

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6868763号  
(P6868763)

(45) 発行日 令和3年5月12日(2021.5.12)

(24) 登録日 令和3年4月15日(2021.4.15)

(51) Int.Cl. F I  
**C O 7 K 16/10 (2006.01)** C O 7 K 16/10 Z N A  
**C 1 2 N 15/13 (2006.01)** C 1 2 N 15/13

請求項の数 2 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2016-239976 (P2016-239976)	(73) 特許権者	314012076 パナソニックIPマネジメント株式会社 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
(22) 出願日	平成28年12月12日(2016.12.12)	(74) 代理人	100106116 弁理士 鎌田 健司
(65) 公開番号	特開2017-186298 (P2017-186298A)	(74) 代理人	100115554 弁理士 野村 幸一
(43) 公開日	平成29年10月12日(2017.10.12)	(72) 発明者	湯川 系子 大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニック株式会社内
審査請求日	令和1年11月22日(2019.11.22)	(72) 発明者	村岡 仁 大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニック株式会社内
(31) 優先権主張番号	62/316,672		
(32) 優先日	平成28年4月1日(2016.4.1)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウィルスに結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミノ酸配列からなる抗体であって、前記アミノ酸配列は、NからCの方向に、以下の構造ドメインからなり：

N - F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 - C

F R は、フレームワーク領域のアミノ酸配列を示し、かつC D R は、相補性決定領域のアミノ酸配列を示し、

前記C D R 1 はSYYMS (配列番号：01) により表されるアミノ酸配列からなり、

前記C D R 2 は、TINTGGGSTYYADSVKG (配列番号：02) により表されるアミノ酸配列からなり、

前記C D R 3 は、DGPYGGYDY (配列番号：03) により表されるアミノ酸配列からなり、かつ

H 1 2 N 1 インフルエンザウィルスに結合可能である、抗体。

【請求項2】

前記F R 1 は、EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFS (配列番号：04) により表されるアミノ酸配列からなり、

前記F R 2 は、WVRQAPGKGLEWVS (配列番号：05) により表されるアミノ酸配列からなり、

前記F R 3 は、RFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAK (配列番号：06) により表される

10

20

アミノ酸配列からなり、かつ

前記 F R 4 は、WGQGTQVTVSP (配列番号：07) により表されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インフルエンザウィルスに結合する抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

特許文献 1 は、インフルエンザウィルスに結合する抗体を開示している。特許文献 1 に開示された抗体の少なくとも一部は、アルパカに由来する。特許文献 1 は、本明細書に参照として援用される。 10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】米国特許出願公開第 2014/0302063 号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、インフルエンザウィルスに結合する新規な抗体を提供することである 20

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、アミノ酸配列からなる抗体であって、前記アミノ酸配列は、N から C の方向に、以下の構造ドメインからなり：

N - F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 - C

F R は、フレームワーク領域のアミノ酸配列を示し、かつ C D R は、相補性決定領域のアミノ酸配列を示し、

前記 C D R 1 は SY Y M S (配列番号：01) により表されるアミノ酸配列からなり、 30

前記 C D R 2 は、T I N T G G S T Y Y A D S V K G (配列番号：02) により表されるアミノ酸配列からなり、

前記 C D R 3 は、D G P Y G G Y D Y (配列番号：03) により表されるアミノ酸配列からなり、かつ

前記抗体は、H 1 2 N 1 インフルエンザウィルスに結合可能である。

【発明の効果】

【0006】

本発明は、インフルエンザウィルスに結合する新規な抗体を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図 1 A】図 1 A は、V H H 抗体の遺伝子ライブラリに含まれる様々な遺伝子をライゲーションするために用いられたベクターのマップを示す。 40

【図 1 B】図 1 B は、図 1 A に示されるベクターマップの詳細を示す。

【図 2】図 2 は、V H H 抗体を発現するために用いられたベクターの合成手順を示す。

【図 3 A】図 3 A は、1000 nM の抗 H 1 2 N 1 抗体に対する S P R 評価装置 T 2 0 0 から得られた評価結果を示すグラフである。

【図 3 B】図 3 B は、500 nM の抗 H 1 2 N 1 抗体に対する S P R 評価装置 T 2 0 0 から得られた評価結果を示すグラフである。

【図 3 C】図 3 C は、250 nM の抗 H 1 2 N 1 抗体に対する S P R 評価装置 T 2 0 0 から得られた評価結果を示すグラフである。 50

【図3D】図3Dは、50nMの抗H12N1抗体に対するSPR評価装置T200から得られた評価結果を示すグラフである。

【図3E】図3Eは、10nMの抗H12N1抗体に対するSPR評価装置T200から得られた評価結果を示すグラフである。

【図3F】図3Fは、2nMの抗H12N1抗体に対するSPR評価装置T200から得られた評価結果を示すグラフである。

【図4】図4は、全ヘマグルチニン亜種に対する配列番号：08により表されるアミノ酸配列からなるVHH抗体を含有する溶液の450ナノメートルの波長での吸光度測定結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

10

【0008】

本発明による抗体は、H12N1インフルエンザウィルスに結合する。特許文献1にも開示されているように、H12N1インフルエンザウィルスに結合する抗体は、NからCの方向に、以下の構造ドメインを含むアミノ酸配列からなる。

N - FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - C

ここで、FRは、フレームワーク領域のアミノ酸配列を示し、かつCDRは、相補性決定領域のアミノ酸配列を示す。

【0009】

本発明においては、CDR1はSYYS(配列番号：01)により表されるアミノ酸配列からなる。

20

【0010】

本発明においては、CDR2は、TINTGGGSTYYADSVKG(配列番号：02)により表されるアミノ酸配列からなる。

【0011】

本発明においては、CDR3は、DGPYGGYDY(配列番号：03)により表されるアミノ酸配列からなる。

【0012】

望ましくは、CDR1、CDR2、およびCDR3は、それぞれ、配列番号：01、配列番号：02、および配列番号：03により表される。この場合、より望ましくは、FR1、FR2、FR3、およびFR4は、それぞれ、EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFS(配列番号：04)、WVRQAPGKGLEWVS(配列番号：05)、RFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAK(配列番号：06)、およびWGQGTQVTVSP(配列番号：07)により表されるアミノ酸配列からなる。言い換えれば、本発明による抗体は、以下のアミノ酸配列からなることがより望ましい。

30

EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSYYYSWVRQAPGKGLEWVSTINTGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDVAVYYCAK DGPYGGYDYWGQGTQVTVSP(配列番号：08)

【0013】

配列番号：08により表されるアミノ酸配列からなる抗体は、H12N1インフルエンザヘマグルチニン以外のヘマグルチニンに対して抗原交差反応性を示さない。

40

【0014】

(実施例)

(実施例1)

H12N1インフルエンザウィルスA型に含まれるヘマグルチニン(以下、「HA」という)に結合するVHH抗体が、以下の手順に従って調製された。本明細書において、VHH(またはVHH抗体)とは、重鎖抗体の重鎖の可変領域を意味する。

【0015】

(アルパカへの免疫および単核球の取得)

VHH抗体遺伝子ライブラリを作製するため、H12N5インフルエンザウィルスA型(A/green-winged teal/ALB/199/1991)由来のリコンビナントHA蛋白質(H1、H2、H

50

3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、およびH16、Sino Biologicalから購入、カタログ番号：11055-V08H)を抗原として用いてアルパカが免疫された。

【0016】

具体的には、100マイクログラム/ミリリットルの濃度を有するリコンビナントHA蛋白質が、アルパカへ投与された。1週間後、再度、同じ濃度を有するリコンビナントHA蛋白質が、アルパカへ投与された。このようにして、5週間かけて5回、アルパカはリコンビナントHA蛋白質を用いて免疫された。さらに1週間後、アルパカの血液を採取した。次いで、以下のように血液から単核球が取得された。

【0017】

リンパ球分離チューブ(株式会社グライナー・ジャパンより購入、商品名：Leucosep)に、血球分離溶液(コスモ・バイオ株式会社より購入、商品名：Lymphoprep)が添加された。次いで、溶液は、摂氏20度の温度で1000×gで1分間遠心された。

【0018】

アルパカから採取された血液は、ヘパリンによって処理された。次に、このように処理された血液に等量のリン酸緩衝生理食塩水(以下、「PBS」という)が添加され、サンプル液を得た。次いで、サンプル液は血球分離溶液が添加されたリンパ球分離チューブに添加された。

【0019】

リンパ球分離チューブは、摂氏20度の温度で800×gで30分遠心された。

【0020】

単核球を含有する画分が回収され、3倍の容量を有するPBSが添加された。画分は、摂氏20度の温度で300×gで5分遠心された。沈殿物が、PBSを用いて穏やかに懸濁された。懸濁後、細胞数の測定のために10マイクロリットルの懸濁液が分離された。残りの懸濁液が、摂氏20度の温度で300×gで5分間遠心された。

【0021】

沈殿物に2ミリリットルの容積を有するRNA保存溶液(商品名：RNAlater)が添加された。次いで、溶液は穏やかに懸濁された。懸濁液が、2本の1.5mLチューブに注入された。各チューブは、1ミリリットルの懸濁液を含んでいた。チューブは、摂氏-20度の温度下で保存された。細胞数の測定のために分離された懸濁液(5マイクロリットル)が、チュルク液(15マイクロリットル)と混合され、血球計算盤を用いて単核球の数が数えられた。

【0022】

(VHH抗体のcDNA遺伝子ライブラリの作製)

次に、単核球からTOTAL RNAを抽出し、そしてVHH抗体のcDNA遺伝子ライブラリが以下の手順で作製された。以下の手順では、RNase free gradeの試薬および器具が使用された。

【0023】

単核球分画に、トータルRNA抽出試薬(商品名：TRIzol Reagent、1ミリリットル)を加えた。試薬は緩やかに混和され、そして室温にて5分間放置された。クロロホルム(200マイクロリットル)が試薬に加えられ、そして15秒間、試薬は力強く振られた。試薬は、室温で2-3分間静置された。試薬は、摂氏4度で15分間、12,000xg以下で遠心された。

【0024】

上清が新しいチューブに移された。RNaseフリー水およびクロロホルム(各200マイクロリットル)がチューブに加えられた。さらに500ミリリットルのイソプロパノールがチューブに加えられた。チューブに含まれる液体はボルテックスミキサーを用いて攪拌された。液体は室温で10分間静置された。次いで、液体は摂氏4度の温度で15分間、12,000xg以下で遠心された。上清が捨てられ、沈殿物が1ミリリットルの75%エタノールでリンスされた。この溶液は、摂氏4度の温度で5分間、7,500xg以下で遠心された。溶液は乾燥され、全RNAを得た。得られた全RNAは、RNaseフリー水に溶解された。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 5 】

Total RNAからcDNAを取得するため、逆転写酵素を含むキット（タカラバイオ株式会社より入手、商品名：PrimeScript II 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis Kit）が用いられた。キットに含まれるRandom 6 merおよびOligo dT primerがプライマーとして用いられた。キットの標準プロトコルに従って、cDNAが取得された。

## 【 0 0 2 6 】

アルパカに含まれるV H H抗体の遺伝子が、cDNAからP C R法によって獲得された。P C Rのための酵素はタカラバイオ株式会社よりEx-taqの商品名として入手された。

## 【 0 0 2 7 】

以下の試薬が混合され、混合液を得た。

10x buffer	5	マイクロリットル
dNTPs	4	マイクロリットル
Primer F	2	マイクロリットル
Primer R	2	マイクロリットル
cDNA template	1	マイクロリットル
Ex-taq	0.25	マイクロリットル

10

## 【 0 0 2 8 】

混合液は以下のP C R法に供された。

まず、混合液は、摂氏95度で2分間で加熱された。

次いで、混合液の温度は、以下のサイクルに従って変化された。

20

摂氏96度で30秒間

摂氏52度で30秒間、そして

摂氏68度で40秒間。

このサイクルが30回繰り返された。

最後に、混合液は、摂氏68度で4分間加熱した後、摂氏4度で保存された。

このP C R法においては、以下のプライマーが使用された。

primer 1: 5' - GGTGGTCCTGGCTGC -3' (配列番号: 09)

primer 2: 5' - ctgctcctcgcGGCCCAGCCGGCCatggcTSAGKTGCAGCTCGTGGAGTC -3' (配列番号: 10)

30

primer 3: 5' - TGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG -3' (配列番号: 11)

primer 4: 5' - TTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG -3' (配列番号: 12)

primer 5: 5' - tttgCtctGCGCCGCagaGGCCgTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG -3' (配列番号: 13)

primer 6: 5' - tttgCtctGCGCCGCagaGGCCgaTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG -3' (配列番号: 14)

(参考文献: Biomed Environ Sci, 2012; 27(2):118-121)

## 【 0 0 2 9 】

3回のP C Rアッセイが実施された。

40

1回目のP C Rアッセイでは、cDNA、Primer 1 およびPrimer 3からなるプライマーセットA、およびcDNA、Primer 1 およびPrimer 4からなるプライマーセットBが用いられた。

2回目のP C Rアッセイでは、プライマーセットAを用いて増幅された遺伝子、Primer 2 およびPrimer 3からなるプライマーセットC、およびプライマーセットBを用いて増幅された遺伝子、Primer 2 およびPrimer 4からなるプライマーセットDが用いられた。

3回目のP C Rアッセイでは、プライマーセットCを用いて増幅された遺伝子、Primer 2 およびPrimer 5からなるプライマーセットE、およびプライマーセットDを用いて増幅された遺伝子、Primer 2 およびPrimer 6からなるプライマーセットFが用いられた。

このようにして、V H H抗体の遺伝子ライブラリが形成された。言い換えれば、V H H

50

抗体の遺伝子ライブラリは、プライマーセット E およびプライマーセット F を用いて増幅された遺伝子を含んでいた。

【 0 0 3 0 】

( フェージライブラリの作製 )

次に、V H H 抗体の遺伝子ライブラリから、以下の手順に従ってフェージライブラリが作製された。

【 0 0 3 1 】

市販されているプラスミド p U C 1 1 9 ( 例えば、タカラバイオ株式会社より入手可能 ) 由来のプラスミド V e c t o r 1 ( 4 0 5 7 塩基対、図 1 A 参照 ) が、制限酵素 S f i I により処理された。図 1 A における制限酵素サイト S f i I ( a ) は、GGCCCAGCCGGCC ( 配列番号 : 1 5 ) により表される遺伝子配列からなる。制限酵素サイト S f i I ( b ) は、GGCCTCTGCGGCC ( 配列番号 : 1 6 ) により表される遺伝子配列からなる。図 1 B は、プラスミド V e c t o r 1 の詳細なベクターマップを示す。

10

【 0 0 3 2 】

プラスミド V e c t o r 1 は、以下の遺伝子配列からなる。

gacgaaagggcctcgtgatacgcctat t t t t atagg t taatgtcatgataataatgg t t t c t tagacgtcaggtggcact  
t t t cggggaaatgtgcgcggaaccctat t t g t t t a t t t t c t a a a t a c a t t c a a a t a t g t a t c c g c t c a t g a g a c a a t a  
accctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtat tcaacatt t c c g t g t c g c c c t a t t c c c t t t t  
t t g c g g c a t t t t g c c t t c c t g t t t t g c t c a c c c a g a a a c g c t g g t g a a a g t a a a a g a t g c t g a a g a t c a g t t g g g t g c a  
cgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagag t t t t c g c c c c g a a g a a c g t t t t c c a a t g a t  
gagcact t t t a a g t t c t g c t a t g t g g c g c g g t a t t a t c c c g t a t t g a c g c c g g g c a a g a g c a a c t c g g t c g c c g c a t a c  
actat t c t c a g a a t g a c t t g g t g a g t a c t c a c c a g t c a c a g a a a g c a t c t t a c g g a t g g c a t g a c a g t a a g a g a a t t a  
t g c a g t g c t g c c a t a a c c a t g a g t g a t a a c a c t g c g g c c a a c t t a c t t c t g a c a a c g a t c g g a g g a c c g a a g g a g c t a a c  
c g c t t t t t g c a c a a c a t g g g g g a t c a t g t a a c t c g c c t g a t c g t t g g g a a c c g g a g c t g a a t g a a g c c a t a c c a a a c g  
a c g a g c g t g a c a c c a c g a t g c c t g t a g c a a t g g c a a c a a c g t t g c g c a a a c t a t t a a c t g g c g a a c t a c t t a c t c t a g c t  
t c c c g g c a a c a a t t a a t a g a c t g g a t g g a g g c g g a t a a a g t t g c a g g a c c a c t t c t g c g c t c g g c c c t t c c g g c t g g c t g  
g t t a t t g c t g a t a a a t c t g g a g c c g g t g a g c g t g g g t c t c g c g g t a t c a t t g c a g c a c t g g g g c c a g a t g g t a a g c c c t  
c c c g t a c g t a g t t a t c t a c a c g a c g g g g a g t c a g g c a a c t a t g g a t g a a c g a a a t a g a c a g a t c g c t g a g a t a g g t g c c  
t c a c t g a t t a a g c a t t g g t a a c t g t c a g a c c a a g t t t a c t c a t a t a t a c t t t a g a t t g a t t t a a a a c t t c a t t t t t a a t t  
t a a a a g g a t c t a g g t g a a g a t c c t t t t g a t a a t c t c a t g a c c a a a a t c c c t t a a c g t g a g t t t t c g t t c c a c t g a g c g t  
c a g a c c c c g t a g a a a a g a t c a a a g g a t c t t c t t g a g a t c c t t t t t t c t g c g c g t a a t c t g c t g c t t g c a a a c a a a a a a  
c c a c c g c t a c c a g c g g t g g t t t g t t t g c c g g a t c a a g a g c t a c c a a c t c t t t t t c c g a a g g t a a c t g g c t t c a g c a g a g c  
g c a g a t a c c a a a t a c t g t c c t t c t a g t g t a g c c g t a g t t a g g c c a c c a c t t c a a g a a c t c t g t a g c a c c g c c t a c a t a c c  
t c g c t c t g c t a a t c c t g t t a c c a g t g g c t g c t g c c a g t g g c g a t a a g t c g t g t c t t a c c g g g t t g g a c t c a a g a c g a t a g  
t t a c c g g a t a a g g c g c a g c g g t c g g g c t g a a c g g g g g t t c g t g c a c a c a g c c c a g c t t g g a g c g a a c g a c c t a c a c c g a  
a c t g a g a t a c c t a c a g c g t g a g c t a t g a g a a a g c g c c a c g c t t c c c g a a g g g a g a a a g g c g g a c a g g t a t c c g g t a a g c g  
g c a g g t c g g a a c a g g a g a g c g c a c g a g g g a g c t t c c a g g g g a a a c g c c t g g t a t c t t t a t a g t c c t g t c g g g t t t c g c  
c a c c t c t g a c t t g a g c g t c g a t t t t g t g a t g c t c g t c a g g g g g c g g a g c c t a t g g a a a a c g c c a g c a a c g c g g c c t t  
t t t a c g g t t c c t g g c c t t t t g c t g g c c t t t g c t c a c a t g t t c t t c c t g c g t t a t c c c c t g a t t c t g t g g a t a a c c g t a  
t t a c c g c c t t t g a g t g a g c t g a t a c c g c t c g c c g c a g c c g a a c g a c c g a g c g a g c g a g t c a g t g a g c g a g g a a g c g g a a  
g a g c g c c c a a t a c g c a a a c c g c c t c t c c c c g c g c g t t g g c c g a t t c a t t a a t g c a g c t g g c a c g a c a g g t t t c c c g a c t g  
g a a a g c g g g c a g t g a g c g c a a c g c a a t t a a t g t g a g t a g c t c a c t c a t t a g g c a c c c a g g c t t t a c a c t t t a t g c t t c  
c g g c t c g t a t g t t g t g t g g a a t t g t g a g c g g a t a a c a a t t t c a c a c a g g a a a c a g c t a t g a c c a t g a t t a c g c c A A G C T T  
C G A A G G A G A C A G T C A T A a t g a a a t a c c t g c t g c c a c c g c t g c t g c t g g t c t g c t g c t c c t c g c G G C C A G C C G G C C a t g  
g a g c T C A A G A T G A C A C A G A C T A C A T C C T C C C T G T C A G C C T C T C T G G G A G A C A G A G T C A C C A T C A G T T G C A G G G C A A G T C A  
G G A C A T T A G C G A T T A T T T A A A C T G G T A T C A G C A G A A A C C A G A T G G A A C T G T T A A A C T C C T G A T C T A T T A C A C A T C A A G T T  
T A C A C T C A G G A G T C C C A T C A A G G T T C A G T G G C G G T G G G T C T G G A A C A G A T T A T T C T C T C A C C A T T A G C A A C C T G G A G C A A  
G A A G A T A T T G C C A C T T A C T T T T G C C A A C A G G G T A A T A C G C T T C C G T G G A C G T T T G G T G G A G G C A C C A A G C T G G A A A T C A A  
A C G G G C T G A T G C T G C A C C A A C T g t a G G C C t c t G C G G C C G C a g a G c a a a a a c t c a t c t c a g a a g a g g a t c t g a a t g g g g c c  
g c a T A G g g t t c c g g t g a t t t t g a t t a t g a a a a g a t g g c a a a c g c t a a t a a g g g g g c t a t g a c c g a a a a t g c c g a t g a a a a

20

30

40

50

cgcgctacagctctgacgctaaaggcaaaccttgattctgtcgcctactgattacgggtgctgctatcgatgggttcatgggtg  
 acgttccggccttgctaattggtaatgggtgctactgggtgattttgctggctctaattcccaaatggctcaagtcggtgac  
 ggtgataattcacctttaatgataatttccgtcaataatttaccttccctccctcaatcgggtgaatgtcgccctttgt  
 ctttagcgctggtaaaccatatgaattttctattgatgtgacaaaataaacctattccgtgggtgcttttgcgtttcttt  
 tataatgttgccacctttatgatatgattttctacgtttgctaacaatactgcgtaataaggagctctTAATAAgaattcact  
 ggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttaccacaacttaatcgccctgacgacacatccccctttcg  
 ccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgcccttcccaacagttgcgagcctgaatggcgaatggcgcctg  
 atgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgCATATGaAAATTGTAAgcgttaataattttgttaaaa  
 ttcgcttaaatttttgttaaatcagctcattttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaaga  
 atagaccgagatagggttgagtgtgttccagtttggacaagaagctccactataaagaacgtggactccaacgtcaaag  
 ggcaaaaaccgtctatcagggcgtggccactacgtgaacatcaccctaatcaagtttttggggctgaggtgcccgt  
 aaagcactaaatcggaacccaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaagga  
 agggaagaaagcgaaggagcgggcttagggcgctggcaagttagcgggtcacgctgcgctgacccaccacaccgccc  
 cgcttaatgcccgcctacaGGGCGCTcccatATGgtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgatagttaagcca  
 gccccgacaccgccaacaccgcgtgacgcccctgacgggctgtgtgctcccggcatccgcttacagacaagctgtga  
 ccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttaccgctcatcaccgaaacgcgca (配列番号: 17)

## 【0033】

同様に、V H H抗体の遺伝子ライブラリも制限酵素 S f i Iにより処理された。このよ  
 うにして、V H H抗体遺伝子断片が得られた。

## 【0034】

このように処理されたプラスミド V e c t o r 1 が、V H H抗体遺伝子断片と、1 : 2  
 の割合で混合された。混合液に、酵素(東洋紡株式会社より入手、商品名: L i g a t i  
 o n H i g h v e r . 2)が注入された。混合液は摂氏16度の温度下で2時間静置  
 された。このようにして、V H H抗体遺伝子断片がプラスミド V e c t o r 1にライゲ  
 ションされた。

## 【0035】

このようにしてライゲーションされたプラスミド V e c t o r 1を用いて、大腸菌(タ  
 カライオ株式会社より入手、商品名: H S T 0 2)がトランスフェクトされた。

## 【0036】

次いで、大腸菌は、100マイクログラム/ミリリットルの濃度を有するアンピシリン  
 を含有する2 Y Tプレート培地上で15時間、培養された。このようにして、V H H抗体  
 の遺伝子ライブラリに含まれる遺伝子断片から得られるタンパク質を提示するファージの  
 ライブラリが得られた。

## 【0037】

培養後、2 Y Tプレート培地上に形成されたシングルコロニーの数をカウントすること  
 でライブラリの濃度を算出した。その結果、ライブラリは、 $2.6 \times 10^8$ 個/ミリリ  
 ットルの濃度を有していた。

## 【0038】

(バイオパンニング)

H A蛋白質に特異的に結合するV H H抗体が、ファージライブラリから以下の手順に従  
 って得られた。

## 【0039】

V H H抗体を発現したファージの中から、抗原に結合するクローンを抽出するため、2  
 回のバイオパンニングを実施した。

## 【0040】

V H H抗体の遺伝子ライブラリに含まれるV H H抗体遺伝子断片が導入された大腸菌(  
 H S T 0 2)を、吸光度を示す値( $OD_{600}$ )が1.0になるまで、摂氏30度にて、100 u  
 g / m Lのアンピシリンおよび1%グルコースを含有した2 Y T A G培地中で培養した。  
 2 Y T A G培地は、100 m Lの容量を有していた。このようにして、大腸菌を増殖させ  
 た。

10

20

30

40

50

## 【0041】

ヘルパーファージ (Invitrogen社より購入、商品名: M13K07) を感染多重度 (以下、「MOI」という) がおよそ20となるよう大腸菌含有培地へ加えた。

## 【0042】

その後、培地が30分ほど摂氏37度で保温された。次いで、培地を4000rpmの回転数で10分間遠心し、大腸菌を回収した。100ug/mLのアンピシリンおよび50ug/mLのカナマイシンを含有した2YTAK培地中で、摂氏30度で、213rpmにて遠心しながら、大腸菌を一晩培養した。

## 【0043】

上記のように培養された大腸菌を含有する培養液 (100ミリリットル) が、2本の遠沈管 (容積: 50ミリリットル) に注入された。2つの培養液は、4000rpmの回転数で10分間遠心された。次いで、上清 (各20ミリリットル) が回収された。

10

## 【0044】

上清 (40ミリリットル) が、NaCl (2.5M) を含有する20% ポリエチレングリコール溶液 (10ミリリットル) に添加された。次いで、混合液は、転倒混和された。その後、混合液は、およそ1時間氷上にて冷却された。混合液は、4000rpmの回転数で10分間遠心された。次いで、上清が除去された。10%グリセロールを含有するPBSが沈殿物に向けて注入された。最後に、沈殿物は、ほぐしながら溶解された。このようにして、VHH抗体を提示するファージのライブラリが得られた。

## 【0045】

20

(HAに特異的に結合するVHH抗体のスクリーニング)

(A) HA抗原の固定化

HAをPBSと混合し、HA溶液を調製した。HAの濃度は10マイクログラム/ミリリットルであった。HA溶液 (2ミリリットル) が、イムノチューブ (ヌンク社より購入) に注入された。HA溶液はイムノチューブ内で1時間静置された。このようにして、イムノチューブの内部にHAが固定された。

次いで、イムノチューブの内部がPBSを用いて3回、洗浄された。

3%スキムミルク (和光純薬株式会社より入手) を含有するPBSをイムノチューブに満たした。このようにして、HAが抗原としてイムノチューブの内部にブロッキングされた。

30

イムノチューブは、室温にて1時間、静置された。その後、イムノチューブの内部がPBSを用いて3回、洗浄された。

## 【0046】

(B) パニング

VHH抗体を提示するファージのライブラリ (濃度: およそ $10E+11$ /ミリリットル) が、3%のスキムミルクを含有した2ミリリットルのPBSと混合され、混合液を調製した。混合液は、HA抗原が固定化されたイムノチューブに注入された。

イムノチューブには、パラフィルムからなる蓋が取り付けられた。次いで、イムノチューブは、ローテーターを用いて、10分間、転倒しながら回転された。

イムノチューブは、室温にて1時間、静置された。

40

イムノチューブの内部は、0.05%のTween 20を含有するPBS (以下、「PBST」という) で10回、洗浄された。

イムノチューブの内部は、PBSTにより満たされた。その後、イムノチューブは、10分間、静置された。次いで、イムノチューブの内部は、PBSTで10回、洗浄された。

## 【0047】

HA抗原に結合したVHH抗体を提示するファージを抽出するために、100mMトリメチルアミン溶液 (1ミリリットル) がイムノチューブに注入された。

イムノチューブには、パラフィルムからなる蓋が取り付けられた。次いで、イムノチューブは、ローテーターを用いて、10分間、転倒しながら回転された。

50

## 【 0 0 4 8 】

溶液を中和するため、溶液は、1 mLの0.5 M Tris / HCl (pH: 6.8) を含有するチューブに移した。再度、100 mMトリメチルアミン溶液(1ミリリットル)を用いたファージの抽出を繰り返した。このようにして、3 mLの抽出液が得られた。

## 【 0 0 4 9 】

抽出液(1 mL)が、9 mLの大腸菌HST02と混合された。混合液は、摂氏30度の温度で1時間、静置された。

## 【 0 0 5 0 】

コロニーを計数するため、大腸菌HST02を含有する10マイクロリットルの混合液は、2TYA培地を含む小プレート(10ミリリットル/プレート)にまかれた。

10

## 【 0 0 5 1 】

残りの混合液は遠心分離された。上澄み液は捨てられ、かつ沈殿物は2TYA培地を含む大プレート(40ミリリットル/プレート)にまかれた。これらの2つのプレートは、摂氏30度の温度下にて一晩静置された。このようにして、1回目のパニングが行われた。

## 【 0 0 5 2 】

1回目のパニングの手順と全く同様に、2回目のパニングが行われた。言い換えれば、パニングが繰り返された。このようにして、VHH抗体を提示するモノクローナルファージが精製された。

## 【 0 0 5 3 】

20

2回目のパニングの後、大腸菌のコロニーが爪楊枝でピックアップされた。ピックアップされた1つのコロニーは、96平底プレートの1つのウェルに置かれた。これが繰り返された。1つのウェルは、200マイクロリットルの2YTAG培地を含有していた。

## 【 0 0 5 4 】

ウェル内の溶液が、摂氏30度で213 rpmの回転数で撹拌された。

## 【 0 0 5 5 】

増殖した大腸菌を含む溶液(50マイクロリットル)が回収された。回収された溶液は、プレートに含まれる50マイクロリットルの2YT培地と混合された。2YT培地は、感染多重度(すなわち、MOI)が20になるようなヘルパーファージを含有していた。溶液は、摂氏37度の温度で40分間静置された。

30

## 【 0 0 5 6 】

2YT培地を含むプレートは、1800 rpmにて20分間遠心分離された。上清が捨てられた。沈殿物が大腸菌を含んでいた。沈殿物は、200マイクロリットルの2YTA培地と混合された。混合液は、摂氏30度にて一晩静置された。

## 【 0 0 5 7 】

混合液は、1800 rpmにて20分間遠心分離された。大腸菌を含む上清が回収された。

## 【 0 0 5 8 】

(C) ELISAによるファージ提示VHH抗体および抗原の定性評価

96ウェルプレート(Thermo Fisher Scientific株式会社より購入、商品名: maxisorp)の各ウェルに、100マイクログラム/ミリリットルの濃度を有するHAタンパク質溶液を抗原として添加した。各ウェルにおけるHAタンパク質溶液の容積は、50マイクロリットルであった。96ウェルプレートは、室温で1時間、放置された。このようにして、HA抗原が各ウェルに固定された。

40

## 【 0 0 5 9 】

各ウェルは、PBSにより3回、洗浄された。次いで、3%スキムミルク(和光純薬株式会社より入手)を含有するPBSが各ウェルに注入された(200マイクロリットル/ウェル)。96ウェルプレートは、室温で1時間、放置された。このようにして、HAタンパク質が各ウェルでブロックされた。その後、各ウェルは、PBSで3回、洗浄された。

50

## 【 0 0 6 0 】

V H H抗体を提示するモノクローナルファージが、各ウェルに注入された（50マイクロリットル/ウェル）。次いで、96ウェルプレートは、1時間、静置された。このようにして、ファージはH A抗原と反応した。

## 【 0 0 6 1 】

各ウェルは、P B S Tを用いて3回、洗浄された。次に、抗M 1 3抗体（a b c a m社より入手、商品名：a b 5 0 3 7 0、1 0 0 0 0倍希釈）が各ウェルに添加された（50マイクロリットル/ウェル）。次いで、各ウェルはP B S Tで3回、洗浄された。

## 【 0 0 6 2 】

発色剤（T h e r m o S c i e n t i f i c社より入手、商品名：1-STEP ULTRA TMB -ELISA）が各ウェルに注入された（50マイクロリットル/ウェル）。96ウェルプレートは2分間静置され、発色剤を抗体と反応させた。

10

## 【 0 0 6 3 】

硫酸水溶液（1規定）が50マイクロリットル/ウェルの濃度で各ウェルに添加され、反応を停止させた。

## 【 0 0 6 4 】

450ナノメートルの波長での溶液の吸光度が測定された。

## 【 0 0 6 5 】

良好な吸光度測定の結果を有する6つのウェルが選択された。選択された6つのウェルに含有されるファージに含まれるD N A配列が、グライナー社により解析された。D N A配列の解析結果は、以下のとおりである。以下の1つのD N A配列が見いだされた。

20

GAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTGAGAGTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT  
CACCTTCAGTAGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCAACTATTAATACTG  
GTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCCCTCTAT  
CTGCAAATGGACAGTCTGAAATCTGAAGATACAGCCGTGTATTATTGTGCAAAAGATGGGCCATATGGCGGGTACGACTA  
CTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCCA （配列番号：18）

## 【 0 0 6 6 】

配列番号：18により表されるD N A配列から合成される蛋白質は、以下のアミノ酸配列からなる。

30

EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKLEWVSTINTGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMDSLKSEDTAVYYCAKDGPGYGGYDYGQGTQVTVSP（配列番号：08）

## 【 0 0 6 7 】

（抗H 1 2 N 1 V H H抗体の発現）

ベクターp E T 2 2 b（+）がM e r c k M i l l i p o r e社より購入された。P r i m e S T A R M u t a g e n e s i s B a s a l K i t（タカラバイオ株式会社より入手）を用いて、P C R法で3 x F l a gタグおよび2つの制限酵素サイトS f i I（a）およびS f i I（b）がベクターp E T 2 2 b（+）に付加された。図2を参照せよ。図2に示される手順が、以下、詳細に説明される。

## 【 0 0 6 8 】

まず、以下2つのプライマーおよび制限酵素（タカラバイオ株式会社より入手、商品名：P r i m e S T A R M a x D N A p o l y m e r a s e）を用いて、P C R法により、制限酵素サイトS f i I（a）が、ベクターp E T 2 2 b（+）に付加された。

40

Primer 1: 5' - GCCGGCTGGGCcGCGAGGAGCAGCAGACCA -3'（配列番号：19）

Primer 2: 5' - GCCCAGCCGGCcATGGCCATGGATATCGGA -3'（配列番号：20）

## 【 0 0 6 9 】

次に、以下2つのプライマーおよび制限酵素（タカラバイオ株式会社より入手、商品名：P r i m e S T A R M a x D N A p o l y m e r a s e）を用いて、P C R法により、5'末端側および3'末端側にそれぞれ制限酵素サイトB a m h IおよびX h o Iを有する3 x F l a gタグD N A断片が作製された。

50

Primer 1: 5' - CATGGATATCGGAATTAATTCggatccGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCAT  
GACATCctcgagCACCACCACCACCACACTGA -3' (配列番号: 21)

Primer 2: 5' - TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTgctcgagGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGT  
AGTCggatccGAATTAATTCGATATCCATG -3' (配列番号: 22)

【0070】

2つの制限酵素 BamHI および XhoI (タカラバイオ株式会社より入手) を用いて、この 3xFlag タグ DNA 断片およびベクター pET22b(+) が処理された。

【0071】

Ligation Kit (タカラバイオ株式会社より入手) を用いて、3xFlag タグ DNA 断片が、ベクター pET22b(+) にライゲーションされた。このようにして、3xFlag タグおよび制限酵素サイト SfiI(a) が付加されたベクター pET22b(+) が得られた。

【0072】

以下2つのプライマーおよび制限酵素 (タカラバイオ株式会社より入手、商品名: PrimeSTAR Max DNA polymerase) を用いて、PCR法により、5'末端側および3'末端側にそれぞれ制限酵素サイト NcoI および BamHI を有する DNA 断片が作製された。

Primer 1: 5' - AAATACCTGCTGCCGccatggATATCGGAATTAATTCggcctctgcgggccGCAggatccGACT  
ACAAAGACCAT-3' (配列番号: 23)

Primer 2: 5' - ATGGTCTTTGTAGTCggatccTGCggccgcagaggccGAATTAATTCGATATccatggCGGC  
AGCAGGTATTT-3' (配列番号: 24)

【0073】

次に、2つの制限酵素 NcoI および BamHI (タカラバイオ株式会社より入手) を用いて、この DNA 断片およびベクター pET22b(+) が処理された。

【0074】

Ligation Kit (タカラバイオ株式会社より入手) を用いて、この DNA 断片がベクター pET22b(+) にライゲーションされた。このようにして、3xFlag タグおよび制限酵素サイト SfiI(a)(b) が付加されたベクター pET22b(+) が得られた。

【0075】

ベクター pET22b(+) のシーケンスがグライナー社により解析された。シーケンスの解析のために、一般的な T7 promoter primer セットが用いられた。

【0076】

シーケンスの解析を通して目的通りに形成されたことが確認されたベクター pET22b(+) が選択された。

【0077】

PCR法により得られた液体に含まれるベクター pET22b(+) が、DNA抽出キット (プロメガ社より入手) を用いて、50マイクロリットルの蒸留水中で精製かつ回収された。このようにして回収されたベクター pET22b(+) が、SfiI制限酵素により処理された。

【0078】

一方、VHH抗体の遺伝子ライブラリに含まれるVHH抗体遺伝子断片がライゲーションされたプラスミド Vector1 が、SfiI制限酵素で処理された。このようにして、それぞれ配列番号: 08により表されるアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を含む以下の DNA (配列番号: 25) が得られた。

5' -GGCCCAGCCGGCCATGGCTGAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGA  
GTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGA  
GTGGGTCTCAACTATTAATACTGGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG

10

20

30

40

50

ACAACGCCAAGAACACCCTCTATCTGCAAATGGACAGTCTGAAATCTGAAGATACAGCCGTGTATTATTGTGCAAAAAGAT  
GGGCCATATGGCGGGTACGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCCAGCGCACCACAGCGAAGACCCAC  
GGCCTCTGCGGCCGAGGATCCGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAAGATGACG  
ATGACAAACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGATCTGCGGCC-3' (配列番号：25)

【0079】

DNAは、SfiI制限酵素により処理された。次に、このようにして処理されたDNAが、電気泳動法により回収された。回収されたDNA(配列番号：26)は、SfiI制限酵素により処理されたプラスミドに、DNAライゲーションキット(タカラバイオ株式会社より入手)を用いてライゲーションされた。

10

5'-CGGCCATGGCTGAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGAGTCTCCTG  
TGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAGTGGGTCT  
CAACTATTAATACTGGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCC  
AAGAACCCTCTATCTGCAAATGGACAGTCTGAAATCTGAAGATACAGCCGTGTATTATTGTGCAAAAAGATGGGCCATA  
TGGCGGGTACGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCCCAGCGCACCACAGCGAAGACCCACGGCCTCTG  
CGGCCGAGGATCCGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAAGATGACGATGACAAA  
CTCGAGCACCACCACCACCACCCTGATCTG-3' (配列番号：26)

【0080】

ライゲーション溶液(2.5マイクロリットル)および大腸菌DH5(ニッポンジーンより入手、25マイクロリットル)が氷上にて混合された。混合液は、6分間、氷上にて静置された。次いで、混合液は、摂氏42度で45秒間加熱された。最後に、混合液は、1分間、氷上で静置された。この手順は、一般的なヒートショック法として知られている。

20

【0081】

全量の混合液が、100マイクログラム/ミリリットルの濃度でアンピシリンを含有するLBA培地上に散布された。LBA培地は、摂氏37度で一晩静置された。

【0082】

LBA培地上に形成されたコロニーの中から、3つのコロニーが選択された。選択された3つのコロニーは、LBA培地(3ミリリットル)で一晩培養された。

30

【0083】

培養された大腸菌に含まれるプラスミドは、プラスミド抽出キット(株式会社キアゲンより入手、商品名：QIAprep spin miniprep kit)を用いて、LBA培地から抽出された。目的のVHH抗体の遺伝子がプラスミドに挿入されていることを確認するため、プラスミドの配列がライナー社によって解析された。シーケンスの解析のために、一般的なT7 promoter primerセットが用いられた。

【0084】

シーケンスの解析を通して目的通りに形成されたことが確認されたプラスミドが選択された。

40

【0085】

選択されたプラスミドを用いて、大腸菌(Competent Cell BL21 (DE3) pLysS, ライフテクノロジーズ社より入手)がヒートショック法によりトランスフェクトされた。

【0086】

トランスフェクトされた大腸菌を含有する溶液に、SOC培地(50マイクロリットル)が添加された。次いで、大腸菌は、213rpmで振とうされながら、摂氏37度で1時間、回復培養された。

【0087】

次いで、大腸菌溶液が回収された。回収された大腸菌溶液(5ミリリットル)は、LBA培地に散布された。LBA培地は、摂氏37度の温度で一晩、静置された。

50

## 【 0 0 8 8 】

L B A 培地内に形成されたコロニーの中から、1つのコロニーが選択された。選択されたコロニーは、爪楊枝でピックアップされた。ピックアップされたコロニーは、L B A 培地（3ミリリットル）中で、213rpmで振とうされながら摂氏37度の温度で培養された。このようにして、培養液を得た。

## 【 0 0 8 9 】

さらに、培養液（25ミリリットル）はL B A 培地（500ミリリットル）に混合された。600ナノメートルの波長での混合液の吸光度が0.5になるまで、混合液は摂氏37度の温度で160rpmで振とうされた。

## 【 0 0 9 0 】

吸光度が0.5となったのち、イソプロピルチオガラクトシド溶液（以下、「IPTG溶液」という）が混合液に添加された。IPTG溶液の最終濃度は1mMであった。混合液に含有される大腸菌は、摂氏37度で6時間、培養された。培養された大腸菌を回収するため、混合液は、6000rpmで10分間、摂氏4度で遠心された。

## 【 0 0 9 1 】

回収された大腸菌は、10倍の容量を有するPBSに混合された。混合液は、ボルテックスミキサーを用いて攪拌された。このようにして、大腸菌が洗浄された。次いで、混合液は、6000rpmで10分間、摂氏4度で遠心され、大腸菌を回収した。回収された大腸菌は、再度、10倍の容量を有するPBSに混合された。混合液に含有される大腸菌は、超音波を用いて破碎された。

## 【 0 0 9 2 】

大腸菌を含む破碎液は、10000rpmで15分間、摂氏4度で遠心された。上清が回収された。回収された上清は、0.45マイクロメートルフィルタを用いて濾過された。

## 【 0 0 9 3 】

濾液は、His-trap（GE Healthcare社より入手）を用いて推奨プロトコルに従って精製された。精製時には、1ミリリットルの濾液のために3マイクロリットルの全量を有する溶出バッファが用いられた。濾液に含有される緩衝液が、PD-10（GE Healthcare社より入手）を用いて、PBSに置換された。置換時には、1ミリリットルの濾液のために2.5マイクロリットルの全量を有するPBSが用いられた。このようにして、抗H12N1抗体を含有する溶液が得られた。

## 【 0 0 9 4 】

このようにして得られた溶液に含有される抗H12N1抗体は、吸光度計（スクラム社より入手、商品名：nanodrop）を用いて、280ナノメートルでの波長での吸収測定値に基づいて定量された。その結果、抗H12N1抗体の濃度は4ミリグラム/ミリリットルであった。

## 【 0 0 9 5 】

(D-1) リコンビナントHAを用いた抗H12N1抗体の表面プラズモン共鳴評価  
リコンビナントHAおよび表面プラズモン共鳴評価装置を用いて、抗H12N1抗体が以下のように評価された。表面プラズモン共鳴（以下、「SPR」という）の詳細は以下の通りである。

SPR評価装置：T200（GE Healthcare社より入手）

固定化バッファ：HBS-EP（GE Healthcare社より入手）

ランニングバッファ：HBS-EP+（GE Healthcare社より入手）

センサチップ：CM5（GE Healthcare社より入手）

固定化用試薬：N-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）および1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）

H12：インフルエンザウィルス亜型H12N5由来のリコンビナントヘマグルチニン（HA）タンパク質（Sino Biological社より入手、商品名：17718-V08H）

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 6 】

H 1 2 は、S P R 評価装置 T 2 0 0 のコントロールソフトウェアに含まれているウィザードに従って固定化された。H 1 2 の固定化のためには、5 . 0 の p H を有する酢酸溶液が用いられた。酢酸溶液は、1 マイクログラム / ミリリットルの濃度を有していた。固定化量は、2 0 0 R U にセットされた。

## 【 0 0 9 7 】

被分析物として、配列番号：0 8 により表されるアミノ酸配列からなる抗 H 1 2 N 1 抗体が用いられた。1 回目 ~ 4 回目の分析において、ランニングバッファに含有される抗 H 1 2 N 1 抗体の濃度は、それぞれ、1 0 0 0 n M、5 0 0 n M、2 5 0 n M、5 0 n M、1 0 n M、および 2 n M に調整された。図 3 A - 図 3 F は、S P R 評価装置 T 2 0 0 から得られた評価結果を示すグラフである。解離定数  $K_d$  が、評価ソフトウェア ( G E H e a l t h c a r e 社より入手 ) を用いて算出された。その結果、解離定数  $K_d$  は、2 2 . 8 n M であった。

10

## 【 0 0 9 8 】

( D - 2 ) E L I S A による他のインフルエンザウィルス亜型に対する交差性の評価  
配列番号：0 8 により表されるアミノ酸配列からなる V H H 抗体の H A 蛋白質に対する結合能力が、E L I S A 測定法により評価された。

## 【 0 0 9 9 】

配列番号：0 8 により表されるアミノ酸配列からなる V H H # 2 0 を 3 % スキムミルク P B S 中に 1 マイクログラム / ミリリットルの濃度で含有する溶液が調製された。以下、この溶液は「溶液 A」と呼ばれる。

20

## 【 0 1 0 0 】

ヘマグルチニンの 1 種 ( H 1、H 2、H 3、H 4、H 5、H 6、H 7、H 8、H 9、H 1 0、H 1 1、H 1 2、H 1 3、H 1 4、H 1 5、または H 1 6、1 マイクログラム / ミリリットル ) を含有する各 P B S 溶液が、9 6 ウェルマイクロプレート ( マキシソープ、ヌンク ) の各ウェルに注入された。各ウェルは、5 0 マイクロリットルの溶液を含んでいた。9 6 ウェルマイクロプレートは、室温で 2 時間静置され、ウェル内でウィルスを固定した。

## 【 0 1 0 1 】

0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 を含有する P B S が各ウェルに注入され、ウェルを洗浄した。P B S の p H は 7 . 4 であった。各ウェルに注入された P B S の容量は 2 0 0 マイクロリットルであった。これが 2 回、繰り返された。

30

## 【 0 1 0 2 】

3 % スキムミルクを含有する P B S ( 和光純薬工業株式会社より入手 ) が各ウェルに注入され、ヘマグルチニンをブロックした。各ウェルに注入された P B S の容量は 2 0 0 マイクロリットルであった。9 6 ウェルマイクロプレートは、室温で 1 時間静置された。

## 【 0 1 0 3 】

0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 を含有する P B S が各ウェルに注入され、ウェルを洗浄した。P B S の p H は 7 . 4 であった。各ウェルに注入された P B S の容量は 2 0 0 マイクロリットルであった。これが 2 回、繰り返された。

40

## 【 0 1 0 4 】

溶液 A が各ウェルに注入された。各ウェルに注入された溶液の容量は 5 0 マイクロリットルであった。9 6 ウェルマイクロプレートは、室温で静置された。このようにして、溶液 A に含有される V H H 抗体が、ウェルに含有されるウィルスの H A タンパク質に結合した。

## 【 0 1 0 5 】

0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 を含有する P B S が各ウェルに注入され、ウェルを洗浄した。P B S の p H は 7 . 4 であった。各ウェルに注入された P B S の容量は 2 0 0 マイクロリットルであった。これが 2 回、繰り返された。

## 【 0 1 0 6 】

50

標識抗体（シグマアルドリッチより入手、商品名：マウス内産生モノクローナル抗FLAG M2 HRP抗体）がPBSで10000倍に希釈された。このように希釈された標識抗体は、各ウェルに注入された（50マイクロリットル/ウェル）。次いで、96ウェルマイクロプレートは、1時間、暗所で静置された。

【0107】

0.05%のTween 20を含有するPBSが各ウェルに注入され、ウェルを洗浄した。PBSのpHは7.4であった。各ウェルに注入されたPBSの容量は200マイクロリットルであった。これが2回、繰り返された。

【0108】

発色剤（Thermo Scientific社より入手、商品名：1-step ULTRA TMB-ELISA）が各ウェルに注入された（50マイクロリットル/ウェル）。96ウェルマイクロプレートは30分間静置され、発色剤を抗体と反応させた。

【0109】

硫酸水溶液（1規定）が50マイクロリットル/ウェルの濃度で各ウェルに添加され、反応を停止させた。

【0110】

450ナノメートルの波長での溶液の吸光度が測定された。図4は、配列番号：08により表されるアミノ酸配列からなる抗H12N1抗体の測定結果を示すグラフである。

【0111】

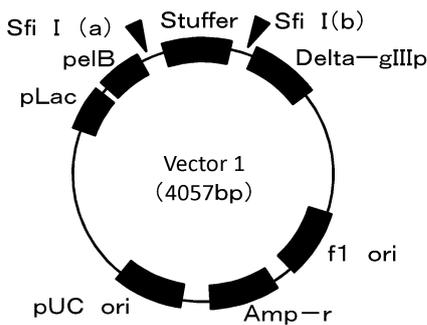
図4から理解されるように、配列番号：08により表されるアミノ酸配列からなる抗H12N1抗体は、ヘマグルチニンH12に強固に結合するが、ヘマグルチニンH12を除き、他のヘマグルチニンに対しては低い交差反応性を有する。

【産業上の利用可能性】

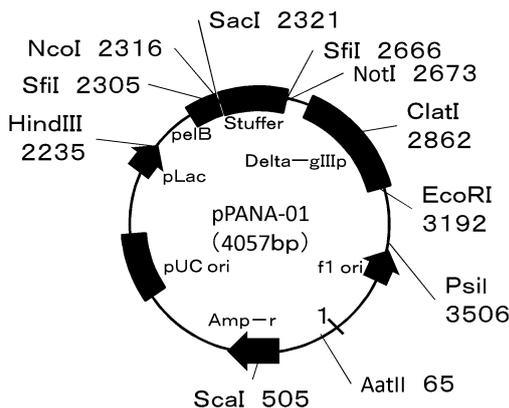
【0112】

本発明は、インフルエンザウイルスに結合する新規な抗体を提供する。

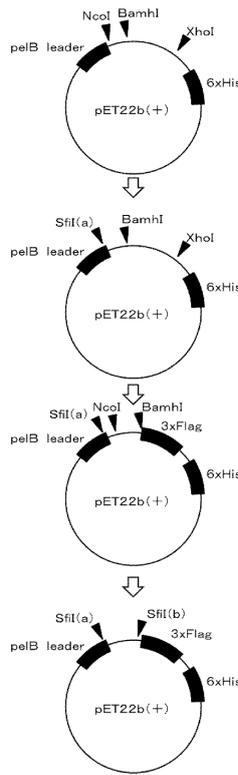
【図1A】



【図1B】



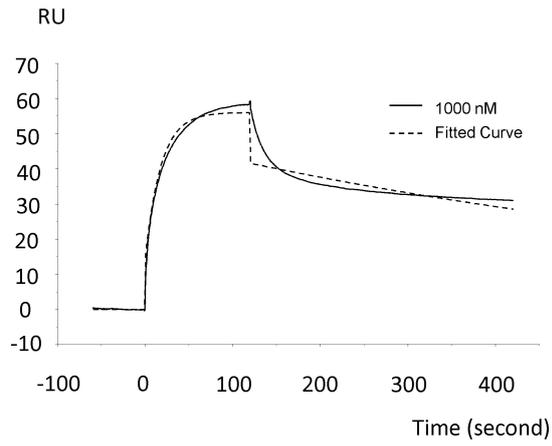
【図2】



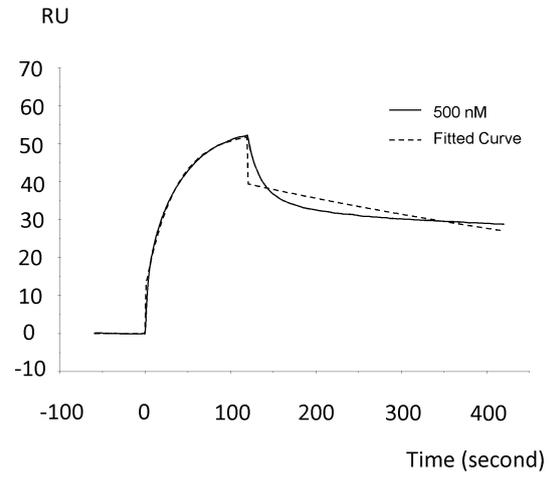
10

20

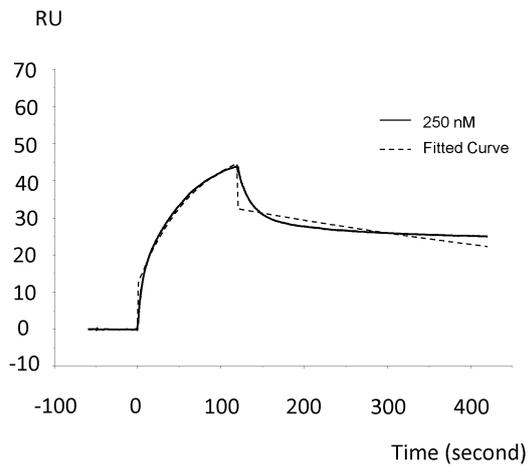
【 3 A 】



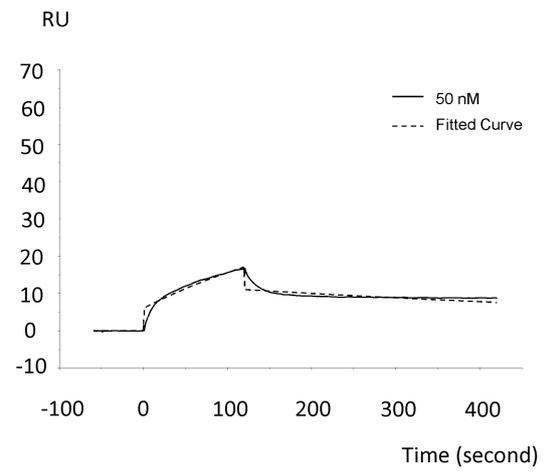
【 3 B 】



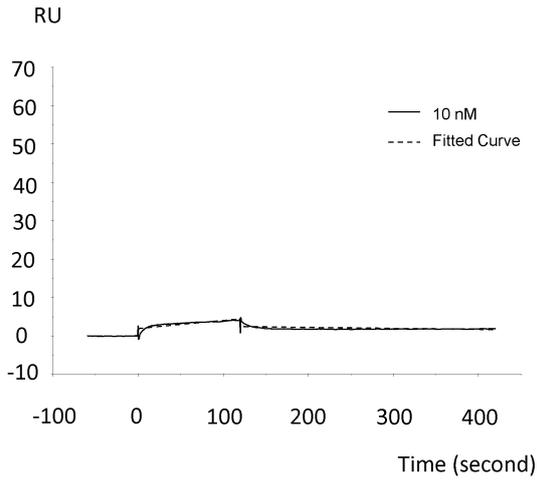
【 3 C 】



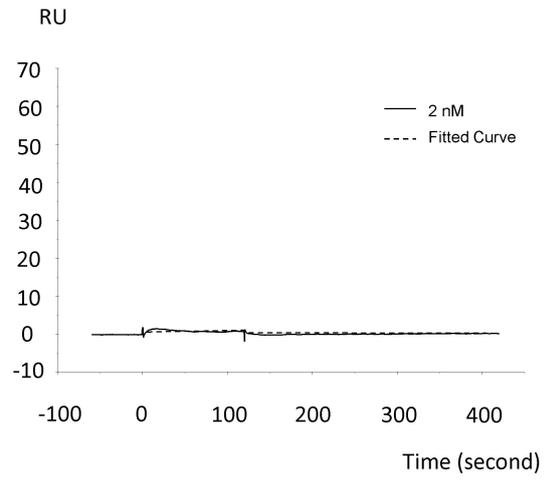
【 3 D 】



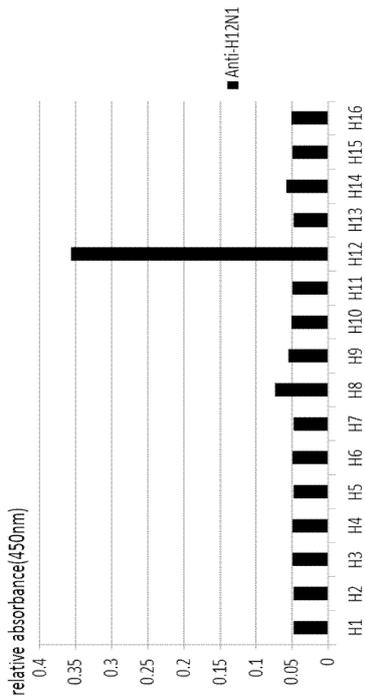
【 3 E 】



【 3 F 】



【 4 】



【配列表】

0006868763000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 村岡 純子  
大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニック株式会社内
- (72)発明者 中山 浩  
大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニック株式会社内

審査官 松浦 安紀子

- (56)参考文献 特表2014-527065(JP,A)  
特表2014-530003(JP,A)  
特表2013-520172(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00 - 16/46

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS  
/WPIX(STN)