

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6918005号  
(P6918005)

(45) 発行日 令和3年8月11日(2021.8.11)

(24) 登録日 令和3年7月26日(2021.7.26)

(51) Int.Cl.	F I				
<b>C07K 16/40 (2006.01)</b>	C07K	16/40	ZNA		
<b>C07K 16/10 (2006.01)</b>	C07K	16/10			
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K	39/395	S		
<b>A61K 45/00 (2006.01)</b>	A61K	45/00			
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61K	39/395	P		
請求項の数 8 (全 32 頁) 最終頁に続く					

(21) 出願番号 特願2018-543026 (P2018-543026)  
 (86) (22) 出願日 平成28年11月2日 (2016.11.2)  
 (65) 公表番号 特表2019-504107 (P2019-504107A)  
 (43) 公表日 平成31年2月14日 (2019.2.14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/060134  
 (87) 国際公開番号 W02017/079314  
 (87) 国際公開日 平成29年5月11日 (2017.5.11)  
 審査請求日 令和1年8月23日 (2019.8.23)  
 (31) 優先権主張番号 62/249,868  
 (32) 優先日 平成27年11月2日 (2015.11.2)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 518150426  
 シン バイオテクノロジー、エルエルシー  
 アメリカ合衆国 33558 フロリダ、  
 ルッツ、リュ ボルドー 4708  
 (74) 代理人 110000855  
 特許業務法人浅村特許事務所  
 (72) 発明者 シン、シュナンダ  
 アメリカ合衆国 33558 フロリダ、  
 ルッツ、リュ ボルドー 4708  
 審査官 太田 雄三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内抗原に対して向けられた単一ドメイン抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 27 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 のポリペプチドを含む抗 HIV - 1 逆転写酵素 s d A b 。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の抗 HIV - 1 逆転写酵素 s d A b を含む医薬組成物。

【請求項 4】

哺乳動物に投与される、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

1 種または複数の化合物と組み合わせて投与される、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記 1 種または複数の化合物がプロテアーゼ阻害剤である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

有効量の前記抗 HIV - 1 逆転写酵素 s d A b を、それを必要とする対象に投与することが、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、経腸投与、非経口投与、眼内投与、皮下投与、経皮投与、点眼剤として投与、鼻スプレーとして投与、吸入または噴霧によ

って投与、局所投与および埋め込み可能な薬物として投与を含む、請求項3に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

このPCT国際特許出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる2015年11月2日に提出された米国仮特許出願第62/249898号の利益を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、ハードコピーの代わりにテキストフォーマットで配列リストと一緒に提出している。配列表は、2016年10月27日に作成された「sequence listing.txt」という表題のファイルとして提供され、サイズが58キロバイトである。配列表の電子フォーマットの情報は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

単一抗原結合タンパク質として、またはより大きいタンパク質もしくはポリペプチド中の抗原結合ドメインとしての単一ドメイン抗体(s d A b)の使用は、従来の抗体または抗体フラグメントの使用に対するいくつかの重要な利点を提供する。s d A bの利点としては以下が挙げられる：単一ドメインのみが高い親和性および高い選択性で抗原に結合するために必要とされる；s d A bは単一遺伝子から発現することができ、翻訳後修飾を必要としない；s d A bは変性剤または熱、pH、およびプロテアーゼを含む条件に対して高度に安定である；s d A bは安価に調製することができる；およびs d A bは、従来の抗体がアクセスできない標的およびエピトープにアクセスすることができる。

【0004】

ヌクレオチドおよびタンパク質などの異常な細胞内または膜貫通成分によって引き起こされるウイルス感染症またはがんなどのいくつかの疾患または状態が存在する。異常な成分の排除を使用して、疾患または状態を予防または治療することができる。このような疾患の治療に利用可能ないくつかの薬理的化合物が存在するが、これらの化合物は、非罹患細胞に対して効果がない、送達不能である、または毒性であり得る。

【0005】

他の治療には、治療薬が細胞膜の受容体によって認識され、治療薬が細胞膜を通過して細胞に侵入することを可能にするように外因性標的化配列を含む治療タンパク質または薬剤の使用が含まれる。いったん治療薬が細胞内に入ると、治療薬は疾患を治療するために標的成分と相互作用することができる。しかしながら、外因性標的化配列の使用は、治療薬によって標的化される細胞型を制限し、治療薬を製造するコストを増加させ得る。

【0006】

前記の理由から、細胞に侵入するために外因性標的化配列にも化学組成物にも依存せず、体内の罹患細胞のみを標的化とするのに有効である、疾患を治療または予防するための組成物および方法が必要とされている。

【0007】

本発明は、単一ドメイン抗体(s d A b)、s d A bを含むタンパク質およびポリペプチドに関する。s d A bは、状態または疾患を引き起こす標的に対して向けられる。本発明はまた、s d A b、s d A bを含むタンパク質およびポリペプチド、ならびに組成物を含む。本発明は、予防、治療または診断目的のための組成物、s d A b、タンパク質またはポリペプチドの使用を含む。本発明は、本発明のs d A bに対して向けられたモノクローナル抗体の使用も含む。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、状態または疾患を治療または予防するために使用されるs d A bに関する。

10

20

30

40

50

一実施形態は、抗ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)逆転写酵素単ドメイン抗体(sdAb)に関する。一態様では、抗HIV-1逆転写酵素sdAbが、配列番号27に示されるアミノ酸配列を含む。本発明はまた、有効量の抗HIV-1逆転写酵素sdAbを、それを必要とする対象に投与することによって、抗HIV-1逆転写酵素sdAbを用いて、対象の疾患を治療、疾患の発症を予防、または疾患の再発を予防する方法を含む。対象は、ヒトなどの哺乳動物であり得る。抗HIV-1逆転写酵素sdAbは、例えばプロテアーゼ阻害剤などの1種または複数の化合物と組み合わせて投与することができる。有効量の抗HIV-1逆転写酵素sdAbを、それを必要とする対象に投与することは、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、経腸投与、非経口投与、眼内投与、皮下投与、経皮投与によることができ、点眼剤として投与され、鼻スプレーとして投与され、吸入または噴霧によって投与され、局所投与され、埋め込み可能な薬物として投与され得る。

10

**【0009】**

別の実施形態では、本発明は、配列番号27に示されるアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドに関する。別の実施形態では、本発明は、配列番号27のポリペプチドに対して向けられた抗体を含む。

**【0010】**

本発明は、対象由来の試料中の抗HIV-1逆転写酵素sdAbのレベルを測定する方法であって、a)配列番号27に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの1つまたは複数のドメインに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を作製するステップと；b)対象から試料を得るステップと；c)マウスモノクローナル抗体および試料を用いて定量的イムノアッセイを行って、対象のsdAbの量を決定するステップと；こうして対象のsdAbの量を測定するステップとを含む方法を含む。一態様では、定量的イムノアッセイが、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、特異的分析物標識および再捕捉アッセイ(SALRA)、液体クロマトグラフィー、質量分析、蛍光活性化セルソーティングまたはこれらの組み合わせを含む。

20

**【0011】**

本発明の別の実施形態は、抗エボラVP24 sdAbに関する。一態様では、抗エボラVP24 sdAbが、配列番号55に示されるアミノ酸配列を含む。本発明はまた、有効量の抗エボラVP24 sdAbを、それを必要とする対象に投与することによって、抗エボラVP24 sdAbを用いて、対象の疾患を治療、疾患の発症を予防、または疾患の再発を予防する方法を含む。対象は、ヒトなどの哺乳動物であり得る。抗エボラVP24 sdAbは、例えばプロテアーゼ阻害剤などの1種または複数の化合物と組み合わせて投与することができる。有効量の抗エボラVP24 sdAbを、それを必要とする対象に投与することは、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、経腸投与、非経口投与、眼内投与、皮下投与、経皮投与によることができ、点眼剤として投与され、鼻スプレーとして投与され、吸入または噴霧によって投与され、局所投与され、埋め込み可能な薬物として投与され得る。

30

**【0012】**

別の実施形態では、本発明は、配列番号55に示されるアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドに関する。別の実施形態では、本発明は、配列番号55のポリペプチドに対して向けられた抗体を含む。

40

**【0013】**

本発明は、対象由来の試料中の抗エボラVP24 sdAbのレベルを測定する方法であって、a)配列番号55に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの1つまたは複数のドメインに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を作製するステップと；b)対象から試料を得るステップと；c)マウスモノクローナル抗体および試料を用いて定量的イムノアッセイを行って、対象のsdAbの量を決定するステップと；こうして対象のsdAbの量を測定するステップとを含む方法を含む。一態様では、定量的イムノアッセイが、ELISA、SALRA、液体クロマトグラフィー、質量分析、蛍光活性化セルソー

50

ティングまたはこれらの組み合わせを含む。

【 0 0 1 4 】

本発明のさらに別の実施形態は、抗アラキドン酸 1 2 - リポキシゲナーゼ ( A L O X 1 2 ) s d A b に関する。一態様では、抗 A L O X 1 2 s d A b が、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1 または配列番号 5 2 に示されるアミノ酸配列を含む。本発明はまた、有効量の抗 A L O X 1 2 s d A b を、それを必要とする対象に投与することによって、抗 A L O X 1 2 s d A b を用いて、対象の疾患を治療、疾患の発症を予防、または疾患の再発を予防する方法を含む。対象は、ヒトなどの哺乳動物であり得る。抗 A L O X 1 2 s d A b は、1 種または複数の化合物と組み合わせて投与することができる。有効量の抗 A L O X 1 2 s d A b を、それを必要とする対象に投与することは、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、経腸投与、非経口投与、眼内投与、皮下投与、経皮投与によることができ、点眼剤として投与され、鼻スプレーとして投与され、吸入または噴霧によって投与され、局所投与され、埋め込み可能な薬物として投与され得る。

10

【 0 0 1 5 】

別の実施形態では、本発明は、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1 または配列番号 5 2 に示されるアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドに関する。別の実施形態では、本発明は、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1 または配列番号 5 2 のポリペプチドに対して向けられた抗体を含む。

【 0 0 1 6 】

本発明は、対象由来の試料中の抗 H I V - 1 逆転写酵素 s d A b のレベルを測定する方法であって、a) 配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの 1 つまたは複数のドメインに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を作製するステップと；b) 対象から試料を得るステップと；c) マウスモノクローナル抗体および試料を用いて定量的イムノアッセイを行って、対象の s d A b の量を決定するステップと；こうして対象の s d A b の量を測定するステップとを含む方法を含む。一態様では、定量的イムノアッセイが、E L I S A、S A L R A、液体クロマトグラフィー、質量分析、蛍光活性化セルソーティングまたはこれらの組み合わせを含む。

20

【 0 0 1 7 】

本発明のこれらおよび他の特徴、態様および利点は、以下の説明、添付の特許請求の範囲、および付随する図面に関してよりよく理解されるであろう。

30

他の記載との重複もあるが、本発明を以下に示す。

[ 発明 1 ]

抗ヒト免疫不全ウイルス 1 型 ( H I V - 1 ) 逆転写酵素単ドメイン抗体 ( s d A b )

。

[ 発明 2 ]

配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列を含む抗 H I V - 1 逆転写酵素 s d A b 。

[ 発明 3 ]

発明 1 または 2 に記載の抗 H I V - 1 逆転写酵素 s d A b を用いて、対象の疾患を治療、疾患の発症を予防、または疾患の再発を予防する方法であって、有効量の前記抗 H I V - 1 逆転写酵素 s d A b を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法。

40

[ 発明 4 ]

前記対象が哺乳動物である、発明 3 に記載の方法。

[ 発明 5 ]

前記哺乳動物がヒトである、発明 4 に記載の方法。

[ 発明 6 ]

前記抗 H I V - 1 逆転写酵素 s d A b が 1 種または複数の化合物と組み合わせて投与される、発明 3 に記載の方法。

[ 発明 7 ]

前記 1 種または複数の化合物がプロテアーゼ阻害剤である、発明 6 に記載の方法。

[ 発明 8 ]

50

有効量の前記抗HIV-1逆転写酵素s d A bを、それを必要とする対象に投与することが、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、経腸投与、非経口投与、眼内投与、皮下投与、経皮投与、点眼剤として投与、鼻スプレーとして投与、吸入または噴霧によって投与、局所投与および埋め込み可能な薬物として投与を含む、発明3に記載の方法。

[発明9]

配列番号27に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

[発明10]

発明9に記載のポリペプチドに対して向けられた抗体。

[発明11]

対象由来の試料中の抗HIV-1逆転写酵素s d A bのレベルを測定する方法であって

10

a) 配列番号27に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの1つまたは複数のドメインに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を作製するステップと；

b) 前記対象から試料を得るステップと；

c) 前記マウスモノクローナル抗体および前記試料を用いて定量的イムノアッセイを行って、対象のs d A bの量を決定するステップと；

d) 前記対象のs d A bの量を定量化するステップと

を含む方法。

[発明12]

前記定量的イムノアッセイが、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、特異的分析物標識および再捕捉アッセイ(SALRA)、液体クロマトグラフィー、質量分析、蛍光活性化セルソーティングまたはこれらの組み合わせを含む、発明11に記載の方法。

20

[発明13]

抗エボラVP24単ドメイン抗体(s d A b)。

[発明14]

配列番号55に示されるアミノ酸配列を含む抗エボラVP24 s d A b。

[発明15]

発明13または14に記載の抗エボラVP24 s d A bを用いて、対象の疾患を治療、疾患の発症を予防、または疾患の再発を予防する方法であって、有効量の前記抗エボラVP24 s d A bを、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法。

30

[発明16]

前記対象が哺乳動物である、発明15に記載の方法。

[発明17]

前記哺乳動物がヒトである、発明16に記載の方法。

[発明18]

前記抗エボラVP24 s d A bが1種または複数の化合物と組み合わせて投与される、発明15に記載の方法。

[発明19]

前記1種または複数の化合物が抗ウイルス化合物である、発明18に記載の方法。

[発明20]

有効量の前記抗エボラVP24 s d A bを、それを必要とする対象に投与することが、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、経腸投与、非経口投与、眼内投与、皮下投与、経皮投与、点眼剤として投与、鼻スプレーとして投与、吸入または噴霧によって投与、局所投与および埋め込み可能な薬物として投与を含む、発明14に記載の方法。

40

[発明21]

配列番号55に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

[発明22]

発明21に記載のポリペプチドに対して向けられた抗体。

[発明23]

対象由来の試料中の抗エボラVP24 s d A bのレベルを測定する方法であって、

50

a) 配列番号 55 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの 1 つまたは複数のドメインに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を作製するステップと;

b) 前記対象から試料を得るステップと;

c) 前記マウスモノクローナル抗体および前記試料を用いて定量的イムノアッセイを行って、対象の s d A b の量を決定するステップと;

d) 前記対象の s d A b の量を定量化するステップと

を含む方法。

[ 発明 24 ]

前記定量的イムノアッセイが、酵素結合免疫吸着測定 ( E L I S A )、特異的分析物標識および再捕捉アッセイ ( S A L R A )、液体クロマトグラフィー、質量分析、蛍光活性化セルソーティングまたはこれらの組み合わせを含む、発明 23 に記載の方法。

[ 発明 25 ]

抗アラキドン酸 12 - リポキシゲナーゼ ( A L O X 1 2 ) 単一ドメイン抗体 ( s d A b )。

[ 発明 26 ]

配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51 または配列番号 52 に示されるアミノ酸配列を含む抗 A L O X 1 2 s d A b。

[ 発明 27 ]

発明 25 または 26 に記載の抗 A L O X 1 2 s d A b を用いて、対象の疾患を治療、疾患の発症を予防、または疾患の再発を予防する方法であって、有効量の前記抗 A L O X 1 2 s d A b を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法。

[ 発明 28 ]

前記対象が哺乳動物である、発明 27 に記載の方法。

[ 発明 29 ]

前記哺乳動物がヒトである、発明 28 に記載の方法。

[ 発明 30 ]

前記抗 A L O X 1 2 s d A b が 1 種または複数の化合物と組み合わせて投与される、発明 27 に記載の方法。

[ 発明 31 ]

有効量の前記抗 A L O X 1 2 s d A b を、それを必要とする対象に投与することが、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、経腸投与、非経口投与、眼内投与、皮下投与、経皮投与、点眼剤として投与、鼻スプレーとして投与、吸入または噴霧によって投与、局所投与および埋め込み可能な薬物として投与を含む、発明 27 に記載の方法。

[ 発明 32 ]

配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51 または配列番号 52 に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

[ 発明 33 ]

発明 32 に記載のポリペプチドに対して向けられた抗体。

[ 発明 34 ]

対象由来の試料中の抗 A L O X 1 2 s d A b のレベルを測定する方法であって、

a) 配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51 または配列番号 52 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの 1 つまたは複数のドメインに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を作製するステップと;

b) 前記対象から試料を得るステップと;

c) 前記マウスモノクローナル抗体および前記試料を用いて定量的イムノアッセイを行って、対象の s d A b の量を決定するステップと;

d) 前記対象の s d A b の量を定量化するステップと

を含む方法。

[ 発明 35 ]

前記定量的イムノアッセイが、酵素結合免疫吸着測定 ( E L I S A )、特異的分析物標

10

20

30

40

50

識および再捕捉アッセイ (SALRA)、液体クロマトグラフィー、質量分析、蛍光活性化セルソーティングまたはこれらの組み合わせを含む、発明34に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】HIV1-9抗HIV-1 RT sdAb (配列番号27)を使用したELISAの結果を示す図である。

【図2】HIV1-9抗HIV-1 RT sdAb (配列番号27)を使用したELISAの結果を示す図である。

【図3】HIV1-9抗HIV-1 RT sdAb (配列番号27)の希釈系列を使用したELISAの結果を示す図である。 10

【図4】HIV1-9抗HIV-1 RT sdAb (配列番号27)の希釈系列を使用したELISAの結果を示す図である。

【図5】VP24-5抗エボラVP24 sdAb (配列番号55)を使用したELISAの結果を示す図である。

【図6】VP24-5抗エボラVP24 sdAb (配列番号55)を使用したELISAの結果を示す図である。

【図7】VP24-5抗エボラVP24 sdAb (配列番号55)を使用したELISAの結果を示す図である。

【図8】VP24-5抗エボラVP24 sdAb (配列番号55)を使用したELISAの結果を示す図である。 20

【図9】VP24-5抗エボラVP24 sdAb (配列番号55)の希釈系列を使用したELISAの結果を示す図である。

【図10】VP24-5抗エボラVP24 sdAb (配列番号55)の希釈系列を使用したELISAの結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書で使用される場合、以下の用語およびその変形は、このような用語が使用される文脈によって異なる意味が明確に意図されない限り、以下に示される意味を有する。

【0020】

本明細書で使用される「1つの(a、an)」および「この(the)」という用語ならびに同様の指示対象は、文脈におけるそれらの使用がそうでないことを示さない限り、単数と複数の両方を包含するものと解釈されるべきである。 30

【0021】

「抗原決定基」という用語は、抗原結合分子(本発明のsdAbまたはポリペプチドなど)によって、より具体的には抗原結合分子の抗原結合部位によって認識される抗原上のエピトープを指す。「抗原決定基」および「エピトープ」という用語はまた、互換的に使用され得る。特定の抗原決定基、エピトープ、抗原またはタンパク質に結合することができる、これらに対して親和性を有する、および/またはこれらに対する特異性を有するアミノ酸配列は、抗原決定基、エピトープ、抗原またはタンパク質に「対する」または「対して向けられる」と言われる。 40

【0022】

本明細書で使用される場合、「含む(comprise)」という用語およびこの用語の変形、例えば「含む(comprising)」および「含む(comprises)」は、他の添加剤、成分、整数またはステップを排除することを意図しない。

【0023】

本明細書中に記載されるsdAb、ポリペプチドおよびタンパク質は、アミノ酸残基が類似の化学構造の別のアミノ酸残基で置き換えられているが、ポリペプチドの機能にも、活性にも他の生物学的特性にもほとんどまたは本質的に全く影響しないアミノ酸置換として一般に記載され得る、いわゆる「保存的」アミノ酸置換を含むことができることが熟慮 50

される。保存的アミノ酸置換は当技術分野で周知である。保存的置換は、以下の群(a)~(e)内の1個のアミノ酸が同じ群内の別のアミノ酸によって置換される置換である：  
 (a) 小さな脂肪族、非極性またはわずかに極性の残基：Ala、Ser、Thr、ProおよびGly；  
 (b) 極性の、負に帯電した残基およびそれらの(非帯電)アミド：Asp、Asn、GluおよびGln；  
 (c) 極性の、正に帯電した残基：His、ArgおよびLys；  
 (d) 大きな脂肪族、非極性残基：Met、Leu、Ile、ValおよびCys；  
 および(e) 芳香族残基：Phe、TyrおよびTrp。他の保存的置換としては以下が挙げられる：AlaからGlyまたはSer；ArgからLys；AsnからGlnまたはHis；AspからGlu；CysからSer；GlnからAsn；GluからAsp；GlyからAlaまたはPro；HisからAsnまたはGln；IleからLeuまたはVal；LeuからIleまたはVal；LysからArg、GlnまたはGlu；MetからLeu、TyrまたはIle；PheからMet、LeuまたはTyr；SerからThr；ThrからSer；TrpからTyr；TyrからTrp；および/またはPheからVal、IleまたはLeu。

10

## 【0024】

本明細書で使用される「ドメイン」は、一般に、抗体鎖の球状領域、特に重鎖抗体の球状領域、またはこのような球状領域から本質的になるポリペプチドを指す。

## 【0025】

s d A bのアミノ酸配列および構造は、典型的には、「フレームワーク領域1」または「FR1」；「フレームワーク領域2」または「FR2」；「フレームワーク領域3」または「FR3」；および「フレームワーク領域4」または「FR4」とそれぞれ呼ばれる4つのフレームワーク領域または「FR」で構成される。フレームワーク領域は、「相補性決定領域1」または「CDR1」；「相補性決定領域2」または「CDR2」；および「相補性決定領域3」または「CDR3」とそれぞれ呼ばれる3つの相補性決定領域または「CDR」によって中断される。

20

## 【0026】

本明細書で使用される場合、「ヒト化s d A b」という用語は、天然V H H配列のアミノ酸配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基が、ヒト由来の従来の4鎖抗体のV Hドメイン中の対応する位置で生じるアミノ酸残基の1つまたは複数によって置き換えられたs d A bを意味する。これは、当技術分野で周知の方法によって行うことができる。例えば、s d A bのFRをヒト可変FRによって置き換えることができる。

30

## 【0027】

本明細書で使用される場合、「単離された」核酸またはアミノ酸は、その供給源もしくは培地、別の核酸、別のタンパク質/ポリペプチド、別の生物学的成分もしくは巨大分子、または汚染物質、不純物もしくは微量成分などの、それが通常会合しない少なくとも1つの他の成分から分離されている。

## 【0028】

「哺乳動物」という用語は、哺乳綱に属する個体として定義され、限定されないが、ヒト、飼育動物および家畜、ならびに動物園、スポーツおよびペット動物、例えばウシ、ウマ、ヒツジ、イヌおよびネコを含む。

40

## 【0029】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、薬学的投与に適合する任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。適切な担体は、この分野の標準的な参考テキストであるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されている。このような担体または希釈剤の好ましい例としては、それだけに限らないが、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)および5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。リポソーム、カチオン性脂質および非水性ビヒクル(不揮発性油など)も使用することができる。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。任意の従来の媒

50

体または薬剤が上に定義される治療剤と適合しない場合を除いて、本発明の組成物におけるその使用が熟慮される。

【0030】

「定量的イムノアッセイ」は、抗体を用いて試料中に存在する抗原の量を測定する任意の手段を指す。定量的イムノアッセイを行う方法は、それだけに限らないが、酵素結合免疫吸着測定 (ELISA)、特異的分析物標識および再捕捉アッセイ (SALRA)、液体クロマトグラフィー、質量分析、蛍光活性化セルソーティングなどを含む。

【0031】

「溶液」という用語は、溶媒および溶質を含む組成物を指し、真の溶液および懸濁液を含む。溶液の例としては、液体に溶解した固体、液体または気体、および液体に懸濁した粒子またはミセルが挙げられる。

10

【0032】

「特異性」という用語は、特定の抗原結合分子または抗原結合タンパク質分子が結合することができる様々な種類の抗原または抗原決定基の数を指す。抗原結合タンパク質の特異性は、親和性および/または結合活性に基づいて決定することができる。抗原と抗原結合タンパク質の解離の平衡定数 (KD) によって表される親和性は、抗原決定基と抗原結合タンパク質上の抗原結合部位との間の結合強度の尺度である: KDの値が低いほど、抗原決定基と抗原結合分子との間の結合強度が強くなる (あるいは、親和性をまた  $1/KD$  である親和定数 (KA) として表すこともできる)。当業者に明らかであるように、親和性を、対象となる特異的抗原に応じて決定することができる。結合活性は、抗原結合分子と抗原との間の結合強度の尺度である。結合活性は、抗原決定基と抗原結合分子上の抗原結合部位との間の親和性と抗原結合分子上に存在する関連結合部位の数の両方に関連する。抗原または抗原決定基への抗原結合タンパク質の特異的結合は、例えば Scatchard 分析および/または競合結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素免疫アッセイ (EIA) およびサンドイッチ競合アッセイなどの任意の公知の様式で決定することができる。

20

【0033】

本明細書で使用される場合、「組換え」という用語は、本発明の sdAb を作製するために使用される遺伝子工学的的方法 (例えば、クローニングおよび増幅) の使用を指す。

【0034】

「単ドメイン抗体」、「sdAb」または「VHH」は、一般に、3つの相補性決定領域によって中断された4つのフレームワーク領域で構成されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはタンパク質と定義することができる。これは、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4として表される。本発明の sdAb はまた、sdAb アミノ酸配列を含むポリペプチドまたはタンパク質を含む。典型的には、sdAb はラマなどのラクダ科動物で産生されるが、当技術分野で周知の技術を用いて合成的に作製することもできる。本明細書で使用される場合、天然重鎖抗体中に存在する可変ドメインを、これらを「VHドメイン」と呼ばれる従来の4鎖抗体中に存在する重鎖可変ドメインおよび「VLドメイン」と呼ばれる従来の4鎖抗体中に存在する軽鎖可変ドメインと識別するために、「VHHドメイン」とも呼ぶ。「VHH」および「sdAb」は、本明細書において互換的に使用される。sdAb またはポリペプチドのアミノ酸残基の番号付けは、Kabata (「Sequence of proteins of immunological interest」、US Public Health Services、NIH Bethesda、MD、出版91号) によって与えられるVHドメインについての一般的な番号付けに従う。この番号付けによると、sdAb のFR1は1~30位のアミノ酸残基を含み、sdAb のCDR1は31~36位のアミノ酸残基を含み、sdAb のFR2は36~49位のアミノ酸を含み、sdAb のCDR2は50~65位のアミノ酸残基を含み、sdAb のFR3は66~94位のアミノ酸残基を含み、sdAb のCDR3は95~102位のアミノ酸残基を含み、sdAb のFR4は103~113位のアミノ酸残基を含む。

30

40

50

## 【0035】

「合成」という用語は、インビトロの化学的または酵素的合成による作製を指す。

## 【0036】

本明細書で使用される「標的」という用語は、s d A bによって認識される任意の成分、抗原または部分を指す。「細胞内標的」という用語は、細胞内に存在する任意の成分、抗原または部分を指す。「膜貫通標的」は、細胞膜内に位置する成分、抗原または部分である。「細胞外標的」は、細胞の外側に位置する成分、抗原または部分を指す。

## 【0037】

本明細書で使用される「治療用組成物」は、医薬組成物、遺伝物質、生物製剤および他の物質などの治療効果を有することが意図される物質を意味する。遺伝物質には、遺伝的

10

## 【0038】

本明細書で使用される場合、「治療上有効量」および「予防上有効量」という句は、疾患または疾患の明白な症状の治療、予防または管理において治療上の利益を提供する量を指す。治療上有効量は、疾患、疾患の症状または疾患の素因を治す、癒す、緩和する、軽減する、変化させる、救済する、寛解させる、改善するまたはこれに影響を及ぼす目的で、疾患もしくは状態、疾患の症状、または疾患の素因を治療することができる。治療上有効な具体的な量は、通常の医師が容易に決定することができ、例えば、疾患のタイプ、患者の病歴および年齢、疾患の段階、ならびに他の治療薬の投与などの当技術分野で公知の因子に応じて変化し得る。

20

## 【0039】

本発明は、ウイルスおよび細胞内成分に対して向けられた単一ドメイン抗体(s d A b)、ならびにs d A bを含むタンパク質およびポリペプチドとタンパク質およびポリペプチドをコードするヌクレオチドに関する。本発明はまた、細胞内、経細胞および細胞外標的または抗原に対して向けられたs d A bにも関する。本発明はまた、s d A b、s d A bを含むタンパク質およびポリペプチド、ならびに組成物を含む。本発明は、予防、治療または診断目的のための組成物、s d A b、タンパク質またはポリペプチドの使用を含む。

30

## 【0040】

S d A bは、s d A bを機能的抗原結合ドメインまたはタンパク質として使用するのに非常に有利にするいくつかの独特の構造的特徴および機能的特性を有する。S d A bは軽鎖可変ドメインの非存在下で抗原に機能的に結合し、単一の比較的小さな機能的抗原結合構造単位、ドメインまたはタンパク質として機能することができる。このことがs d A bを、それ自体抗原結合タンパク質またはドメインとして機能せず、抗原に結合するために抗原結合フラグメント(F a b)または一本鎖可変フラグメント(S c F v)などの従来の抗体フラグメントと組み合わせる必要がある従来の抗体のドメインと区別する。

## 【0041】

S d A bは、当技術分野で周知の方法を用いて得ることができる。例えば、s d A bを得る1つの方法は、(a)1つまたは複数の抗原でラクダ科動物を免疫化するステップと、(b)免疫化されたラクダ科動物から末梢リンパ球を単離し、全RNAを得て、対応する相補的DNA(c D N A)を合成するステップと、(c)V H Hドメインをコードするc D N Aフラグメントのライブラリーを構築するステップと、(d)ステップ(c)で得られたV H Hドメインコードc D N Aを、P C Rを用いてメッセンジャーRNA(m R N A)に転写し、m R N Aをリボソームディスプレイフォーマットに変換し、リボソームディスプレイによってV H Hドメインを選択するステップと、(e)適切なベクター中でV H Hドメインを発現させ、場合により発現したV H Hドメインを精製するステップとを含む。

40

## 【0042】

50

本発明の s d A b を得る別の方法は、核酸合成のための技術を用いて s d A b をコードする核酸を調製し、引き続いてインピボまたはインピトロで核酸を発現させることによる。さらに、本発明の s d A b、ポリペプチドおよびタンパク質は、タンパク質、ポリペプチドまたは他のアミノ酸配列を調製するための合成または半合成技術を用いて調製することができる。

【 0 0 4 3 】

本発明の s d A b は、一般に、標的の全ての天然または合成の類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分および断片に、あるいは少なくとも本発明の s d A b が野生型標的において結合する抗原決定基またはエピトープと本質的に同じである 1 つまたは複数の抗原決定基またはエピトープを含む標的の類似体、突然変異体、対立遺伝子、部分および断片に結合する。本発明の s d A b は、このような類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分および断片に、本発明の s d A b が野生型標的に結合する親和性および特異性と同じ、またはそれより高いもしくは低い親和性および / または特異性で結合する。本発明の s d A b が、標的のいくつかの類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分および断片に結合するが、他のものには結合しないことも本発明の範囲内で熟慮される。さらに、本発明の s d A b はヒト化されていてもよく、一価または多価および / または多特異性であってもよい。さらに、本発明の s d A b は、標的タンパク質のリン酸化形態ならびに標的タンパク質の非リン酸化形態に結合することができる。s d A b は、アルブミンまたは他の巨大分子などの他の分子に連結することができる。

【 0 0 4 4 】

さらに、s d A b が多価であること、すなわち、s d A b が、標的の 2 つ以上の異なるエピトープに対して向けられる 2 つ以上のタンパク質またはポリペプチドを有することができることが本発明の範囲内である。このような多価 s d A b において、タンパク質またはポリペプチドは、例えば、同じエピトープ、実質的に等価のエピトープ、または異なるエピトープに対して向けられ得る。異なるエピトープは、同じ標的上に位置してもよいし、2 つ以上の異なる標的上に存在してもよい。

【 0 0 4 5 】

本発明の 1 つまたは複数の s d A b の配列が 1 つまたは複数のリンカー配列と接続または連結され得ることも熟慮される。リンカーは、例えば、セリン、グリシンおよびアラニンの組み合わせを含むタンパク質配列であり得る。

【 0 0 4 6 】

記載される使用に適している限り、本発明の s d A b の部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子および / または誘導体を使用することも本発明の範囲内である。

【 0 0 4 7 】

本発明の s d A b は主として治療的および / または診断的使用を意図しているため、これらは哺乳動物、好ましくはヒトの標的に対して向けられている。しかしながら、本明細書に記載される s d A b は、他の種由来の標的、例えば、霊長類または他の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタまたはイヌ）、特に、標的に関連する疾患に関連する疾患および障害の動物モデルの 1 つまたは複数種由来の標的と交差反応性であることが可能である。

【 0 0 4 8 】

別の態様では、本発明は、本発明の s d A b をコードする核酸に関する。このような核酸は、例えば、遺伝子構築物の形態であり得る。

【 0 0 4 9 】

別の態様では、本発明は、本発明の s d A b を発現するもしくは発現することができる、および / または本発明の s d A b をコードする核酸を含む宿主または宿主細胞に関する。s d A b の配列は、任意の生物のゲノムに挿入して遺伝子組換え生物（GMO）を作製するために使用することができる。例としては、それだけに限らないが、植物、細菌、ウイルスおよび動物が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

本発明はさらに、本発明の s d A b、s d A b をコードする核酸、このような s d A b を発現するまたは発現することができる宿主細胞、s d A b を含有する製品および組成物を調製または作製する方法に関する。

【 0 0 5 1 】

本発明はさらに、本明細書に記載される s d A b、s d A b をコードする核酸、宿主細胞、製品および組成物の適用および使用に関する。このような製品または組成物は、例えば、疾患を治療もしくは予防するための医薬組成物、または診断用途のための製品もしくは組成物であり得る。s d A b は、s d A b の血清および組織レベルを測定するための種々のアッセイ、例えば E L I S A アッセイおよび質量分析アッセイに使用することができる。

10

【 0 0 5 2 】

別の態様では、本発明の 1 つまたは複数の s d A b をコードする核酸を、生物のゲノムに挿入して疾患を治療または予防することができる。

【 0 0 5 3 】

本発明は、一般に、s d A b、ならびに予防、治療および/または診断目的に使用され得るこのような s d A b の 1 つもしくは複数を含むまたは 1 つもしくは複数から本質的になるタンパク質またはポリペプチドに関する。

【 0 0 5 4 】

本明細書に詳述される方法および組成物を使用して、本明細書に記載される疾患を治療することができ、またこれを本明細書に記載されているまたは当業者に公知の任意の投与量および/または製剤、ならびに本明細書に記載されているまたは当業者に公知の任意の投与経路を用いて使用することができる。

20

【 0 0 5 5 】

本発明の s d A b を、ウイルスまたは異常な細胞タンパク質によって引き起こされる疾患の治療および予防に使用することができる。本発明の s d A b を、疾患の治療および予防に使用することもできる。本発明の s d A b を使用して、細胞内分子の過剰発現がある場合に疾患を標的化することができる。これらを使用して、感染細胞内の細胞内ウイルスタンパク質を標的とすることによって、ウイルス感染症を治療することもできる。ウイルスタンパク質、例えば H I V - 1 逆転写酵素の産生を遮断することで、ウイルスのライフサイクルを遮断することができる。

30

【 0 0 5 6 】

本発明の s d A b はまた、エボラ V P 2 4 のなどの細胞内ウイルスタンパク質を標的とし、したがってエボラが宿主の抗ウイルス免疫応答を遮断する能力を遮断することもできる。

【 0 0 5 7 】

本発明の s d A b を 1 種または複数の化合物と共に使用することができる。例えば、本発明の s d A b を、例えばクルクミン、レスベラトロール、ククルピタシン A、B、E、I、Q、フラボピリドール、デオキシテトランゴマイシン、シクロペンテノン誘導体、N - アシルホモセリンラクトン、インディルピン誘導体、メイソインジゴ、チロホスチン、白金含有化合物（例えば、I S 3 - 2 9 5）、ペプチド模倣薬、アンチセンスオリゴヌクレオチド、S 3 I - 2 0 1、ホスホチロシントリペプチド誘導体、H I V プロテアーゼ阻害剤（例えば、ネルフィナビル、インジナビル、サキナビルおよびリトルナビル）、J S I - 1 2 4、X p Y L、A c - p Y L P Q T V - N H 2、I S S 6 1 0、C J - 1 3 8 3、ピリメタミン、メトホルミン、アチプリモド、S 3 I - M 2 0 0 1、S T X - 0 1 1 9 ; N - [ 2 - ( 1 , 3 , 4 - オキサジアゾリル ) ] - 4 - キノリンカルボキサミド誘導体、S 3 I - 1 7 5 7、L Y 5 ; 5 , 8 - ジオキソ - 6 ( ピリジン - 3 - イルアミノ ) - 5 , 8 , - ジヒドロ - ナフタレン - 1 - スルホンアミド、ウィサシンスチン ( w i t h a c i n s t i n )、S t a t t i c、S T A - 2 1、L L L - 3、L L L 1 2、X Z H - 5、S F - 1 0 6 6、S F - 1 0 8 7、1 7 o、クリプトタンシノン、F L L 3 2、F L L 6 2、C 1 8 8 - 9、B P - 1 1 0 8 および B P - 1 0 7 5、ガリエララクトン、J Q 1

40

50

、5、15DPP、WP1066、ニクロサミド、SD1008、ニフロキサジド、クリプトタンシノン、BBIKノンおよびルキソリチニブホスフェートなどのJAK/STAT阻害剤と共に使用することができる。1種または複数の化合物は、治療応答を増加させ、本発明のsdAbの有効性を増強することができる。さらに、sdAbの有効性は、これをペプチド、ペプチド模倣薬および他の薬物（例えば、それだけに限らないが、シメチジン、アトルバスタチン、セレコキシブ、メトホルミンおよびシメチジンなど）と組み合わせることによって増加させることができる。

【0058】

本発明の1つまたは複数のsdAbを組み合わせることができること、または本発明のsdAbを他のsdAbと組み合わせることも熟慮される。

10

【0059】

本発明の一定のsdAbは、sdAb上の追加の標的化タンパク質配列の助けを借りずに、また細胞表面受容体に結合し、細胞膜を通過する外因性化合物の助けを借りずに、細胞膜を通過し、細胞に侵入することができることが熟慮される。

【0060】

細胞膜を通過した後、これらのsdAbは、膜貫通型または細胞内の分子または抗原を標的化することができる。これらの標的は、例えば、タンパク質、炭水化物、脂質、核酸、突然変異タンパク質、ウイルスタンパク質およびプリオンであり得る。sdAb標的は、酵素、細胞の構造タンパク質、細胞膜分子の細胞内部分、細胞小器官の膜内の分子、任意のタイプのRNA分子、DNAまたは染色体の任意の領域、メチル化または非メチル化核酸、細胞の合成機構内の部分的に組み立てられた分子、セカンドメッセンジャー分子、および細胞シグナル伝達機構内の分子として機能し得る。標的には、細胞質、核、細胞小器官および細胞膜中の全ての分子が含まれ得る。細胞膜における分泌または配置を定められた分子は、細胞を離れる前に細胞質内で標的化され得る。

20

【0061】

sdAb標的は、ヒト、動物、植物、真菌、寄生虫、原生生物、細菌、ウイルス、プリオン、原核細胞および真核細胞に存在し得る。本発明のsdAbによって標的化され得る細胞間および細胞内シグナル伝達分子ならびにタンパク質群のいくつかの例は以下である：発がん遺伝子産物、ホルモン、サイトカイン、成長因子、神経伝達物質、キナーゼ（チロシンキナーゼ、セリンキナーゼおよびスレオニンキナーゼを含む）、ホスファターゼ、ユビキチン、環状ヌクレオチド、シクラーゼ（アデニリルおよびグアニリル）、Gタンパク質、ホスホジエステラーゼ、GTPアーゼスーパーファミリー、免疫グロブリン（抗体、Fabフラグメント、バインダー、sdAb）、免疫グロブリンスーパーファミリー、イノシトールリン酸脂質、ステロイド受容体、カルモジュリン、CD群（例えば、CD4、CD8、CD28等）、転写因子、TGF-、TNF- および、TNFリガンドスーパーファミリー、ノッチ受容体シグナル伝達分子、ヘッジホッグ受容体シグナル伝達分子、Wnt受容体シグナル伝達分子、トール様受容体シグナル伝達分子、カスパーゼ、アクチン、ミオシン、ミオスタチン、12-リボキシゲナーゼ、15-リボキシゲナーゼ、リボキシゲナーゼスーパーファミリー、逆転写酵素、ウイルスおよびそれらのタンパク質、アミロイドタンパク質、コラーゲン、Gタンパク質共役受容体、突然変異した正常タンパク質、プリオン、Ras、Raf、Myc、Src、BCR/ABL、MEK、Erk、Mos、Tpl2、MLK3、TAK、DLK、MKK、p38、MAPK、MEKK、ASK、SAPK、JNK、BMK、MAP、JAK、PI3K、シクロオキシゲナーゼ、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6、Myc、p53、BRAF、NRAS、KRAS、HRASおよびケモカイン。

30

40

【0062】

HIVは、ヒトで後天性免疫不全症候群（AIDS）を引き起こすレトロウイルスである。AIDSは、感染した個体の免疫系の進行性の障害をもたらし、これが生命を脅かす日和見感染症およびがんの発症をもたらす。HIV感染後の平均生存期間は、治療なしで

50

9 ~ 11年と推定される。

【0063】

HIVは一本鎖、プラス鎖、エンベロープRNAウイルスとして伝達される。標的細胞に侵入すると、ウイルスRNAゲノムは、ウイルス粒子中のウイルスゲノムとともに輸送されるウイルスコード逆転写酵素(RT)によって二本鎖DNAに逆転写される。RTはRNA依存性DNAポリメラーゼであり、RNAアーゼH活性も有する。次いで、得られたウイルスDNAが宿主細胞核に導入させ、ウイルスコードインテグラーゼおよび宿主補因子によって細胞DNAに組み込まれる。いったん組み込まれると、ウイルスは数ヵ月または数年間潜伏する可能性がある。あるいは、ウイルスを転写して、新しいRNAゲノムおよび新しいウイルス粒子として細胞からパッケージングおよび放出されるウイルスタンパク質を産生することができる。

10

【0064】

HIV-1とHIV-2という2種類のHIVが特徴付けられている。HIV-1は毒性が強く、感染性が強く、世界中のHIV感染症の大部分の原因である。HIV-2は主に西アフリカに限定されている。

【0065】

HIV-1逆転写酵素を標的化するために抗HIV RT sdAbを開発した。抗HIV-1 RT sdAbは、単独で、または他のレトロウイルス剤と組み合わせてHIVに感染した個体を首尾よく治療することができる。当技術分野で周知の方法を用いて、組換えHIV-1逆転写酵素タンパク質(Creative Biomart, Shirley, NY)(配列番号1)を使用して、HIV-1 RTのエピトープに対して向けられた、またはHIV-1 RTのエピトープに結合することができるsdAbを作製した。

20

【0066】

組換えHIV-1逆転写酵素タンパク質のラクダの免疫化に用いたタンパク質配列(配列番号1)はP I S P I E T V P V K L K P G M D G P K V K Q W P L T E E K I K A L V E I C A E L E E E G K I S R I G P E N P Y N T P V F A I K K K D S T K W R K L V D F R E L N K R T Q D F W E V Q L G I P H P A G L K K K K S V T V L D V G D A Y F S I P L D E D F R K Y T A F T I P S T N N E T P G T R Y Q Y N V L P Q G W K G S P A I F Q S S M T K I L E P F R K Q N P D I V I Y Q Y V D D L Y V G S D L E I G Q H R T K V E E L R Q H L W R W G F Y T P D K K H Q K E P P F L W M G Y E L H P D K W T V Q P I V L P E K D S W T V N D I Q Kであった。

30

【0067】

免疫化の結果、いくつかのsdAbが得られ、これをスクリーニングした。抗HIV-1 RT sdAbのDNA配列を以下に列挙する：

【0068】

HIV1-1(配列番号2): 5' - g a t g t g c a g c t g g t g g a g t c t g g g g a g g c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t g a g a c t c t c c t g t g c a g c c t c t g t t t a c a g c t a c a a c a c a a a c t g c a t g g g t t g g t t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g a g c g c g a g g g g g t c g c a g t t a t t t a t g c t g c t g g t g g a t t a a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c c a g g a g a a t g g c a a g a a t a c g g t g t a c c t g a c g a t g a a c c g c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t g c g g c a a a g c g a t g g t g t a g t a g c t g g a a t c g c g g t g a g g a g t a t a a c t a c t g g g c c a g g g g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3'

40

【0069】

HIV1-2(配列番号3): 5' - c a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t g g g g a g g c t c g g t g c a g g c t g g a g a c t c t c t g a g a c t c t c c t g t g c a g c c t c t g g a a a c a c t g c c a g t a g g t t c t c c a t

50

g g g c t g g t t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g a g c g c g a g g g g  
g t c g c g g c t a t t t c t g c t g g t g g t a g g c t t a c a t a c t a t g  
c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c c g a g a c a a  
c g c c a a g a a c a c g c t g t a t c t g g a c a t g a a c a a c c t g a a a  
c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t g c c g c a a t t a g t g  
a c c g g a t g a c t g g t a t t c a g g c t c t t g c g g c t c t a c c c a g  
a c t t c g c c c a g a a g a c t a c g g t a a c t g g g g c c a g g g g a c c  
c t g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

【0070】

H I V 1 - 7 ( 配列番号 4 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t g  
g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t c t  
c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c g a  
t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a a g  
g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g t g  
t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t  
c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t g  
a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t g  
c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g t a  
c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g g g  
a c c c t g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

10

20

【0071】

H I V 1 - 8 ( 配列番号 5 ) : 5 ' - c a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t g  
g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t c t  
c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c g a  
t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a a g  
g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g t g  
t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t  
c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t g  
a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t g  
c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g t a  
c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g c c a g g g g  
a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

30

【0072】

H I V 1 - 6 ( 配列番号 6 ) : 5 ' - c a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t g  
g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t c t  
c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c g a  
t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a a t a t c c a g g a a a g  
g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g t g  
t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t  
c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t g  
a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t g  
c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g t a  
c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g c c a g g g g  
a c c c t g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

40

【0073】

H I V 1 \_ 2 8 ( 配列番号 7 ) : 5 ' - a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t g  
g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t c t  
c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c g a  
t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a a g  
g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g t g

50

t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t  
 c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t g  
 a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t g  
 c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g t a  
 c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g c c a g g g g  
 a c c c t g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

【0074】

H I V 1 - 2 1 ( 配 列 番 号 8 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t  
 g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t c  
 t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c g  
 a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a a  
 g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g t  
 g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a  
 t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t  
 g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t  
 g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g t  
 a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g g  
 g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

10

【0075】

H I V 1 - 3 7 ( 配 列 番 号 9 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t  
 g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t c  
 t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c g  
 a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a a  
 g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g t  
 g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a  
 t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t  
 g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t  
 g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g t  
 a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g g  
 g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

20

30

【0076】

H I V 1 - 3 ( 配 列 番 号 1 0 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t  
 g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t c  
 t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c g  
 a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a a  
 g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g t  
 g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a  
 t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t  
 g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t  
 g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g t  
 a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g g  
 g a c c c a g g t c a c t g t c t c c t c a - 3 '

40

【0077】

H I V 1 - 5 ( 配 列 番 号 1 1 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t  
 g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t c  
 t c c t g t a a a g g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c g  
 a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a a  
 g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c c a t t a a t a t t c g t a a t a g t  
 g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a  
 t c t c c c a a g a c a a c g c t a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t

50

g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t  
g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g t  
a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g g  
g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

【 0 0 7 8 】

H I V 1 - 1 0 ( 配 列 番 号 1 2 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t  
c t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
g a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a  
a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
t g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c  
a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
t g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
t a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g  
g g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

10

【 0 0 7 9 】

H I V 1 \_ 2 9 ( 配 列 番 号 1 3 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c a g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t  
c t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
g a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a  
a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
t g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c  
a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
t g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
t a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g  
g g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

20

【 0 0 8 0 】

H I V 1 \_ 3 2 ( 配 列 番 号 1 4 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t  
c t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
g a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a  
a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
t g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c  
a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
t g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
t a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g  
g g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

30

40

【 0 0 8 1 】

H I V 1 - 9 ( 配 列 番 号 1 5 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c t  
g g g g g a g g c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t g a g a c t c  
t c c t g t g c a g c c t c t g t t t a c a g c t a c a a c a c a a a c t g c a  
t g g g t t g g t t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g a g c g c g a g g g  
g g t c g c a g t t a t t t a t g c t g c t g g t g g a t t a a c a t a c t a t  
g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c c a g g a g a  
a t g g c a a g a a c a c g g t g t a c c t g a c g a t g a a c c g c c t g a a  
a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t g c g g c a a a g c g a  
t g g t g t a g t a g c t g g a a t c g c g g t g a g g a g t a t a a c t a c t

50

g g g g c c a g g g g a c c c a g g t c a c t g t c t c c t c a - 3 ' ,

【 0 0 8 2 】

H I V 1 - 1 6 ( 配 列 番 号 1 6 ) : 5 ' - c a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g g c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t g a g a c t  
c t c c t g t g c a g c c t c t g g a a a c a c c t a c a g t a g t a g c t a c  
t g c a t g g g c t g g t t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g a c c g c g  
a g g g g g t c g c g c g t a t t t t c a c t c g a a g t g g t a c c a c a t a  
c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t t t c c c g t  
g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t g a a c a g c c  
t g a a a c c t g a a g a c g c t g c c a t g t a c t a c t g t g c g g c a g c  
c c a g g g g g g t g c c t g c a t t t c g t t t a c t t c g t t c g c g a a g  
a a t t t c g t g t a c c g g g g c c a g g g g a c c c t g g t c a c t g t c t  
c c t c a - 3 ' ,

10

【 0 0 8 3 】

H I V 1 - 1 3 ( 配 列 番 号 1 7 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t  
c t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
g a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a  
a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
t g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c  
a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
t g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
t a c g g a a t a c g g t c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g  
g g a c c c t g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 ' ,

20

【 0 0 8 4 】

H I V 1 \_ 3 5 ( 配 列 番 号 1 8 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t  
c t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
g a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a  
a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
t g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c  
a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
t g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
t a c g g a a t a c g g t c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g  
g g a c c c t g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 ' ,

30

【 0 0 8 5 】

H I V 1 - 1 1 ( 配 列 番 号 1 9 ) : 5 ' - c a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t  
c t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
g a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a  
a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
t g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c  
a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
t g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
t a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g  
g g a c c c a g g t c a c t g t c t c c t c a - 3 ' ,

40

【 0 0 8 6 】

50

H I V 1 \_\_ 2 2 ( 配 列 番 号 2 0 ) : 5 ' - c a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t  
c t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
g a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a  
a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
t g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c  
a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
t g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
t a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g  
g g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 ' 10

【 0 0 8 7 】

H I V 1 - 4 ( 配 列 番 号 2 1 ) : 5 ' - c a t g t g c a g c t g g t g g a g t c t  
g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t c  
t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c g  
a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a a  
g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g t  
g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a  
t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t  
g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g t 20  
g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g t  
a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g g  
g a c c c t g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 ' 20

【 0 0 8 8 】

H I V 1 \_\_ 3 8 ( 配 列 番 号 2 2 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t  
c t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
g a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a  
a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
t g t c a c a t a c t a t g c c a a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c 30  
a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
t g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
t a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t g a c t a c t g g g g t g a g g  
g g a c c c t g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 ' 30

【 0 0 8 9 】

H I V 1 \_\_ 2 3 ( 配 列 番 号 2 3 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t  
c t c c t g t a a a g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
g a t a t c a g a t c t a t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a 40  
a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
t g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c  
a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
t g g a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
t a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g  
g g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 ' 40

【 0 0 9 0 】

H I V 1 \_\_ 2 5 ( 配 列 番 号 2 4 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
t g g g g g a g a c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t t c a a c t 50

c t c c t g t a a g g c c t c t g g a t a c a c c t a c a a t a g t a g a g t c  
 g a t a t c a g a t c t g t g g g c t g g t t c c g c c a g t a t c c a g g a a  
 a g g a g c g c g a g g g g g t c g c t a c t a t t a a t a t t c g t a a t a g  
 t g t c a c a t a c t a t g c c g a c t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c  
 a t c t c c c a a g a c a a c g c c a a g a a c a c g g t g t a t c t g c a a a  
 t g a a c g c c c t g a a a c c t g a g g a c a c t g c c a t g t a c t a c t g  
 t g c g t t g t c a g a c a g a t t c g c g g c g c a g g t a c c t g c c a g g  
 t a c g g a a t a c g g c c c t c t g a c t a t a a c t a c t g g g g t g a g g  
 g g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

【0091】

10

抗HIV-1 RT sdAbのアミノ酸配列を以下に示す：

【0092】

HIV1-1 (配列番号25) : DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAA  
 SVYSYNTNC MGWFRQAPGKEREGVAVIYAAGGLTTYADS  
 VKGRFTISQENGKNTVYLTMNRLKPEDTAMY YCAA KRWC S  
 SWNRGEEYNYWGQGTQVTVSS

【0093】

HIV1-2 (配列番号26) : QVQLVESGGGSVQAGDSLRLSCAA  
 SGNTASRF SM GWFRQAPGKEREGVAAISAGGLTTYADS  
 VKGRFTISRDN AKNTLYLDMNNLKPEDTAMY YCAA ISDRM  
 TGIQAL AALPRLRPEDYGNWGQGTLVTVSS

20

【0094】

HIV1-9 (配列番号27) : EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAA  
 SVYSYNTNCM GWFRQAPGKEREGVAVIYAAGGLTTYADS  
 VKGRFTISQENGKNTVYLTMNRLKPEDTAMY YCAA KRWC S  
 SWNRGEEYNYWGQGTQVTVSS

【0095】

HIV1-16 (配列番号28) : QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCA  
 ASGNTYSSSY CMGWFRQAPGKDREGVARIFTRSGTTYA  
 DSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNLSLKPEDAAMY YCAA AQG  
 GACISFTSFAKNFVYRGQGTLVTVSS

30

【0096】

HIV1-27 (配列番号29) : EVQLGESGGGSVQAGGSLRLSCA  
 ASVYSYTTNCM GWFRQAPGKEREGVAVIYSAGGLTTYAD  
 SVKGRFTISQDNGKNTVYLTMNRLKPEDTAMY YCAA KRWC  
 SSWNRGEEYNYWGQGTQVTVSS

【0097】

HIV1-30 (配列番号30) : QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCA  
 ASVYSYNTN CMGWFRQAPGKEREGAAVIYAAGGLTTYAD  
 SVKGRFTISQENGKNTVYLTMNRLKPEDTAMY YCAA KRWC  
 SSWNRGEEYNYWGQGTQVTVSS

40

【0098】

HIV1-21 (配列番号31) : EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK  
 ASGYTYNSR VDIRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT  
 YYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNALKPEDTAMY YCAL  
 SDRFAAQVPARYGIRPSDYN YWGE GTQVTVSS

【0099】

HIV1-4 (配列番号32) : HVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKA  
 SGYTYNSR VDIRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTY  
 YADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNALKPEDTAMY YCAL S

50

DRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTLVTVSS

【0100】

HIV1 - 6 (配列番号33) : QVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKA  
SGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTY  
YADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KP EDTAMYYCAL S  
DRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTLVTVSS

【0101】

HIV1 - 7 (配列番号34) : EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKA  
SGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTY  
YADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KP EDTAMYYCAL S  
DRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTLVTVSS

10

【0102】

HIV1 - 8 (配列番号35) : QVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKA  
SGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTY  
YADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KP EDTAMYYCAL S  
DRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTQVTVSS

【0103】

HIV1 - 11 (配列番号36) : QVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK  
ASGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT  
YYADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KP EDTAMYYCAL  
SDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTQVTVSS

20

【0104】

HIV1 - 13 (配列番号37) : EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK  
ASGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT  
YYADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KP EDTAMYYCAL  
SDRFAAQVPARYGIRSSDYNWYWGEGTLVTVSS

【0105】

HIV1 - 23 (配列番号38) : EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK  
ASGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT  
YYADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMDAL KP EDTAMYYCAL  
SDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTQVTVSS

30

【0106】

HIV1 - 24 (配列番号39) : HVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK  
ASGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT  
YYADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KP EDTAMYYCAL  
SDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTLVTVSS

【0107】

HIV1 - 25 (配列番号40) : EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK  
ASGYTYNSRVD IRSVGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT  
YYADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KP EDTAMYYCAL  
SDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTQVTVSS

40

【0108】

HIV1 - 31 (配列番号41) : DVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK  
ASGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT  
YYADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KP EDTAMYYCAL  
SDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTQVTVSS

【0109】

HIV1 - 38 (配列番号42) : EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK  
ASGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT  
YYANSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KP EDTAMYYCAL

50

SDRFAAQVPARYGIRPSDYDYWGEGLVTVSS

【0110】

HIV1-39(配列番号43):EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK  
ASGYTYNSRVD IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT  
YYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPEDTAMYYCAL  
SDRFAAQVPTRYGIRPSDYNYWGQGTQVTVSS

【0111】

本発明の抗HIV-1 RT sdAbの1つまたは複数のドメインに対する1つまたは複数のマウスモノクローナル抗体を作製することができる。マウスモノクローナル抗体は、当業者に知られている方法によって作製することができ、例えば、マウスモノクローナル抗体は、マウスハイブリドーマによって作製することができる。マウスモノクローナル抗体は、診断アッセイに使用することができ、例えば、抗体を、患者由来の試料中に存在する抗HIV-1 RT sdAbの量を測定するために、ELISAまたは質量分析アッセイなどのイムノアッセイに使用することができる。

10

【0112】

SdAbを、組換えアラキドン酸12-リポキシゲナーゼ(ALOX12)に対しても作製した。ALOX12は、血小板型12-リポキシゲナーゼ、アラキドン酸酸素12-酸化還元酵素、12-リポキシゲナーゼ、12-リポキシゲナーゼ、C-12リポキシゲナーゼ、ロイコトリエンA4シンターゼおよびLTA4シンターゼとしても知られている。ALOX12は、アラキドン酸代謝に關与するリポキシゲナーゼ型酵素である。ALOX12は、食事誘発型および/または遺伝子誘発型糖尿病、脂肪細胞/組織機能不全および肥満の発症および合併症に關与している。ALOX12はまた、血管収縮、拡張、圧力、リモデリングおよび血管新生を調節すると考えられている。ALOX12の阻害は、血管形成の発達を防止し、したがってALOX12は、粥状動脈硬化、脂肪性肝炎ならびに他の関節炎およびがん疾患を促進する血管新生を低減するための標的である。ALOX12の量の増加は、アルツハイマー病の発症に寄与し得る。

20

【0113】

本発明は、ALOX12タンパク質に対して向けられたsdAb、タンパク質およびポリペプチドを提供する。

【0114】

本発明の抗ALOX12 sdAbおよびポリペプチドを、糖尿病、脂肪細胞機能不全、肥満、粥状動脈硬化、脂肪性肝炎、関節炎およびがんなどのALOX12に關連するおよび/またはALOX12によって媒介される疾患および障害の予防および/または治療に使用することができることが熟慮される。

30

【0115】

組換えヒトALOX12タンパク質を使用して、ALOX12のエピトープに対して向けられた、またはこれに結合することができるsdAbを作製した。抗ALOX12 sdAbを作製するために、組換えヒトALOX12を大腸菌(*Escherichia coli*)で発現させ、標的抗原として使用した。

【0116】

ラクダの免疫化に使用した組換えALOX12タンパク質配列(配列番号44)は:  
MGRYRIRVATGAWLFSGSYNRVQLWLVGTRGEAELELQL  
RPARGEEEEFDHDVAEDLGLLQFVRLRKHHWLVD DAWFCD  
RITVQGP GACAEVAFPCYRWVQGEDILSLPEGTARLP GDN  
ALDMFQKHREKELKDRQQIYCWATWKEGLPLTIAADRKDD  
LPPNMRFH E EKRLDFEWTLKAGALEMALKRVY TLLSSWNC  
LEDFDQIFWGQKSA LAEKVRQCWQDDELFSYQFLNGANPM  
LLRRSTSLPSRLVLP SGMEELQAQLEKELQNGSLFEADFI  
LLDGI PANVIRGEKQYLAAPLVMLKMEPNGKLQPMVIQIQ  
PPNPSSPTPTLFLPSDPPLAWLLAKSWVRNSDFQLHEIQY

40

50

H L L N T H L V A E V I A V A T M R C L P G L H P I F K F L I P H I R Y T M E I  
 N T R A R T Q L I S D G G I F D K A V S T G G G G H V Q L L R R A A A Q L T Y C  
 S L C P P D D L A D R G L L G L P G A L Y A H D A L R L W E I I A R Y V E G I V  
 H L F Y Q R D D I V K G D P E L Q A W C R E I T E V G L C Q A Q D R G F P V S F  
 Q S Q S Q L C H F L T M C V F T C T A Q H A A I N Q G Q L D W Y A W V P N A P C  
 T M R M P P P T T K E D V T M A T V M G S L P D V R Q A C L Q M A I S W H L S R  
 R Q P D M V P L G H H K E K Y F S G P K P K A V L N Q F R T D L E K L E K E I T  
 A R N E Q L D W P Y E Y L K P S C I E N S V T I

であった。

【0117】

10

免疫化の結果、いくつかの s d A b が得られ、これをスクリーニングした。s d A b の DNA 配列を以下に列挙する：

【0118】

A L O X \_ \_ 2 1 ( 配列番号 4 5 ) : 5 ' - g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
 t g g g g g a g g t t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t g a g g a t  
 c t c c t g t a c a g c c t c t g g a t t c a c t t t t g a t g a c a c t g a c  
 a t g g g c t g g t a c c g c c a g a c t c t a g g a a a t g g g t g c g a g t  
 t g g t t t c t c a g a t t a g t a a t g a t g g t a g t a c a t t c t a t a g  
 a g a t t c c g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c t g g g a c c g c  
 g t c a a c a a c a c g g t g t a t c t g c a a a t g a g c g c c c t g a g a c  
 c t g a g g a c a c g g c c a t g t a t t a c t g c a a t a t c a a c g g g t g  
 t a g g a g a c c c t c g t a c a a t c t t c a c t t g a a c g c a t g g g g c  
 c a g g g g a c a c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

20

【0119】

A L O X \_ \_ 4 1 ( 配列番号 4 6 ) : 5 ' - c a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
 t g g g g g a g g c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t g a c a c t  
 g t c c t g t g t a g c c t c t g g a t a c g g c t a c a g t g c c a c g t g c  
 a t g g g c t g g t t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g a g c g c g a g g  
 g g g t c g c g t c t a t t t c a c c t t a t g g t g t t a g a a c c t t c t a  
 t g c c g a c t c c g c g a a a g g c c g a t t c a c c g t c t c c c g a g a c  
 a a c g c c a a g a a c a c g c t g t a t c t g c a a a t g a a c a g c c t g a  
 a a c c t g a g g a c a c g t c c g t g t a c t a c t g t g c g g c c g g t t c  
 g g g c g t t g g t g t t t g t t c a c t t t c g t a t c c a t a c a c c t a c  
 t g g g g c c a g g g g a c c c a g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

30

【0120】

A L O X \_ \_ 4 3 ( 配列番号 4 7 ) : 5 ' - c a g g t g c a g c t g g t g g a g t c  
 t g g g g g a g g c t c g g t g c g g g c t g g a g a g t c t c t g a g a c t  
 c t c c t g t g t a g c c t c t a g a t c c a t c t a t g t t t g g t a c t g c  
 a t g g g c t g g t t c c g c c a g g c t g c a g g g a a g g a g c g c g a g g  
 g g g t c g g a a g t a t g t t c g t t g g t g g c g g t a g g a c a t a t t a  
 t g a c g a c t c c g t c a a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c c a a g a c  
 a a g g c c a a g a a c a c g c t g t a t c t g c a a a t g g a c a a c c t g g  
 c a c c t g a a g a c a c t g c c a t g t a t t a c t g t g c g g c t g g g c g  
 c t g c g g t g g c a a c t g g c t g a g a a g c a a t g c t t t c g a c a a a  
 t g g g g c c a g g g g a c a c t g g t c a c c g t c t c c t c a - 3 '

40

【0121】

A L O X \_ \_ 4 6 ( 配列番号 4 8 ) : 5 ' - g a t g t g c a g c t g g t g g a g t c  
 t g g g g g a g g c t c g g t g c a g g c t g g a g g g t c t c t g a g a c t  
 c t c c t g t g c a g c c a c t g g a a a c a c c t a c a t t a g c c g c t g c  
 a t g g g c t g g t t c c g c c a g c c t c c a g g g a a g g a g c g c g a g g

50

t g g t c g c a c g t a t t t a t a c c g a c t c t g g t a a t a c a t a c t a  
t c c c g a c g c c g t g g a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c c a a g a c  
a a c g c c a a g a a c a c g a t a t a t c t g c a a a t g a a c a g c c t g a  
a a c c t g a c g a c a c c g c c g t g t a c t a c t g t g t g c t c t c a g a  
g g c c g t c t g t a c a a a g a a c c t g g g g a c t t t c g t t a c t g g  
g g c c a g g g g a c c c a g g t c a c t g t c t c c t c a - 3 '

【 0 1 2 2 】

作製した抗 A L O X s d A b のタンパク質配列は以下の通りである：

【 0 1 2 3 】

A L O X \_ 2 1 ( 配列番号 4 9 ) : E V Q L V E S G G G S V Q A G G S L R I S C T  
A S G F T F D D T D M G W Y R Q T L G N G C E L V S Q I S N D G S T F Y R D S  
V K G R F T I S W D R V N N T V Y L Q M S A L R P E D T A M Y Y C N I N G C R R  
P S Y N L H L N A W G Q G T Q V T V S S

10

【 0 1 2 4 】

A L O X \_ 4 1 ( 配列番号 5 0 ) : Q V Q L V E S G G G S V Q A G G S L T L S C V  
A S G Y G Y S A T C M G W F R Q A P G K E R E G V A S I S P Y G V R T F Y A D  
S A K G R F T V S R D N A K N T L Y L Q M N S L K P E D T S V Y Y C A A G S G V  
G V C S L S Y P Y T Y W G Q G T Q V T V S S

【 0 1 2 5 】

A L O X \_ 4 3 ( 配列番号 5 1 ) : Q V Q L V E S G G G S V R A G E S L R L S C V  
A S R S I Y V W Y C M G W F R Q A A G K E R E G V G S M F V G G G R T Y Y D D  
S V K G R F T I S Q D K A K N T L Y L Q M D N L A P E D T A M Y Y C A A G R C G  
G N W L R S N A F D K W G Q G T L V T V S S

20

【 0 1 2 6 】

A L O X \_ 4 6 ( 配列番号 5 2 ) : D V Q L V E S G G G S V Q A G G S L R L S C A  
A T G N T Y I S R C M G W F R Q P P G K E R E V V A R I Y T D S G N T Y Y P D  
A V E G R F T I S Q D N A K N T I Y L Q M N S L K P D D T A V Y Y C V L S E A V  
C T K E P G D F R Y W G Q G T Q V T V S S

【 0 1 2 7 】

本発明の抗 A L O X 1 2 s d A b の 1 つまたは複数のドメインに対する 1 つまたは複  
数のマウスモノクローナル抗体を作製することができる。マウスモノクローナル抗体は、  
当業者に知られている方法によって作製することができ、例えば、マウスモノクローナル  
抗体は、マウスハイブリドーマによって作製することができる。マウスモノクローナル抗  
体は、診断アッセイに使用することができ、例えば、抗体を、患者由来の試料中に存在す  
る抗 A L O X 1 2 s d A b の量を測定するために、E L I S A または質量分析アッセイ  
などのイムノアッセイに使用することができる。

30

【 0 1 2 8 】

エボラウイルス疾患 ( E V D ) およびエボラ出血熱 ( E H F ) としても知られているエ  
ボラは、エボラウイルスによって引き起こされるヒトおよび他の霊長類のウイルス性出血  
熱である。この疾患は死亡リスクが高く、感染した人の 2 5 ~ 9 0 % が、典型的には症状  
が現れてから 6 ~ 1 6 日で死亡する。

40

【 0 1 2 9 】

エボラは、感染した個体の先天免疫系の適切な機能を妨害する。エボラタンパク質は、  
インターフェロン -  $\alpha$ 、インターフェロン -  $\beta$  およびインターフェロン  $\gamma$  などのインター  
フェロンタンパク質を産生してこれに应答する細胞の能力を妨害することによって、ウイ  
ルス感染症に対する免疫系の应答を弱める。エボラの構造タンパク質、V P 2 4 および V  
P 3 5 が、この妨害において重要な役割を果たす。V 2 4 タンパク質は、宿主細胞の抗ウ  
イルスタンパク質の産生を遮断する。宿主の免疫应答を阻害することにより、エボラは身  
体全体に急速に広がる。

【 0 1 3 0 】

50

本明細書に記載されるように、抗VP24 sdAbをエボラのVP24タンパク質を標的化するために開発した。抗VP24 sdAbは、単独で、または他のレトロウイルス剤と組み合わせてエボラに感染した個体を首尾よく治療することができる。当技術分野で周知の方法を用いて、組換えVP24タンパク質（配列番号53）を使用して、VP24のエピトープに対して向けられた、またはVP24のエピトープに結合することができるsdAbを作製した。

【0131】

ラクダの免疫化に使用したタンパク質配列組換えVP24タンパク質（配列番号53）は、

A K A T G R Y N L I S P K K D L E K G V V L S D L C N F L V S Q T I Q G W K V 10  
Y W A G I E F D V T H K G M A L L H R L K T N D F A P A W S M T R N L F P H L F  
Q N P N S T I E S P L W A L R V I L A A G I Q D Q L I D Q S L I E P L A G A L G  
L I S D W L L T T N T N H F N M R T Q R V K E Q L S L K M L S L I R S N I L K F  
I N K L D A L H V V N Y N G L L S S I E I I L E F N S S L A I

であった。

【0132】

免疫化の結果として、1つの抗VP24 sdAb、VP24\_\_5が得られ、これをVP24との結合についてスクリーニングした。VP24\_\_5のDNA配列（配列番号54）は：

5' - A T G G G T G A T G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G 20  
A C T C G G T G C G G G C T G G A G G G T C T C T T C A A A T G G G T G A  
T G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G A C T C G G T G C G  
G G C T G G A G G G T C T C T T C A A C T C T C C T G T A A A G C C T C T  
G G A T A C A C C T A C A A T A G T A G A G T C G A T A T C A G A T C T A T  
G G G C T G G T T C C G C C A G T A T C C A G G A A A G G A G C G C G A G  
G G G G T C G C T A C T A T T A A T A T T C G T A A T A G T G T C A C A T  
A C T A T G C C G A C T C C G T G A A G G G C C G A T T C A C C A T C T C C  
C A A G A C A A C G C C A A G A A C A C G G T G T A T C T G C A A A T G A  
A C G C C C T G A A A C C T G A G G A C A C T G C C A T G T A C T A C T G  
T G C G T T G T C A G A C A G A T T C G C G G C G C A G G T A C C T G C C 30  
A G G T A C G G A A T A C G G C C C T C T G A C T A T A A C T A C T G G  
G G T G A G G G G A C C C T G G T C A C C G T C T C C T C A A G C T C T  
G G T C T C G A G - 3'

である。

【0133】

VP24\_\_5 sdAbのアミノ酸配列（配列番号55）を以下に示し、CDRに下線を付した：

M G D V Q L V E S G G D S V R A G G S L Q L S C K A S G Y T Y N S R V D I R S  
M G W F R Q Y P G K E R E G V A T I N I R N S V T Y Y A D S V K G R F T I S Q D 40  
N A K N T V Y L Q M N A L K P E D T A M Y Y C A L S D R F A A Q V P A R Y G I R  
P S D Y N Y W G E G T L V T V S S S S G L E

【0134】

本発明の抗VP24 sdAbの1つまたは複数のドメインに対する1つまたは複数のマウスモノクローナル抗体を作製することができる。マウスモノクローナル抗体は、当業者に知られている方法によって作製することができる、例えば、マウスモノクローナル抗体は、マウスハイブリドーマによって作製することができる。マウスモノクローナル抗体は、診断アッセイに使用することができる、例えば、抗体を、患者由来の試料中に存在する抗VP24 sdAbの量を測定するために、ELISAまたは質量分析アッセイなどの免疫アッセイに使用することができる。

【実施例】

## 【0135】

実施例1：SDABの作製

ALOX12（配列番号44）、VP24（配列番号53）およびHIV-1逆転写酵素（配列番号1）を含むいくつかのタンパク質で免疫したラクダからSdAbを作製した。

## 【0136】

標準的な技術を用いて、pCDisplay-3Mベクター（Creative Biogene、Shirley、NY）およびM13K07ヘルパーファージ（New England Biolabs、Ipswich、MA）を用いてファージディスプレイライブラリーを構築した。sdAbの単クローンをELISAによって確認し、標準的な方法を用いてDNAおよびタンパク質配列を決定した。

10

## 【0137】

実施例2：HIV1-9（配列番号27）SDABは、HIV-1逆転写酵素およびEBOLA VP-24に結合する

Biacore 3000（General Electric Company、Fairfield、CT）上25でタンパク質結合実験を行った。アッセイ緩衝液は、10mM HEPES緩衝液（pH7.4）、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% P20を含んでいた。再生緩衝液は10mMグリシンHCl pH1.75を含んでおり、固定化緩衝液は10mM酢酸ナトリウム、pH5.0を含んでいた。リガンドを捕捉するために使用した流量は5ul/分であった。動態解析に使用した流量は30ul/分であった。

20

## 【0138】

タンパク質結合実験に使用したリガンドはHIV1-9（配列番号27）およびSTAT3-VHH14（配列番号56）であった。CM5センサーチップのそれぞれフローセル2および4に1200および550の応答単位（RU）でアミンカップリング（EDC/NHS）によってリガンドを直接固定化した。フローセル1をブランクで保ち、バックグラウンド除去に使用した。CM5チップ上の占有されていない部位を1Mエタノールアミンでブロックした。結合分析のために、分析物rHIV-1（配列番号1）をセンサーチップ上に流した。分析物とリガンドの結合をリアルタイムで監視した。表1に示されるように、観察された解離速度（kd）の結合速度（ka）から親和定数（ $K_D = kd/ka$ ）を計算した。

30

## 【0139】

タンパク質結合実験の陰性対照は抗STAT3 sdAbであった、VHH14（配列番号56）：QVQLVESGGGSVQAGGSLRRLSCVASTYTGCMGWF  
RQAPGKEREGVAALSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVK  
NAVY LQMNTVKPEDAAMY YCAAREGWECGETWLDRTAGGH  
TYWGGQGT LVT VSS

## 【0140】

実際のセンサーグラムとBIAnalysisソフトウェアから作成されたセンサーグラムとの間でカイ二乗（ $\chi^2$ ）分析を行い、分析の精度を決定した。1~2以内の $\chi^2$ 値は正確であると考えられ、1未満は非常に正確である。

40

【表 1】

表 1

リガンド	分析物	ka(1/Ms)	kd(1/s)	Rmax	KD(M)	濃度 (nM)	カイ二乗
HIV1-9 VHH	rHIV-1	8.91x10 <sup>4</sup>	3.79x10 <sup>-4</sup>	71.3	4.25x10 <sup>-9</sup>	100	0.0321
STAT3 VHH14	rHIV-1	N/A	N/A	N/A	N/A	100	N/A

10

## 【 0 1 4 1 】

最高分析物濃度の 2 倍系列希釈の表 2 に示される分析物濃度で完全な速度論的分析を行った。HIV-1-9 抗 RT sdAb は、HIV-1 とエボラ VP24 分析物の両方に結合した。

【表 2】

表 2

リガンド	分析物	ka(1/Ms)	kd(1/s)	Rmax	KD(M)	濃度 (nM)	カイ二乗
HIV1-9 VHH (1200RU)	rHIV-1	1.90x10 <sup>5</sup>	7.31x10 <sup>-4</sup>	126	3.85x10 <sup>-9</sup>	0-200	0.226
STAT3 VHH14 (550RU)	rHIV-1	NA	NA	NA	NA	0-200	NA
HIV1-9 VHH (1200RU)	VP-24	4.38x10 <sup>2</sup>	1.66x10 <sup>-4</sup>	1190	3.79x10 <sup>-7</sup>	0-200	0.199

20

30

## 【 0 1 4 2 】

実施例 3 : HIV-1-9 (配列番号 27) SDAB は ELISA で HIV-1 逆転写酵素に結合する

HIV-1-9 抗 HIV-1 RT sdAb (配列番号 27) の 2 つの異なる試料を、ELISA において、コーティング抗原、二次抗体および HRP 濃度のチェッカーボードに対して 1 μg/mL で評価した。コーティング抗原は、1 ウェル当たり 0.5、0.025 および 0.125 μg/mL の組換え HIV-1 RT (Creative BioMart) (配列番号 1) であった。二次抗体は 1:5000 および 1:10000 で希釈したビオチン化ウサギ抗ラマで、HRP は 1:25000 および 1:50000 で希釈した。シグナル対ノイズ比 > 20 が濃度のいくつかで見られた。ELISA の結果を図 1 および図 2 に示す。

40

## 【 0 1 4 3 】

HIV-1-9 抗 HIV-1 RT sdAb (配列番号 27) の希釈系列 (1 μg/mL ~ 0.0001 μg/mL) を評価するために、3 つの組み合わせを選択した。

【表 3】

コーティング抗原	二次抗体	HRP
0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1:10,000	1:25,000
0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1:5,000	1:50,000
0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1:10,000	1:50,000

## 【0144】

結果を図3および図4に示す。使用した2つのHIV1-9抗HIV-1 RT sd Ab (配列番号27) 調製物は、非常に類似の結果を有する。0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ コーティング、2°抗体の1:5000希釈およびHRPの1:50000希釈を用いた結果は、  
10 最高の信号対雑音比とわずかに低いブランク値で、HIV1-RT (配列番号1) に対するHIV1-9抗HIV-1 RT sd Ab (配列番号27) の結合を示した。

## 【0145】

実施例4: VP24-5 (配列番号55) SDABはVP24に結合する

タンパク質結合実験を実施例2に記載されるように行った。タンパク質結合に使用したリガンドはVP24-5 (配列番号55) およびSTAT3-VHH14 (配列番号56) であった。CM5センサーチップのそれぞれフローセル2および4に427および550の応答単位(RU)でアミンカップリング(EDC/NHS)によってリガンドを直接固定化した。フローセル1をブランクで保ち、バックグラウンド除去に使用した。CM5チップ上の占有されていない部位を1Mエタノールアミンでブロックした。結合分析のため、  
20 分析物VP24 (配列番号53) をセンサーチップ上に流し、リアルタイムで監視した。表3に示されるように、観察された解離速度( $k_d$ )の結合速度( $k_a$ )から親和定数( $K_D = k_d / k_a$ )を計算した。

【表 4】

表 3

リガンド	分析物	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	Rmax	KD(M)	濃度 (nM)	カイ二乗
VP24-5-VHH	VP-24	$1.39 \times 10^5$	$8.77 \times 10^{-4}$	6.84	$6.31 \times 10^{-9}$	100	0.0481
STAT3 VHH14	VP-24	NA	NA	NA	NA	100	NA

## 【0146】

表4に示されるように、最高分析物濃度の2倍系列希釈の異なる分析物濃度で完全な速度論的分析を行った。

【表 5】

表 4

リガンド	分析物	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	Rmax	KD(M)	濃度 (nM)	カイ二乗
VP24-5-VHH	VP-24	$1.61 \times 10^3$	$4.73 \times 10^{-5}$	222	$2.94 \times 10^{-8}$	0-200	0.187
STAT3 VHH14 (550RU)	VP-24	NA	NA	NA	NA	0-200	NA

## 【0147】

10

20

30

40

50

実施例 5 : V P 2 4 - 5 ( 配列番号 5 5 ) S D A B は E L I S A においてエボラ V P 2 4 標的に結合する

V P 2 4 - 5 抗エボラ V P 2 4 s d A b ( 配列番号 5 5 ) の 2 つの異なる試料を、E L I S A において、コーティング抗原、二次抗体および H R P 濃度のチェッカーボードに対して  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  で評価した。コーティング抗原は、1 ウェル当たり 0 . 5、0 . 0 2 5 および 0 . 1 2 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の組換えエボラ V P 2 4 ( C r e a t i v e B i o M a r t ) ( 配列番号 5 3 ) であった。二次抗体は 1 : 5 0 0 0 および 1 : 1 0 0 0 0 で希釈したビオチン化ウサギ抗ラマであった。H R P を 1 : 1 0 0 0 0 および 1 : 2 5 0 0 0 の希釈で使用した。E L I S A の結果を図 5 および図 6 に示す。シグナル対ノイズ比は低く、分析を高濃度で繰り返した。

10

【 0 1 4 8 】

1 および 0 . 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の V P 2 4 - 5 抗エボラ V P 2 4 s d A b ( 配列番号 5 5 ) を用いて E L I S A を繰り返した。組換え V P 2 4 ( 配列番号 5 3 ) を 1 ウェル当たり 0 . 5 または  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  のいずれかで使用した。二次抗体は 1 : 1 0 0 0、1 : 4 0 0 0、1 : 1 0 0 0 0 および 1 : 1 0 0 0 0 で希釈したビオチン化ウサギ抗ラマであった。H R P を 1 : 2 5 0 0 0 および 1 : 5 0 0 0 0 の希釈で使用した。E L I S A の結果を図 7 および 8 に示す。

【 0 1 4 9 】

V P 2 4 - 5 抗エボラ V P 2 4 s d A b ( 配列番号 5 5 ) の希釈系列 (  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  ~ 0 . 0 0 0 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) を評価するために、3 つの組み合わせを選択した。

20

【表 6】

コーティング抗原	二次抗体	HRP
0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1:1,000	1:1,000
0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1:10,000	1:25,000
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1:4,000	1:25,000

【 0 1 5 0 】

結果を図 9 および図 1 0 に示す。使用した 2 つの V P 2 4 - 5 抗エボラ V P 2 4 s d A b ( 配列番号 5 5 ) 調製物は非常に類似の結果を有し、V P 2 4 - 5 抗エボラ V P 2 4 s d A b ( 配列番号 5 5 ) と組換え V P 2 4 ( 配列番号 5 3 ) の結合を示す。

30

【 0 1 5 1 】

本発明を、一定の好ましい実施形態を参照してかなり詳細に記載してきたが、他の実施形態も可能である。例えば、本方法について開示されるステップは、限定することを意図するものでもなく、各ステップが本方法にとって必ずしも必須であることを示すことを意図するものではなく、単なる例示的なステップにすぎない。そのため、添付の特許請求の範囲の範囲は、本開示に含まれる好ましい実施形態の説明に限定されるべきではない。本明細書に引用される全ての参考文献は、全体が参照により組み込まれる。

【配列表フリーテキスト】

【 0 1 5 2 】

配列表 2 ~ 4 3 < 2 2 3 > ラクダ科動物  
 配列表 4 5 ~ 5 2 < 2 2 3 > ラクダ科動物  
 配列表 5 4 ~ 5 6 < 2 2 3 > ラクダ科動物

40



【 図 8 】

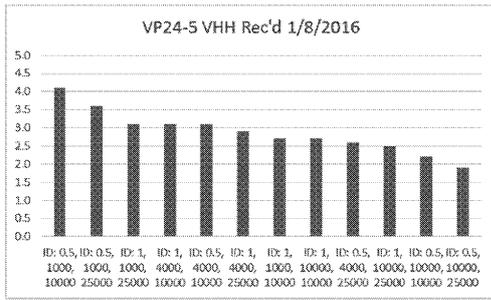
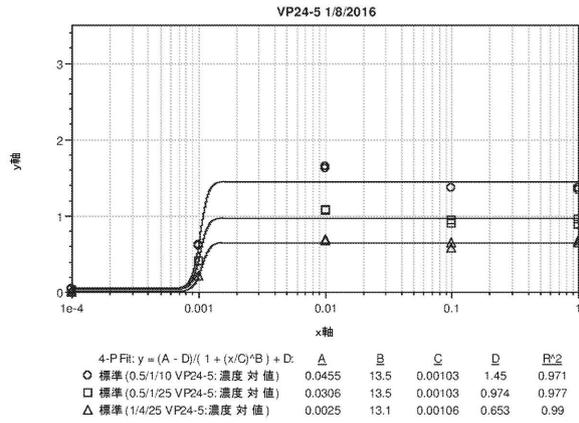
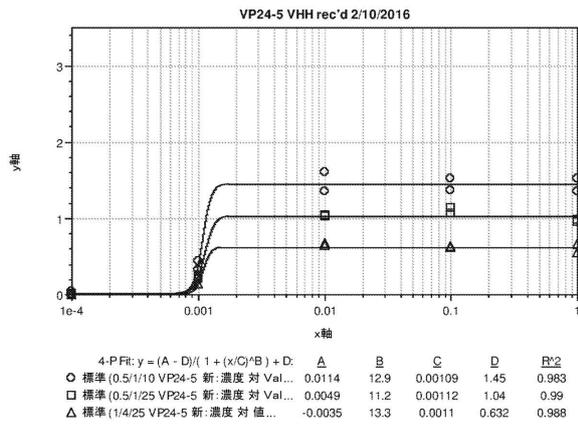


FIG. 8

【 図 10 】



【 図 9 】



【 配 列 表 】

0006918005000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P 3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
C 1 2 N 9/99	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 N	9/99	
		C 1 2 P	21/08	

- (56)参考文献 特表2014-520134(JP,A)  
 特開2002-253239(JP,A)  
 米国特許出願公開第2006/0147997(US,A1)  
 Gargano N. et al., Inhibition of murine leukaemia virus retrotranscription by the intracellular expression of a phage-derived anti-reverse transcriptase antibody fragment, Journal of General Virology, 1997年, vol. 78, no. 10, pp 2591-2599

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )