125366等中記載之方法製作。

### 【0035】

(載體之製作)

含有上述表現單元之質體載體可藉由向所需之載體結合上述表現單元或其構成成分而獲得。載體只要為能夠製作基因轉殖蠶之質體載體則並無特別限定，例如可藉由向上述載體之限制酵素切割部位插入上述表現單元而製作。

### 【0036】

(基因轉殖蠶之製作)

於一態樣中，本發明係關於一種於絲(繭)(較佳為絲膠蛋白層)中產生(分泌)上述抗體之基因轉殖蠶之製造方法，其包括將上述質體載體插入至絹絲蟲之卵。具體而言，本發明之基因轉殖蠶之製造方法包括將上述質體載體注入至產卵後2~8小時之蠶卵(蠶胚)，使孵化之蠶之成蟲交配獲得G1卵塊，以標記基因之表現等為指標篩選結合有本發明之表現單元之基因轉殖蠶。

### 【0037】

作為一例，可使獲得之質體載體純化後，與輔助質體pHA3PIG(Nat. Biotechnol. 18, 81 - 84(2000))以質體量成為1:1之方式進行混合，進而進行乙醇沈澱，其後，以DNA濃度成為10~1000 µg/ml之方式溶解於注射緩衝液(0.5mM磷酸緩衝液pH值7.0、5mM KCl)。將該載體混合液向產卵後2~8小時之前胚盤葉期之蠶卵(蠶胚)以每一個卵約1~200 nl之液量進行微

量注入。將微量注入有載體DNA之卵於約25°C下進行孵育，飼養孵化之蠶，使獲得之能夠生殖之成蟲交配，獲得G1代之卵塊。於距離產卵日第3~10天之G1卵塊中，選擇白眼或神經系統發出綠色螢光之基因轉殖蠶之卵進行孵化，確立結合有抗體cDNA(complementary DNA，互補DNA)之基因轉殖蠶。

### 【0038】

又，本發明之基因轉殖蠶可導入與本發明之表現單元不同之用以增強上述基因表現之多核苷酸。例如，可向不同於本發明之質體載體之質體載體結合用以增強基因表現之多核苷酸，將其與本發明之質體載體同時或分別注入至蠶卵。或者，亦可使利用上述方法獲得之結合有本發明之表現單元之基因轉殖蠶與結合有用以增強基因表現之多核苷酸之基因轉殖蠶交配，藉此獲得導入有本發明之表現單元以及用以增強上述基因表現之多核苷酸的基因轉殖蠶。例如，亦可使獲得之基因轉殖蠶與表現來自BmNPV(Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus，家蠶核型多角體病毒)之反式激活子ie1基因之蠶(日本專利特開2012-182995)交配，自獲得之G2代蠶篩選具有抗體cDNA與ie1基因兩者之蠶。

### 【0039】

(抗體之製造方法)

於另一態樣中，本發明係關於一種抗體之製造方法，其製造包含具有序列編號7所記載之胺基酸序列之重鏈及具有序列編號9所記載之胺基酸序列之輕鏈的抗體、或者包含具有序列編號11所記載之胺基酸序列之重鏈及具有序列編號13所記載之胺基酸序列之輕鏈的抗體，且包括自上述基因轉殖絹絲蟲產生之絲提取該抗體。

**【0040】**

例如，抗體之製造可藉由如下方式獲得：飼養上述蠶而營繭。使蠶繭浸漬於提取緩衝液(PBS(Phosphate Buffer Saline，磷酸鹽緩衝溶液)(最終濃度0.5M NaCl)、0.1% TritonX-100)，於室溫下攪拌1小時，製備繭提取液。藉由0.45 μm之過濾器對提取液進行過濾，供於蛋白G管柱(ProteinG Sepharose4 Fast Flow，GE healthcare)。藉由0.1M甘胺酸(pH值2.7)進行溶出，向溶液中加入1M Tris-HCl(pH值9.0)進行中和，最後對PBS進行透析。

**【0041】**

又，抗體之片段可藉由業者周知之各種方法進行製備，例如可藉由對利用上述方法所獲得之抗體進行木瓜酶處理而獲得。

**【0042】**

又，關於未結合有岩藻糖之抗體，除利用使上述蠶繭中產生之方法以外，已知有如下方法：使用自經藥劑處理之CHO細胞殺傷具有較高之岩藻糖之細胞所選擇出之顯示岩藻糖基化減少之細胞進行生產(美國專利公開2010/0081150號)；使用藉由F<sub>x</sub>蛋白之突變及控制岩藻糖之外部源之供給力而減少岩藻糖基化之CHO細胞株進行生產(美國專利公開2010/0304436號)；使用具有相當於GMD外顯子5、6及7區域之基因組缺失之GMD剔除細胞及FUT(fucosyltransferase，岩藻糖基轉移酶)8剔除宿主細胞株進行生產(KANDA, Y.等人 (2007) J. BIOTECHNOL; 130(3): 300 - 10)；利用藉由與N-甲基-N-亞硝基胍進行孵育獲得之4種凝集素耐性CHO變異細胞進行製造(RIPKA,J.等人 (1986) SOMAT CELL MOL GENET; 12 (1): 51 - 62)；利用Lec13(岩藻糖缺損CHO)細胞株產生

(SHIELDS, R. L.等人 (2002) J BIOL CHEM; 277 (30): 26733 - 40)；使甲胺喋呤(MTX)處理後CHO細胞之集群與橙黃網孢盤菌(*aleuria aurantia*)凝集素(AAL)或米麴菌(*Aspergillus oryzae*)1-岩藻糖特異性凝集素(AOL)之非毒性岩藻糖結合劑接觸，去除與岩藻糖結合劑結合之細胞，使用所獲得之細胞進行製造(WO2012/120500)；自抗體切斷糖鏈一次後，使未結合岩藻糖之糖鏈與抗體再結合(日本專利特開2016-082962)；以及使用表現乙醯胺基葡萄糖基轉移酶III之細胞進行製造(美國專利6,602,684)。本發明之抗體可藉由該等任一方法或未記載於此處之其他減少岩藻糖結合量之公知之抗體產生方法進行製造。

#### 【0043】

#### 2. 醫藥組合物

本發明之抗體可作為經口投予形態、或注射劑、點滴劑等非經口投予形態之醫藥組合物使用。於向哺乳動物等投予之情形時，醫藥組合物可為錠劑、散劑、顆粒劑、糖漿劑等經口投予形態，或亦可為注射劑、點滴劑等非經口投予形態。

#### 【0044】

本發明之醫藥組合物可使用通常之藥學上容許之載體，藉由常法進行製劑化。於製備經口用固形製劑之情形時，向主藥添加賦形劑、進而視需要添加結合劑、崩解劑、潤滑劑等後，藉由常法製成溶劑、顆粒劑、散劑、膠囊劑等。於製備注射劑之情形時，可向主藥視需要添加pH值調整劑、緩衝劑、穩定劑、助溶劑等，藉由常法製成皮下或靜脈內用注射劑。

#### 【0045】

於另一態樣中，本發明係關於一種HIV感染症之治療方法或預防方

法，其包括向有需要之患者投予有效量之本發明之抗體。或者，本發明係關於一種本發明之抗體之用途，其用於製造HIV感染症之治療藥或預防藥。將本發明之抗體投予至哺乳動物等之情形時之投予量視症狀、年齡、性別、體重、投予形態等而異，例如於向成人進行靜脈內投予之情形時，通常1次量可設為0.1~10000 mg。較佳為可於投予後持續長期(例如，12週以上、16週以上、20週以上、24週以上、28週以上、32週以上、36週以上、40週以上、1年以上、2年以上、3年以上、4年以上或5年以上)將血中HIV維持於檢測界限以下之投予方法。為了確認是否可於投予後將血中HIV維持於檢測界限以下，視需要可於投予期間及投予期間後對血中HIV量(例如HIV RNA量)進行監測。本發明之抗體例如可對感染HIV之患者總計投予1~10次、1~8次、1~5次、1~4次、1~3次、1~2次、1次、2次或3次。投予間隔可設為3~30天、3~15天、4~10天、5~9天、6~8天或7天。

#### 【0046】

以下，為了更詳細地說明本發明而示出實施例，但本發明並不限定於該等。再者，本案說明書整篇中引用之文獻藉由參照而將其整體併入至本說明書中。又，本案主張2018年10月29日提出申請之日本專利申請案第2018-203114號之優先權。本案主張優先權之日本專利申請案第2018-203114號記載之內容全部藉由參照而直接併入至本案。

#### [實施例]

#### 【0047】

##### (1)載體之製作

將結合有1C10抗體之重鏈(序列編號6)及輕鏈(序列編號8)之cDNA之

質體(pMPE-1C10)作為模板，使用包含限制酵素NruI識別序列及BmNPV多角體蛋白之5'非轉譯區序列(日本專利特開2008-125366)之引子(NruI-BmNPV-ATG)、以及包含1C10重鏈5'末端側序列之引子(Hc-F)的混合液作為正向引子，又，使用包含附加有限制酵素NruI及XhoI識別序列之重鏈3'末端側序列之引子(C-hIgG1-NruI-XhoI)作為反向引子進行PCR，藉此，對1C10重鏈之cDNA進行擴增。

#### 【0048】

將經擴增之片段結合至經XhoI處理、且經EcoRV及XhoI處理之選殖載體(pCR-MCS)。同樣地，將結合有1C10輕鏈之cDNA之質體(pKVA2-1C10)作為模板，使用NruI-BmNPV-ATG與包含輕鏈5'末端側序列之引子(LcK-F)之混合液作為正向引子，又，使用包含附加有限制酵素NruI及XhoI識別序列之輕鏈3'末端側序列之引子(LcK-R)作為反向引子進行PCR，藉此，對1C10輕鏈之cDNA進行擴增，將獲得之片段插入至pCR-MCS。

#### 【0049】

(正向引子)

NruI-BmNPV-ATG

5'-

ATCGCGAAAGTATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTTGTAATAAAAAA  
ACCTATAAATATG-3'(序列編號1)

Hc-F

5'-

GTAATAAAAAAACCTATAAATATGGACTGGACCTGGAGGATC-3'(序

列編號2)

LcK-F

5'-

GTAATAAAAAACCTATAAATATGGTGTTCAGACCCAGGTC-3(序

列編號4)

(反向引子)

C-hIgG1-NruI-XhoI

5'-CGCTCGAGTCGCGATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-

3'(序列編號3)

LcK-R

5'-CGCTCGAGTCGCGATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTC-

3'(序列編號5)

#### 【0050】

藉由NruI切斷結合有1C10輕鏈之cDNA之pCR-MCS，切出輕鏈之cDNA，結合至經Aor51HI處理之基因轉殖蠶製作用載體(pMSG3.1MG，日本專利特開2012-182995)。其次，藉由NruI消化該載體，與自結合有1C10重鏈之cDNA之pCR-MCS藉由NruI切出之重鏈cDNA連接。獲得之載體(1C10/pMSG3.1MG)之1C10重鏈及輕鏈之cDNA分別結合至絲膠蛋白1啟動子之下游。

#### 【0051】

藉由同樣之方法，對來自單離出1C10之相同患者之抗HIV人類抗體1D9(重鏈之cDNA序列：序列編號10；輕鏈之cDNA序列：序列編號12)及49G2、以及來自其他HIV患者之人類抗體VRCO1(Science. 329, 856 - 61

(2010))及PGT121(Nature. 477, 466 - 470 (2011))，亦製備將重鏈及輕鏈結合至pMSG3.1MG而成之基因轉殖蠶製作用載體。

### 【0052】

#### (2)基因轉殖蠶之製作

藉由Plasmid Midi Kit(QIAGEN)對1C10/pMSG3.1MG進行純化後，與作為輔助質體之pHA3PIG(Nat. Biotechnol.; 18: 81 - 84 (2000))以質體量成為1：1之方式進行混合，進而進行乙醇沈澱後，以DNA濃度成為200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之方式溶解於注射緩衝液(0.5mM磷酸緩衝液pH值7.0、5mM KCl)。將該載體混合液向產卵後2~8小時之前胚盤葉期之蠶卵(蠶胚)383個以每一個卵約15~20 nL之液量進行微量注入。

### 【0053】

將微量注入有載體DNA之卵於25 $^{\circ}\text{C}$ 下進行孵育，結果85%之卵孵化。飼養該等蠶幼蟲，使生長之成蟲交配，獲得72區(雌成蟲產出之卵塊)之G1代之卵。藉由螢光立體顯微鏡觀察距離產卵日第5~6天之G1卵塊，獲取包含白眼或神經系統發出綠色螢光之基因轉殖蠶之卵之31區之卵塊。使獲得之卵孵化並進行飼養，結果，可確立48隻基因轉殖蠶，因此提取該等之繭蛋白質藉由SDS-PAGE進行分析。又，自成蟲提取基因組DNA進行南方墨點。藉由該等分析，選拔於繭中表現1C10抗體且於基因組中具有1 copy之重組基因之6個系統之基因轉殖蠶。

### 【0054】

使上述基因轉殖蠶與表現來自BmNPV之反式激活子ie1基因之蠶(日本專利特開2012-182995)交配。已知由ie1基因合成之IE1蛋白質作用於pMSG3.1MG中包含之來自BmNPV之hr3增強子或絲膠蛋白1啟動子，增

加中部絲腺中之重組蛋白質之表現量(Biotechnol. Bioeng.; 106: 860 - 870 (2010))。自交配獲得之G2代之蠶篩選具有1C10 cDNA與ie1基因兩者之蠶(以下記為「1C10生產用系統」)，飼養該等蠶，使之營繭。

### 【0055】

同樣地，將結合有與1C10來自相同患者之1D9及49G2、以及來自其他患者之VRCO1及PGT121之cDNA的載體亦向蠶卵進行微量注入而製作基因轉殖蠶。與表現ie1基因之蠶進行交配，製作包含各抗體之繭。

### 【0056】

關於結合有各基因之蠶各1個系統，記載獲得之繭之繭層重量(表1)。1C10、1D9、VRCO1及PGT121營出平均重量之繭，但49G2完全不營繭。

### 【0057】

[表1]

	1C10	1D9	49G2	VRCO1	PGT121
平均繭重量(mg)	65.0	91.1	不營繭	84.7	74.4
自1 mg之繭提取之抗體量( $\mu$ g)	22.7	5.0	-	1.4	2.9
自1個繭提取之抗體量(mg)	1.48	0.46	-	0.12	0.22

### 【0058】

#### (3)表現量之分析

對獲得繭之1C10、1D9、VRCO1及PGT121調查抗體之表現量。藉由將各蠶繭10 mg浸漬於1 mL之8M脲、50mM三羥甲基胺基甲烷鹽緩衝液pH值8.0、0.1M DTT(Dithiothreitol，二硫蘇糖醇)，於80°C下加溫5分鐘，使絲之絲膠蛋白層中包含之蛋白質全部溶解(全部提取)，於還原條件下進行SDS-PAGE後進行CBB染色，比較抗體之表現量。

### 【0059】

將結果示於圖1A。自4種基因重組蠶繭檢測出抗體之重鏈(H鏈)及輕鏈(L鏈)。關於表現量，1C10最高，1D9及PGT121亦為相對較高之表現，與該等相比，VRCO1之表現量較低。

### 【0060】

其次，對抗體對中性緩衝液之提取量進行分析。將10 mg之繭浸漬於1 mL之PBS(最終濃度0.5M NaCl)、0.1% Triton X-100，於室溫下攪拌1小時後，進行離心分離並回收上清液。藉由SDS-PAGE對提取液中之蛋白質進行分析，結果，關於抗體之提取量，1C10最多，表現量相對較高之1D9及PGT121之提取率與1C10相比非常低。使用安裝有蛋白A管柱(HiTrap MabSelect SuRe column(0.7×2.5 cm ; 1 mL)，GE healthcare)之HPLC(High Performance Liquid Chromatography，高效液相層析法)系統(Alliance HPLC System，Waters)對提取液中含有之抗體量進行定量。將自各蠶繭製備之提取液300 μL供於蛋白A管柱，藉由PBS洗淨後，藉由100mM 檸檬酸 pH值3.0溶出結合之抗體，根據溶出峰之面積對抗體濃度進行定量。又，根據該結果，算出自每1個繭提取之抗體量。如表1所示，可知，1C10之自每1個繭可提取之抗體量為1.48 mg，可提取來自相同HIV感染患者之1D9之約3.2倍之抗體量。

### 【0061】

#### (4)1C10抗體之純化

將1C10生產用系統之繭浸漬於PBS(最終濃度0.5M NaCl)、0.1%Triton X-100，於室溫下攪拌1小時，製備繭提取液。藉由0.45 μm之過濾器過濾提取液，供於蛋白G管柱(Protein G Sepharose 4 Fast Flow，GE healthcare)。抗體自管柱之溶出係使用0.1M甘胺酸鹽酸緩衝液(pH值

2.7)。向溶出之抗體溶液加入1M Tris-HCl(pH值9.0)進行中和，最後對PBS進行透析。將經純化之抗體作為SW-1C10用於以下實驗。

#### 【0062】

(5)來源不同之1C10抗體之準備

為了調查抗體之因來源導致之結合活性及中和活性之不同，製作B細胞-1C10(Virology.; 475: 187 - 203 (2015))、293A-1C10(Virology.; 475: 187 - 203 (2015))及CHO-1C10之不同來源之1C10抗體。

#### 【0063】

CHO-1C10係如下所述進行製作。使用ExpiCHO表現系統套組(ThermoFisher Scientific)，對ExpiCHO-S細胞(附屬於套組)進行結合有1C10之cDNA之質體(pMPE-1C10)之轉染。於距離轉染12-14天後回收培養上清液，藉由0.2  $\mu\text{m}$ 之過濾器進行過濾後，與蛋白A管柱(HiTrap rProtein A FF, GE healthcare)進行結合。抗體自管柱之溶出係使用50mM甘胺酸鹽酸緩衝液(pH值2.39)。加入1M Tris-HCl(pH值9.0)進行中和，對PBS進行透析。使用PEG6,000(Wako)對抗體溶液進行濃縮後，再次對PBS進行2次透析。

#### 【0064】

(6)對HIV-1 BaL株之結合活性測定

進行SW-1C10與293A-1C10之對HIV-1 BaL株(Science.; 253: 71 - 4 (1991))之結合活性之比較。首先，準備BaL病毒感染細胞。將CEM. NKR - CCR5(NKR24)細胞(J Virol.; 86: 12039 - 52 (2012))懸濁液( $1 \times 10^6$  cells/50  $\mu\text{L}$ )與BaL病毒懸濁液50  $\mu\text{L}$ 於1.5 mL試管內混合，以1,200 $\times$ g於室溫下離心2小時。添加R10培養基(J Virol.; 86: 12039 - 52 (2012))，於

24孔盤上於37°C、5%CO<sub>2</sub>下開始培養。向NKR24細胞導入受HIV-1之LTR啟動子控制之螢光素酶基因(J Virol.; 86: 12039 - 52 (2012))。藉由neolite報導子基因分析系統(Perkin Elmer)測定該NKR24細胞中產生之螢光素酶活性，適當確認病毒之感染狀況。

#### 【0065】

於準備好BaL感染NKR24細胞及未感染(正常)NKR24細胞之階段，製備FACS(Fluorescence Activated Cell Sorter，螢光式流式細胞分選儀)分析用樣品(使用0.2% BSA(Bovine Serum Albumin，牛血清白蛋白)/PBS作為反應液)。將懸濁於反應液且調整為 $2.5 \times 10^6$  cells/mL之細胞添加50  $\mu$ L至96孔盤( $25 \times 10^4$  cells/tube)。向其中以最終濃度成為0.032/0.16/0.8/4/20/100  $\mu$ g/mL之方式添加等量之抗體溶液(藉由D-PBS(-)進行濃度調整)。於室溫下孵育30~40分鐘後，藉由反應液洗淨2次，添加50  $\mu$ L之藉由反應液稀釋200倍所得之APC(Allophycocyanin，別藍藻素)標記抗人IgG(Jackson ImmunoResearch)(以後一面遮光一面操作)。於室溫下孵育15分鐘後，藉由反應液洗淨2次，添加100  $\mu$ L之10%福馬林/PBS。於冰上孵育15分鐘後，藉由BD FACS CantoII(BD Biosciences)進行分析，根據APC之平均螢光強度(MFI)調查結合活性。

#### 【0066】

其結果，確認到SW-1C10、293A-1C10皆對BaL感染NKR24細胞特異性結合，進而顯示抗體濃度依存性之結合活性(表2及圖2)。

## 【0067】

[表2]

細胞	Ab	Ab conc.( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )					
		0.32	0.16	0.8	4	20	100
BaL-NKR24	SW-1C10	779	1085	1261	1439	1640	1897
	293A-1C10	983	1212	1287	1533	1778	1781
NKR24 (正常)	SW-1C10	91.2	100	100	114	198	451
	293A-1C10	98.2	100	103	106	115	136

## 【0068】

## (7)對HIV-1 BaL株之中和活性測定

關於SW-1C10、B細胞-1C10、293A-1C10、CHO-1C10，進行對HIV-1 BaL株之中和活性之比較。將4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為最大濃度，每5倍於96孔盤上製作8級之抗體稀釋系列(100  $\mu\text{L}/\text{well}$ )後，添加50  $\mu\text{L}$ 調整為4,000 TCID<sub>50</sub>(Tissue Culture Infectious Dose 50，半數組織培養感染劑量)/mL之BaL病毒(最終200 TCID<sub>50</sub>)。於37°C、5%CO<sub>2</sub>下孵育1小時後，將TZM-bl細胞(AIDS; 23: 897 - 906 (2009))調整至 $1 \times 10^5$  cells/mL(+37.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DEAE dextran(二乙胺乙基聚葡萄糖)，添加100  $\mu\text{L}$ 。亦同時準備作為陽性對照之VC(病毒對照；僅病毒與細胞)、作為陰性對照之CC(細胞對照；僅細胞)之孔。於37°C、5%CO<sub>2</sub>下培養2天後，藉由PBS將細胞洗淨，向各孔添加30  $\mu\text{L}$ 之螢光素酶細胞裂解液(Promega)後，攪拌15分鐘。添加50  $\mu\text{L}$ 之螢光素酶分析試劑至檢測用白盤(Costar)後，添加10  $\mu\text{L}$ 之攪拌結束後之細胞裂解物，藉由光亮度計測定RLU(Relative Light Unit，相對發光強度單位)。以CC之RLU為背景算出感染抑制率(抑制%)= $\{(\text{VC之RLU})-(\text{各抗體濃度下之RLU})\}/(\text{VC之RLU})$ ，求出IC<sub>50</sub>(50%抑制濃度)。

## 【0069】

表3表示IC50、圖3表示各抗體濃度下之感染抑制率。其結果，確認到包含SW-1C10之各種抗體顯示大致同等之中和活性。

### 【0070】

[表3]

	SW	B細胞	293A	CHO
Y=50之劑量	0.1084	0.09697	0.1326	0.07808

### 【0071】

#### (8)糖鏈結構分析

根據文獻(Mol. Cellular Proteom.; 6: 1437 - 1445 (2007))，藉由以下之操作，對SW-1C10及CHO-1C10之糖鏈結構進行分析。於界面活性劑存在下對50  $\mu$ g之純化1C10進行還原烷基化、胰蛋白酶消化後，進行利用PNGaseA之酵素消化，藉此，使N-聚糖游離。繼而，加入50 pmol之內部標準物質，進行糖墨點(Glycoblotting)法(於該步驟中，進行N-聚糖之捕捉、羧基之甲基化及BOA標記化)。將其供於質量分析(MALDI-TOF-MS(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry，基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜)；Ultraflex III，正向模式)，將獲得之圖譜與GlycoMod Tool(<http://web.expasy.org/glycomod/>)進行對照，推定N-聚糖之結構。又，使用與預先添加之內部標準物質之峰面積，使各峰面積標準化。

### 【0072】

將根據獲得之質譜推定之主要糖鏈結構與其存在比率示於圖4。CHO-1C10確認到約70.3%之核心岩藻糖附加糖鏈，相對於此，自SW-1C10完全未檢測到核心岩藻糖附加糖鏈。又，SW-1C10之糖鏈於不存在包含唾液酸附加或平分型(bisecting)GlcNAc之糖鏈之方面，與CHO-1C10

之糖鏈結構類似。

### 【0073】

#### (9)ADCC活性之測定

除SW-1C10、293A-1C10及CHO-1C10以外，準備識別gp120之V3環之人類化抗體KD-247，進行對HIV-1 BaL株之ADCC活性之比較。

藉由與結合活性測定之情形時相同之方法，製備BaL感染NKR24細胞。於準備好BaL感染NKR24細胞及未感染(正常)NKR24細胞之階段，製備ADCC活性測定用樣品(作為反應液及抗體稀釋液，使用R10培養基10 U/ml IL-2)。藉由反應液洗淨3次後，將調整為 $2.5 \times 10^5$  cells/mL之NKR24細胞添加40  $\mu$ L至96孔盤( $1 \times 10^4$  cells/well)。藉由反應液洗淨1次後，添加作為效應子細胞之調整為 $2.5 \times 10^6$  cells/mL之自然殺手細胞株人CD16+KHYG-1細胞((N6細胞；J Virol.; 86: 12039 - 52 (2012))40  $\mu$ L( $10 \times 10^4$  cells/well)。其後，以最終濃度成為0.2、2、或20  $\mu$ g/mL之方式添加20  $\mu$ L準備之各抗體。亦同時準備作為陽性對照之VC(病毒對照；僅BaL感染NKR24細胞與N6細胞)、作為陰性對照之CC(細胞對照；僅未感染NKR24細胞與N6細胞)之孔，於37°C、5%CO<sub>2</sub>下孵育6小時。

### 【0074】

ADCC活性測定係使用neolite報導子基因分析系統。添加40  $\mu$ L之neolite 試劑至檢測用白盤(Perkin Elmer)後，將孵育後之反應液懸濁，添加40  $\mu$ l，藉由光亮度計測定RLU(相對發光強度)。以CC之RLU為背景算出病毒殺傷率(殺死%；(VC之RLU－各抗體濃度下之RLU)/VC之RLU)作為ADCC活性(圖5A及B)。其結果，確認到SW-1C10於比較之抗體中顯示最高之ADCC活性。

**【0075】**

## (10)動物實驗用1C10之大量生產

對約3萬隻1C10生產用系統於全齡中提供人工飼料(日本農產工業股份有限公司 SilkMate原種用1-3歲用S)進行飼養，生產繭。藉由剪刀切開繭，取出蛹，獲得約1.1 kg之繭層。使用其中1.0 kg，進行SW-1C10之提取及純化。

**【0076】**

將1 kg之繭浸漬於100 L之提取緩衝液(50mM乙酸緩衝液pH值5.3、30mM NaCl、0.2%Triton X-100、0.01%聚二甲基矽氧烷)，於25°C下壓榨2小時，藉此提取蛋白質。藉由10 µm工業用過濾器(SMC)進行過濾後，供於填充有5 L之陽離子交換載體(STREAMLINE SP(GE healthcare))之STREAMLINE 200管柱(GE healthcare)，藉由SP洗淨緩衝液(50mM乙酸緩衝液pH值5.3、30mM NaCl、0.2%Triton X-100)進行洗淨後，藉由SP溶出緩衝液(50mM乙酸緩衝液pH值5.3，300mM NaCl)進行溶出，回收1C10抗體。進而，使用超過濾膜(Biomax-100 TF(Millipore))進行濃縮，其次，溶劑交換成PBS。將其供於填充有蛋白A載體(MabSelect SuRe(GE healthcare))之管柱，藉由PBS洗淨後，藉由100mM檸檬酸緩衝液(pH值3.0)溶出1C10抗體。最後，藉由超過濾膜進行濃縮，溶劑置換成保存溶液(10mM乙酸緩衝液pH值5.5、50mM NaCl、100mM精胺酸鹽酸鹽)。藉由以上操作，製備約7.9 g之純度99.0%以上之純化SW-1C10。

**【0077】**

## (11)1C10對HIV感染食蟹獼猴之投予

為了對急性感染期中之SW-1C10之效力進行評估，向7隻食蟹獼猴之直腸接種將50,000 TCID50之來自HIV89.6株之Env結合至SIV(Simian immunodeficiency virus，猴免疫缺陷病毒)而成之嵌合病毒即強毒性SHIV89.6P(Reimann K. A. et al., J. Virol. 70, 6922 - 6928.)，使全身感染成立。關於食蟹獼猴之群構成，將對照之無處理群設為4隻，將SW-1C10投予群設為3隻。於病毒接種後第3天、第10天、第17天經由靜脈實施SW-1C10之投予，觀察血中病毒抑制效果。

### 【0078】

自病毒接種時至第8週通常每隔7天，其以後以4週1次之頻度自麻醉之猴經時採取末梢血(添加EDTA)。採取之血液藉由離心分離回收血漿，其次藉由PBS稀釋血球後，重層於比重1.070之Percoll後，進行離心分離使PBMCs(peripheral blood mononuclear cells，末梢血單核球)分離。自血漿提取病毒RNA，藉由定量RT(Reverse Transcription，逆轉錄)-PCR對SIVmac239之gag區域進行增殖，根據其生成物之濃度算出血漿中之病毒RNA複製數。血漿中之病毒RNA利用Magna Pure Compact核酸分離套組(Roche Diagnostics)進行提取、純化。

### 【0079】

RNA量之算出係設計以SIVmac239之gag區域為靶之引子及探針，使用LightCycler 480 thermocycler(Roche Diagnostics)進行。病毒RNA係使用QuantiTec探針RT-PCR套組(Qiagen)進行擴增及檢測。引子及模板設計出以下者。即，作為正向引子，使用「5'-GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC-3'/序列編號14」，作為反向引子，使用「5'-CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT-3'/序列編號15」，作為探

針，使用「5'-FAM-TGTCCACCTGCCATTAAGTCCCGA-TAMRA-3'/序列編號16」。

#### 【0080】

RT-PCR產物係藉由LightCycler 480 thermocycler進行螢光檢測，確定其量。血漿中之病毒量係藉由Duplicate進行2次測定，病毒量係藉由階梯稀釋製成已知濃度之SIV RNA，使用校準曲線進行換算而求出。又，模板DNA或其他混入DNA係藉由DNAaseI進行處理。該測定系統之感度為100 copies/ml。

#### 【0081】

於對照之無處理猴中，於病毒接種第2週，血漿1 ml中之病毒RNA複製數上升至數千萬～數億copies後，於第8週以後進入稱為病毒學設定點之穩定狀態，以數萬～數十萬copies/ml變動。作為HIV之感染對象之CD4+T細胞數於2～4週內急速降低，其後細胞數以較低水準變動。另一方面，SW-1C10投予群中，以病毒接種第4週之10萬～100萬 copies/ml為波峰，病毒量降低，第12週以後3隻皆未檢測出病毒。又，CD4+T細胞數未大幅度降低，維持病毒投予前之水準。(圖6)。

#### 【0082】

根據本結果，令人驚訝的是，於所有投予SW-1C10之個體中，自早期起病毒成為檢測界限以下，持續12週長期將病毒RNA控制於檢測界限以下。過去未報告此種在投予全例中能夠長期控制病毒增殖之情況，本發明者等人首次成功發現廣泛且穩定地對投予對象控制病毒之抗體。

## 【序列表】

<110> 日商免疫生物研究所股份有限公司(Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.)  
 國立大學法人熊本大學(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY)  
 日商丘阿德股份有限公司(CURED Inc.)  
 國立研究開發法人醫藥基盤・健康・營養研究所(National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)

<120> 抗HIV抗體及其製造方法

<130> IBL-3-PTW

<150> JP2018-203114

<151> 2018-10-29

<150> JP2019-166040

<151> 2019-09-12

<160> 19

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 1

atcgcgaaag tattttactg ttttcgtaac agttttgtaa taaaaaac tataaatatg 60

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 2

gtaataaaaa aacctataaa tatggactgg acctggagga tc 42

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

# I861023

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 3

cgctcgagtc gcgattattt acccggagac agggagag

38

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 4

gtaataaaaa aacctataaa tatggtgttg cagaccagg tc

42

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 5

cgctcgagtc gcgattaaca ctctcccctg ttgaagctc

39

<210> 6

<211> 1425

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1425)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 6

atg gac tgg acc tgg agg atc ctc ctc ttg gtg gca gca gcc acc ggt  
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Leu Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

48

# I861023

1	5	10	15	
gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag				96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln				
	20	25	30	
cct ggg agg tcc ctg aga gtc tcc tgt gta gcc tct gga ttc atg ttc				144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Val Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Met Phe				
	35	40	45	
agt aac tat gct atg cac tgg gtc cgc cag act gca ggc aag ggg ctg				192
Ser Asn Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Ala Gly Lys Gly Leu				
	50	55	60	
gag tgg gtg gct att att tca aat gat gga agc gat aaa tat tac gca				240
Glu Trp Val Ala Ile Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala				
65	70	75	80	
gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc gta tct aga gac aac tcc cag aac				288
Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn				
	85	90	95	
aca ctg ttt ctg caa atg agt ggc ctc aga cct gag gat tcg ggt ctt				336
Thr Leu Phe Leu Gln Met Ser Gly Leu Arg Pro Glu Asp Ser Gly Leu				
	100	105	110	
tat tac tgt gcg aga gat ttg gac cag act att ccg gac ctg act gct				384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Asp Gln Thr Ile Pro Asp Leu Thr Ala				
	115	120	125	
ccc gct ttt gaa gtc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tca				432
Pro Ala Phe Glu Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser				
	130	135	140	
gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag				480
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys				
	145	150	155	160
agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac				528
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr				
	165	170	175	
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc				576
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser				
	180	185	190	
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc				624
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser				
	195	200	205	

# I861023

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 210 215 220	672
tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 225 230 235 240	720
aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 245 250 255	768
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 260 265 270	816
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc egg acc cct gag gtc aca tgc Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 275 280 285	864
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 290 295 300	912
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 305 310 315 320	960
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 325 330 335	1008
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 340 345 350	1056
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 355 360 365	1104
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 370 375 380	1152
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 385 390 395 400	1200
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	1248

# I861023

405

410

415

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc 1296  
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
420 425 430

ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac 1344  
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
435 440 445

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg 1392  
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
450 455 460

cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa 1425  
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 7  
<211> 474  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 7

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Leu Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Val Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Met Phe  
35 40 45

Ser Asn Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Ala Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala  
65 70 75 80

Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn  
85 90 95

# I861023

Thr Leu Phe Leu Gln Met Ser Gly Leu Arg Pro Glu Asp Ser Gly Leu  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Asp Gln Thr Ile Pro Asp Leu Thr Ala  
115 120 125

Pro Ala Phe Glu Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
130 135 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
145 150 155 160

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
165 170 175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
180 185 190

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
195 200 205

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
210 215 220

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
225 230 235 240

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 8  
<211> 717  
<212> DNA  
<213> 智人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(717)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (1)..(60)

&lt;400&gt; 8

atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc ata agc ttg ttg ctc tgg atc tct 48

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

ggg gcc tac ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg gcc 96

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala

20 25 30

gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc 144

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser

35 40 45

ctc ctg cat agt gat gga aac aat tac ttg gat tgg tat ttg cag aag 192

Leu Leu His Ser Asp Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys

50 55 60

cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat ttg act tct aat cgg gcc 240

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala

65 70 75 80

tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt 288

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85 90 95

aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtc tat ttc 336

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe

100 105 110

tgc atg caa tct cta caa acc tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg 384

Cys Met Gln Ser Leu Gln Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

115 120 125

gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca 432

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

130 135 140

tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg 480

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

145 150 155 160

aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac 528  
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
                   165                  170                  175

gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc 576  
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
                   180                  185                  190

aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca 624  
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
                   195                  200                  205

gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc 672  
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
                   210                  215                  220

ctg agc ttg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt taa 717  
 Leu Ser Leu Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225                  230                  235

<210> 9  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 9

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1                  5                  10                  15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala  
                   20                  25                  30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
                   35                  40                  45

Leu Leu His Ser Asp Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys  
                   50                  55                  60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala  
 65                  70                  75                  80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85

90

95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe  
 100 105 110

Cys Met Gln Ser Leu Gln Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
 210 215 220

Leu Ser Leu Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 10  
 <211> 1419  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1419)

<220>

# I861023

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 10

atg gac tgg acc tgg agg atc ctc ctc ttg gtg gca gca gcc acc ggt 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Leu Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg cac ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96  
 Val Gln Cys Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gaa gtc tct gga gtc acc ttc 144  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Val Thr Phe  
 35 40 45

act gag tct att atg cat tgg ctc cgc cag gct cca ggc aag ggg ccg 192  
 Thr Glu Ser Ile Met His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro  
 50 55 60

gag tgg ctg gca att att tca caa gat gga gcc act aaa ttc tat gca 240  
 Glu Trp Leu Ala Ile Ile Ser Gln Asp Gly Ala Thr Lys Phe Tyr Ala  
 65 70 75 80

gac tcc gtg aag ggc cga ttc gcc atc tcc aga gac aat tcc aag aat 288  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 85 90 95

acg gtg tat ttg gaa atg aac agc ctg aga att gag gac tcg ggt acc 336  
 Thr Val Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ile Glu Asp Ser Gly Thr  
 100 105 110

tat tac tgt gcg aaa gac ggg gca gat gtg gac aat tta ggt ccc gcc 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Gly Ala Asp Val Asp Asn Leu Gly Pro Ala  
 115 120 125

ttt gac tac tgg ggc cgg gga acc ctg gtc acc gtc tct tca gct agc 432  
 Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 130 135 140

acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc 480  
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 145 150 155 160

tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc 528  
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 165 170 175

gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg 576  
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

180	185	190	
cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc			624
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser			
195	200	205	
agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc			672
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile			
210	215	220	
tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt			720
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val			
225	230	235	240
gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca			768
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
245	250	255	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc			816
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
260	265	270	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg			864
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
275	280	285	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg			912
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
290	295	300	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag			960
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
305	310	315	320
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag			1008
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
325	330	335	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc			1056
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
340	345	350	
ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc			1104
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
355	360	365	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc			1152
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr			
370	375	380	

# I861023

aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc 1200  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 385 390 395 400

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac 1248  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 405 410 415

aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc etc tac 1296  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 420 425 430

agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc 1344  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 435 440 445

tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag 1392  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 450 455 460

agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa 1419  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 11  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 11

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Leu Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Val Thr Phe  
 35 40 45

Thr Glu Ser Ile Met His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro  
 50 55 60

Glu Trp Leu Ala Ile Ile Ser Gln Asp Gly Ala Thr Lys Phe Tyr Ala  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

Thr Val Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ile Glu Asp Ser Gly Thr  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Gly Ala Asp Val Asp Asn Leu Gly Pro Ala  
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
210 215 220

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
225 230 235 240

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
245 250 255

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
260 265 270

# I861023

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
275 280 285

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
305 310 315 320

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 12  
 <211> 717  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(717)

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(60)

<400> 12  
 atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc ata agc ttg ttg ctc tgg atc tct 48  
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1 5 10 15  
 ggt gcc tac ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc 96  
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro  
 20 25 30  
 gtc aac cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc 144  
 Val Asn Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 ctc cta cat act aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac gtg cag aag 192  
 Leu Leu His Thr Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Val Gln Lys  
 50 55 60  
 cca ggg cag tct ccg cag ctc ctg atc ttt ttg ggt tct cat cgg gcc 240  
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Phe Leu Gly Ser His Arg Ala  
 65 70 75 80  
 tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt 288  
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 85 90 95  
 aca ctg aaa atc agc aga gtg gag tct gag gat gtt ggc gtt tat tac 336  
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
 100 105 110  
 tgc atg caa cct cta caa tcg tgg acg ttc ggc caa ggg acc agg gtg 384  
 Cys Met Gln Pro Leu Gln Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val  
 115 120 125  
 gaa atc aat cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca 432

# I861023

Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
130 135 140

tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg 480  
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
145 150 155 160

aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac 528  
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
165 170 175

gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc 576  
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
180 185 190

aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca 624  
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
195 200 205

gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc 672  
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
210 215 220

ctg agc ttg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt taa 717  
Leu Ser Leu Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 13  
<211> 238  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 13

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro  
20 25 30

Val Asn Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

Leu Leu His Thr Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Val Gln Lys  
50 55 60

# I861023

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Phe Leu Gly Ser His Arg Ala  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Met Gln Pro Leu Gln Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val  
115 120 125

Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
210 215 220

Leu Ser Leu Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

# I861023

<220>

<223> CDRH1

<400> 14

Gly Phe Met Phe Ser Asn Tyr Ala

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2

<400> 15

Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asp Lys

1 5

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH3

<400> 16

Cys Ala Arg Asp Leu Asp Gln Thr Ile Pro Asp Leu Thr Ala Pro Ala

1 5 10 15

Phe Glu Val

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRL1

<400> 17

# I861023

Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Asn Asn  
1 5 10

<210> 18  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDRL2

<400> 18

Leu Thr Ser  
1

<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CDRL3

<400> 19

Met Gln Ser Leu Gln Thr Trp Thr  
1 5

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種抗體，其具有對HIV之結合能力；且

與該抗體結合之糖鏈不含岩藻糖；

該抗體具有藉由對HIV感染者之單次投予或數次投予而以90%以上之機率將該HIV感染者之血中HIV抑制於檢測界限以下的作用；且

重鏈具有分別包含序列編號14~16所記載之胺基酸序列之CDR1~3序列，且輕鏈具有分別包含序列編號17~19所記載之胺基酸序列之CDR1~3序列。

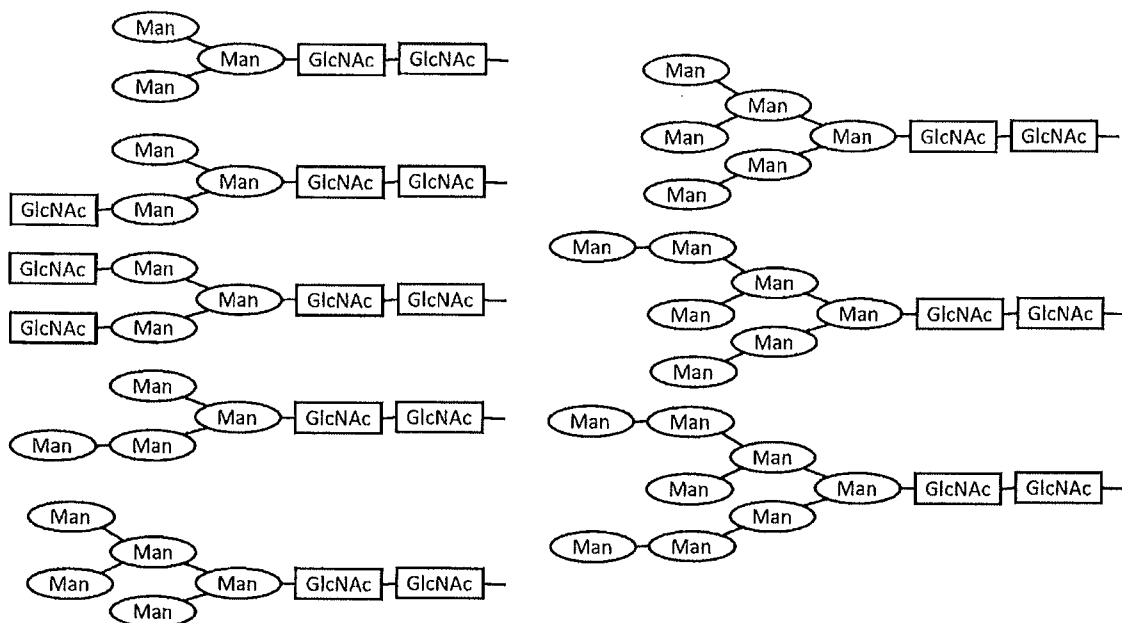
### 【第2項】

如請求項1之抗體，其具有包含序列編號7所記載之胺基酸序列之重鏈、以及包含序列編號9所記載之胺基酸序列之輕鏈。

### 【第3項】

如請求項2之抗體，其具有選自以下之糖鏈結構；

[化1]



**【第4項】**

一種組合物，其係包含IgG抗體之組合物，該IgG抗體具有對HIV之結合能力，且

該IgG抗體之80%以上為如請求項1至3中任一項之抗體。

**【第5項】**

一種表現單元，其含有與絲腺特異性基因啟動子之下游功能性結合之選自以下(i)~(iv)之任一多核苷酸：

(i)具有序列編號6所記載之鹼基序列及序列編號8所記載之鹼基序列之多核苷酸；

(ii)具有與序列編號6所記載之鹼基序列於嚴格之條件下雜交之鹼基序列、及與序列編號8所記載之鹼基序列於嚴格之條件下雜交之鹼基序列的多核苷酸；

(iii)編碼序列編號7所記載之胺基酸序列之多核苷酸、及編碼序列編號9所記載之胺基酸序列之多核苷酸；以及

(iv)編碼與序列編號7所記載之胺基酸序列具有90%以上同一性、且包含序列編號14~16所記載胺基酸序列之胺基酸序列之多核苷酸、及編碼與序列編號9所記載之胺基酸序列具有90%以上同一性、且包含序列編號17~19所記載胺基酸序列之胺基酸序列之多核苷酸。

**【第6項】**

如請求項5之表現單元，其中上述絲腺特異性基因啟動子為絲膠蛋白1啟動子、絲膠蛋白2啟動子或絲膠蛋白3啟動子。

**【第7項】**

一種質體載體，其含有如請求項6之表現單元。

**【第8項】**

一種基因轉殖絹絲蟲之製造方法，其於染色體中結合有如請求項6之表現單元。

**【第9項】**

一種抗體之製造方法，其包括自藉由如請求項8之基因轉殖絹絲蟲之製造方法所製造之基因轉殖絹絲蟲產生之絲提取該抗體。

**【第10項】**

一種HIV治療用藥或預防用醫藥組合物，其含有如請求項1至3中任一項之抗體或者如請求項4之組合物作為有效成分，並包含藥學上容許之載體。

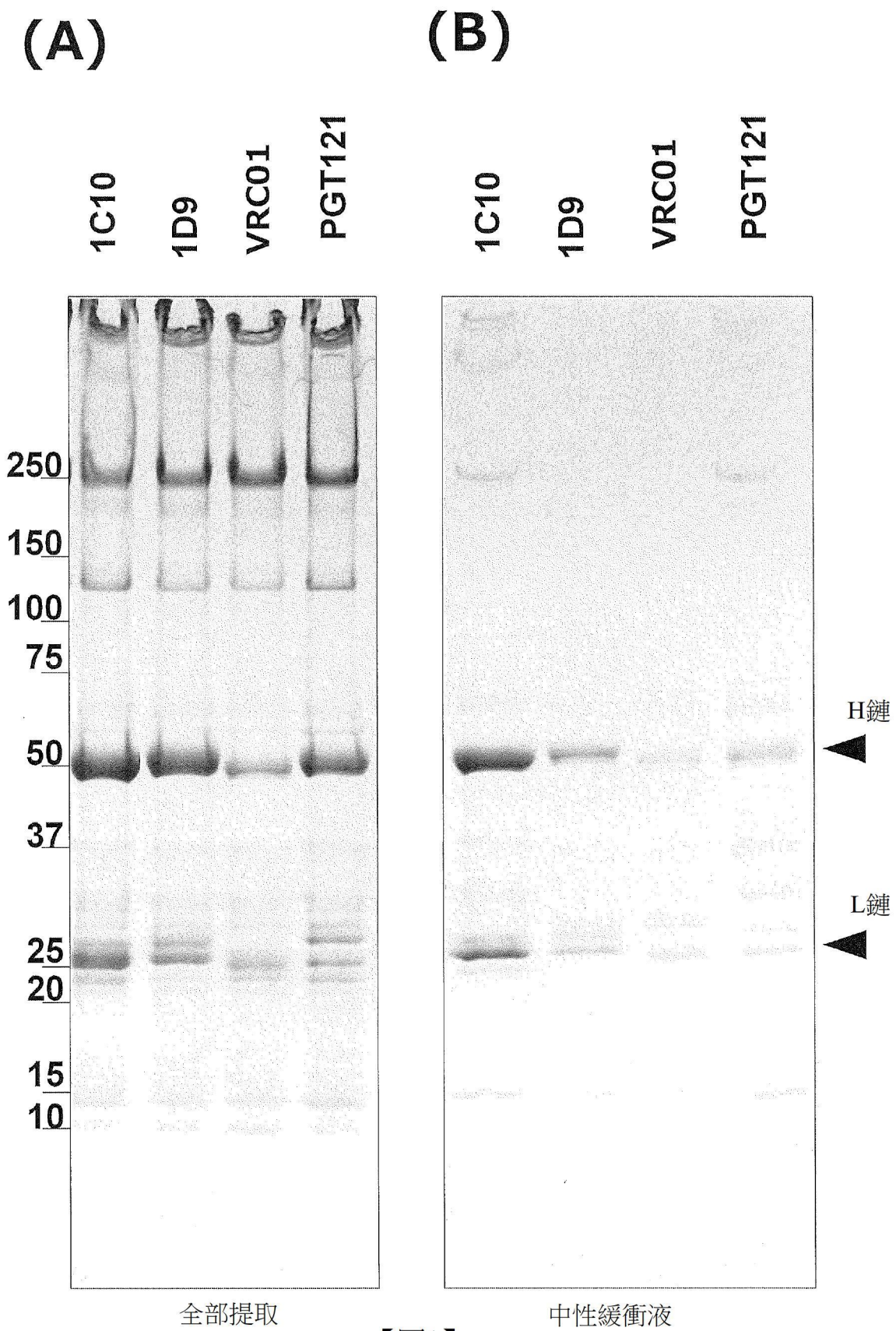
**【第11項】**

一種如請求項1至3中任一項之抗體或者如請求項4之組合物之用途，其係用以製造如請求項10之醫藥組合物，該醫藥組合物係用以於HIV感染後投予1～5次。

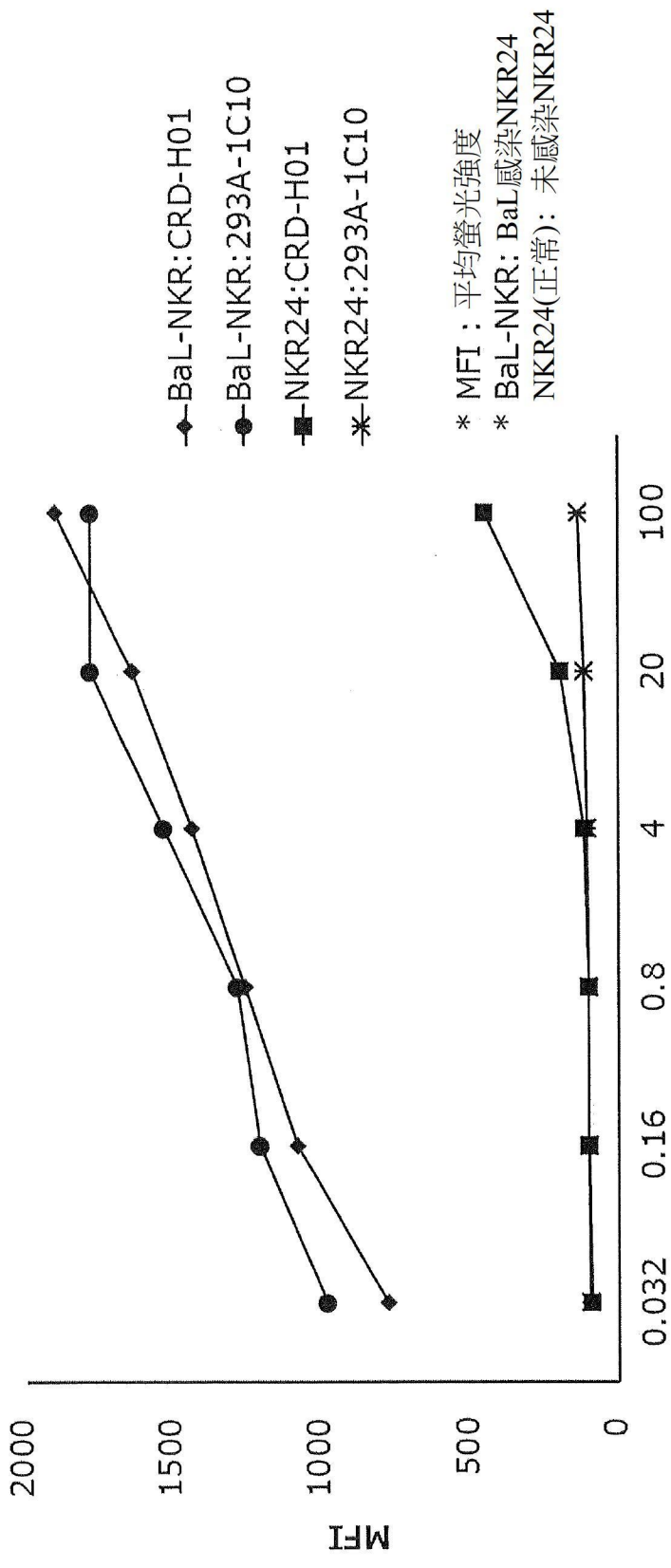
**【第12項】**

一種如請求項1至3中任一項之抗體或者如請求項4之組合物之用途，其係用以製造如請求項10之醫藥組合物，該醫藥組合物係用以投予2次以上，且第2次以後之投予係於上次投予之3～30天後進行。

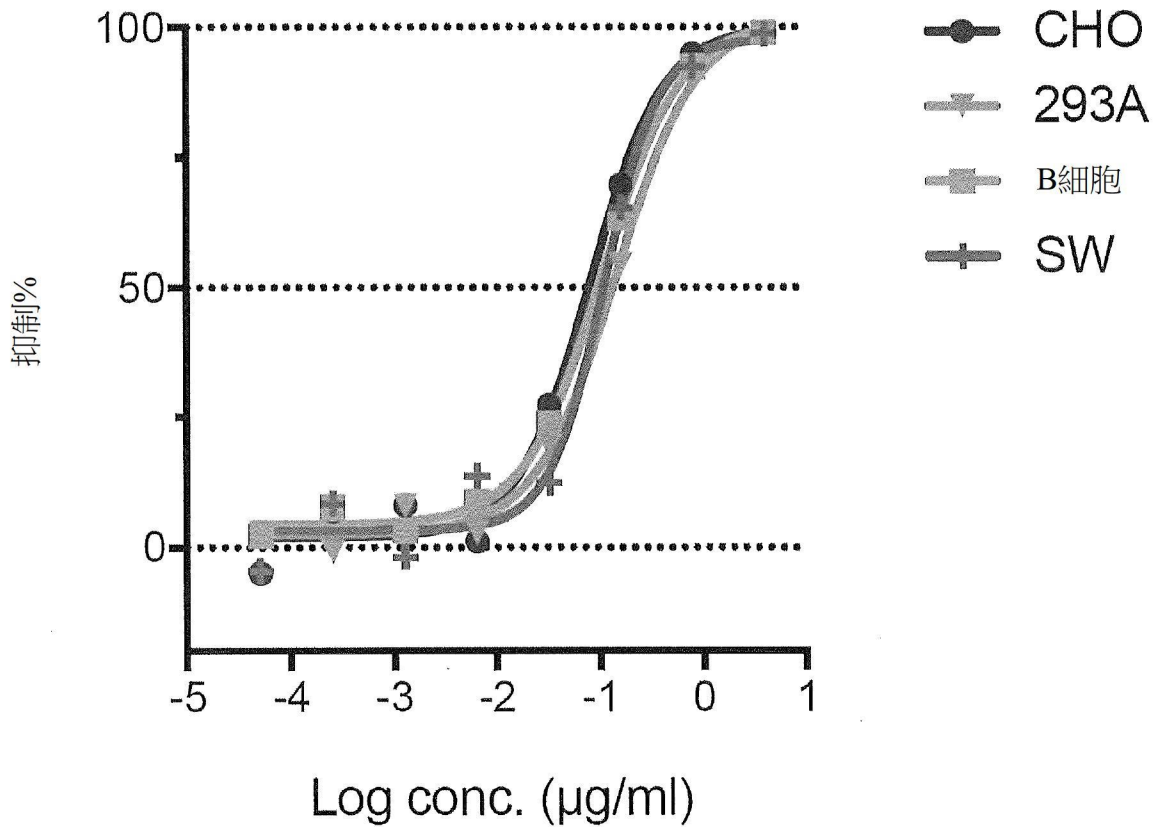
【發明圖式】



【圖1】

















【圖2】



Ab (µg/mL)	抑制%			
	SW	B細胞	293A	CHO
4	98.84%	99.07%	98.82%	99.15%
0.8	92.44%	92.51%	89.87%	94.92%
0.16	65.38%	63.40%	54.38%	69.76%
0.032	12.37%	23.84%	19.55%	27.35%
0.0064	13.67%	8.70%	2.96%	1.21%
0.00128	-1.79%	3.21%	8.12%	8.08%
0.000256	8.51%	7.67%	-0.79%	6.95%
0.0000512	-4.43%	2.24%	2.98%	-4.96%

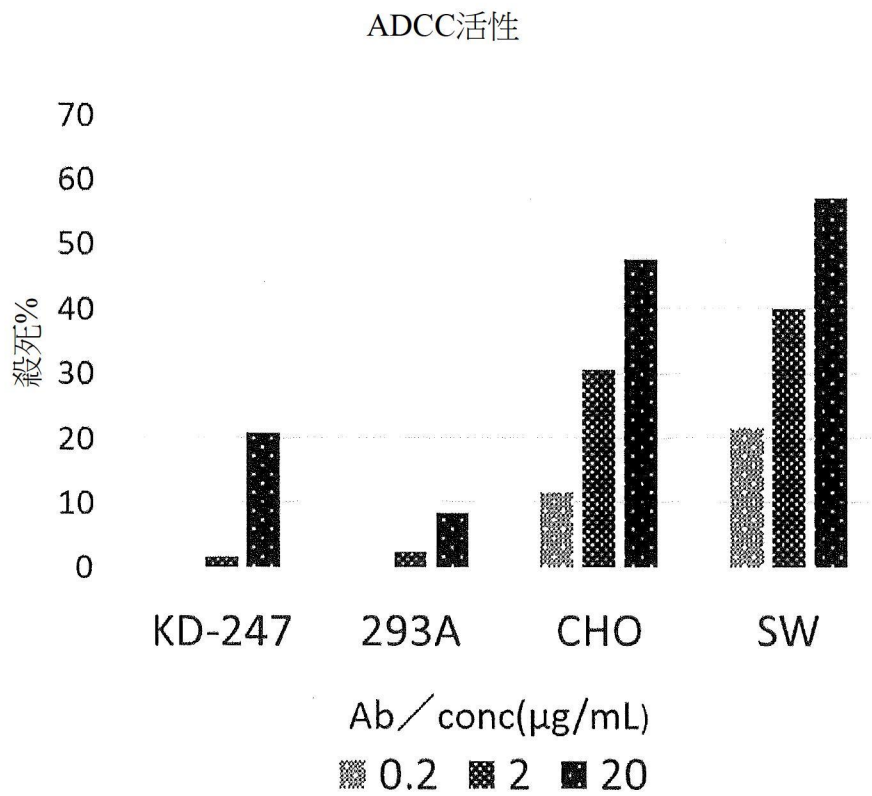
【圖3】

		來自蠶之1C10 (SW-1C10)		來自CHO之1C10 (CHO-1C10)	
		Percentage	Percentage	Percentage	Percentage
不含岩藻糖 之糖鏈		1.6%	97.7%	0%	24.9%
		14.5%		2.1%	
		6.0%		2.2%	
		1.6%		0%	
		66.1%		18.4%	
		5.1%		1.6%	
		1.4%		0.6%	
		1.4%		0%	
含有岩藻糖 之糖鏈		0%	0%	0.6%	70.3%
		0%		13.0%	
		0%		52.3%	
		0%		0.7%	
		0%		3.1%	
		0%		0.6%	
其他		2.3%	2.3%	4.8%	4.8%

- : N-乙醯葡萄糖胺
- : 甘露糖
- : 半乳糖
- ▶ : 岩藻糖

【圖4】

(A)



(B)

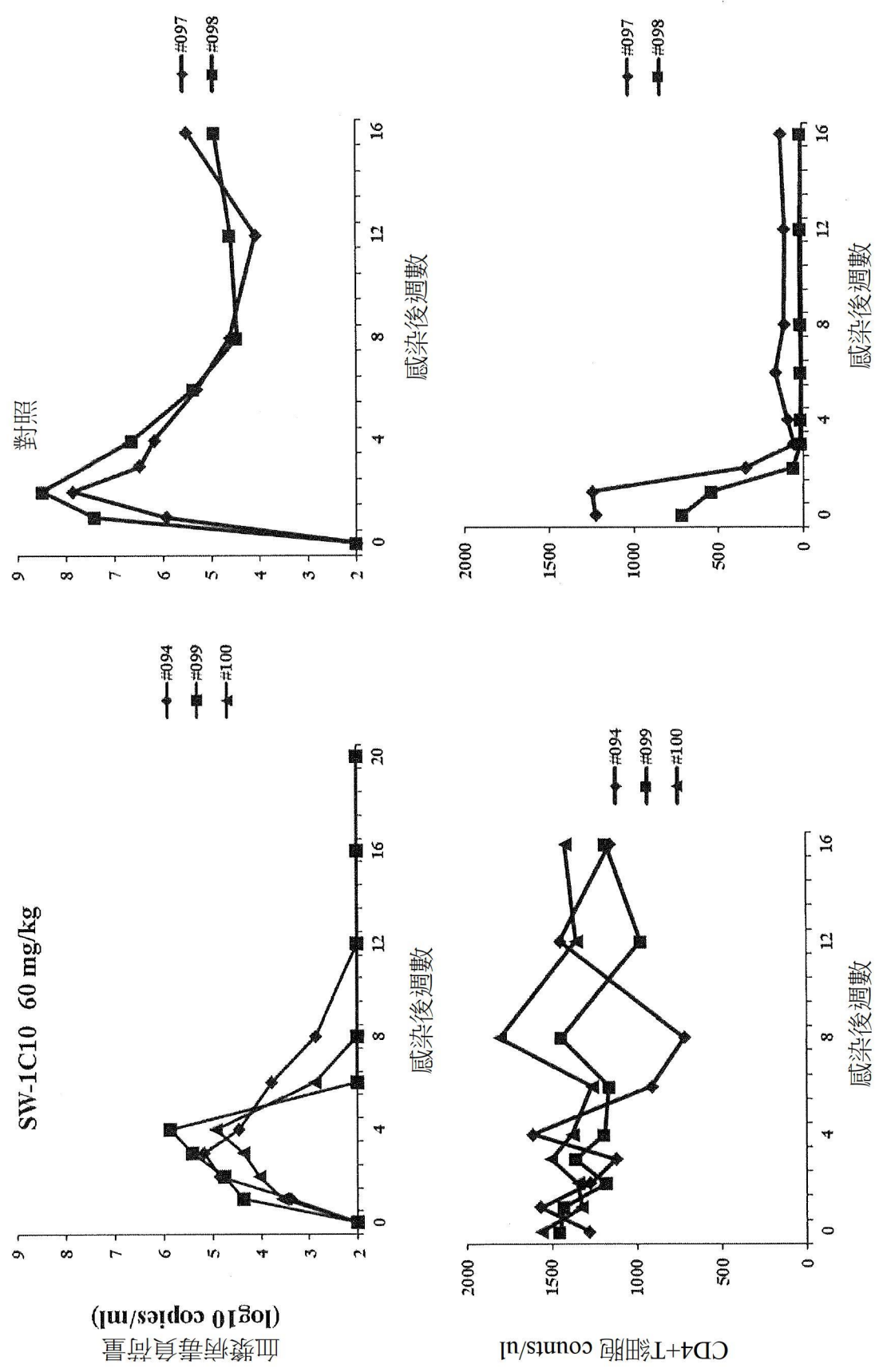
Ab	1C10			KD-247 (殺死%)
	SW (殺死%)	293A (殺死%)	CHO (殺死%)	
conc. (µg/mL)				
0.2	21.5	0	11.7	0
2	40.1	2.4	30.7	1.8
20	57.2	8.6	47.7	20.9

靶細胞：BaL感染NKR24

效應子細胞：N6

【圖5】

投予了SW-1C10之SHIV感染食蟹獼猴中之血清中病毒量與CD4陽性細胞數



【圖6】