

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7490632号
(P7490632)

(45)発行日 令和6年5月27日(2024.5.27)

(24)登録日 令和6年5月17日(2024.5.17)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 0 7 K	14/73 (2006.01)	C 0 7 K	14/73
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	14/155(2006.01)	C 0 7 K	14/155
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00
		Z N A	
請求項の数 17 (全123頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-500499(P2021-500499)	(73)特許権者	501453307
(86)(22)出願日	平成31年3月21日(2019.3.21)		ユニバーシティー オブ フロリダ リサ
(65)公表番号	特表2021-518171(P2021-518171		ーチ ファンデーション, インク.
	A)		アメリカ合衆国 3 2 6 1 1 フロリダ州
(43)公表日	令和3年8月2日(2021.8.2)		ゲインズビル グリントーホール 2 2 3
(86)国際出願番号	PCT/US2019/023422	(73)特許権者	520363948
(87)国際公開番号	WO2019/183387		エミューン・インコーポレイテッド
(87)国際公開日	令和1年9月26日(2019.9.26)		アメリカ合衆国、3 3 4 0 8・フロリダ
審査請求日	令和4年3月17日(2022.3.17)		、ジュノ・ビーチ・スイート・3 0 2、
(31)優先権主張番号	62/645,903		ユーエス・ハイウェイ・1・1 4 1 5 5
(32)優先日	平成30年3月21日(2018.3.21)	(74)代理人	100114188
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 小野 誠
前置審査		(74)代理人	100119253
			弁理士 金山 賢教
		(74)代理人	100124855
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 4 ムテインおよびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトC D 4ドメイン1およびドメイン2 (C D 4 D 1 D 2) ムテインを含むタンパク質であって、ここで、C D 4 D 1 D 2 ムテインは野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1) に対して少なくとも9 0 %同一であり、C D 4ドメイン1 (D 1) に少なくとも1つ、およびC D 4ドメイン2 (D 2) に少なくとも1つの置換を含み、
該置換のそれぞれが
(a) 非荷電アミノ酸による野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1) における塩基性アミノ酸の置換、
(b) 酸性アミノ酸による野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1) における塩基性アミノ酸の置換、
(c) 酸性アミノ酸による野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1) における非荷電アミノ酸の置換、または
(d) 置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1) におけるグリシンもしくは埋もれた疎水性側鎖を有するアミノ酸の置換
であり、
該置換のそれぞれが、非ヒト霊長類C D 4 D 1 D 2において野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1) とは非同義である位置におけるものであり、
C D 4 D 1 D 2 ムテインが、野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1) の

(a) K1N、K2E、K2N、K2T、L5Y、L5I、L5E、L5W、L5V、L5F、L5T、K7E、K8E、T15N、T15E、T17N、T17E、S23N、S23T、S23K、S23Y、S23A、A55V、A55I、A55P、A55L、A55M、A55F、A55Y、A55W、A55T、I70E、I70L、I70V、K72S、K75E、K75Q、Q94E、L96V、L96Q、L96T、L96I、L96Y、Q110E、Q110H、L116F、L116W、V128I、V128L、R134G、R134T、K142R、K142G、K142S、V146I、V146L、V146F、V146W、N164D、N164H、N164R、N164E、K167T、K167R、K167L、V168I、V168L、およびV176I；

(b) K1N、K2E、K2N、K2T、L5Y、L5I、L5E、L5W、L5V、L5F、L5T、K7E、K8E、T15N、T15E、T17N、T17E、S23N、S23T、S23K、S23Y、S23A、A55V、A55I、A55P、A55L、A55M、A55F、A55Y、A55W、A55T、I70E、I70L、I70V、K72S、K75E、K75Q、Q94E、L96V、L96Q、L96T、L96I、L96Y、Q110E、Q110H、R134G、R134T、K142R、K142G、K142S、N164D、N164H、N164R、N164E、K167T、K167R、およびK167L；

(c) G6A、S23N、A55V、K72S、K75E、K75Q、Q94E、Q110E、V128L、R134G、V146I、N164D、K167T、およびV168L；

(d) K1N、K2N、K2T、K2E、K7E、K21N、K22T、K46T、R59Q、K75Q、K75E、R131T、R131Q、R134T、R134G、K142、K142G、K142S、K166N、K166Q、K166H、K166E、K167T、K171Q、K171S、K171N、およびK171E；

(e) A102V；または

(f) G140A、K1N、K2N、K2E、K2T、G6A、K7E、K8E、T15N、T17E、K21N、K22T、S23N、S23T、A55V、I70E、K72S、K75E、Q94E、A102V、Q110E、L116F、L116W、V128L、R134R、G140A、V146I、V146L、V146F、V146W、N164D、K166N、K167T、V168L、もしくはV176I

を少なくとも1つ含むタンパク質。

【請求項2】

ヒトCD4ドメイン1およびドメイン2（CD4 D1D2）ムテインを含むタンパク質であって、ここで、CD4 D1D2ムテインは野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）に対して少なくとも90%同一であり、CD4ドメイン1（D1）に少なくとも1つ、およびCD4ドメイン2（D2）に少なくとも1つの置換を含み、

該置換のそれぞれが

（a）非荷電アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の置換、

（b）酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の置換、

（c）酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における非荷電アミノ酸の置換、または

（d）置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるグリシンもしくは埋もれた疎水性側鎖を有するアミノ酸の置換

であり、

該置換のそれぞれが、非ヒト霊長類CD4 D1D2において野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）とは非同一である位置におけるものであり、

CD4 D1D2ムテインがK2E、G6A、K7E、K8E、T17N、T17E、

10

20

30

40

50

S 2 3 N、S 2 3 T、A 5 5 V、A 5 5 I、I 7 0 E、K 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、L 1 1 6 F、V 1 2 8 L、R 1 3 4 G、K 1 4 2 R、V 1 4 6 I、V 1 4 6 F、N 1 6 4 D、K 1 6 7 T、V 1 6 8 LおよびV 1 7 6 I置換の少なくとも1つを含むタンパク質。

【請求項3】

ヒトCD4ドメイン1およびドメイン2（CD4 D1D2）ムテインを含むタンパク質であって、ここで、CD4 D1D2ムテインは野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）に対して少なくとも90%同一であり、CD4ドメイン1（D1）に少なくとも1つ、およびCD4ドメイン2（D2）に少なくとも1つの置換を含み、

該置換のそれぞれが

（a）非荷電アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の置換、

（b）酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の置換、

（c）酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における非荷電アミノ酸の置換、または

（d）置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるグリシンもしくは埋もれた疎水性側鎖を有するアミノ酸の置換

であり、

該置換のそれぞれが、非ヒト霊長類CD4 D1D2において野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）とは非同一である位置におけるものであり、

CD4 D1D2ムテインがG 6 A、S 2 3 N、A 5 5 V、K 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、V 1 2 8 L、R 1 3 4 G、V 1 4 6 I、N 1 6 4 D、K 1 6 7 TおよびV 1 6 8 L置換の少なくとも1つを含むタンパク質。

【請求項4】

CD4 D1D2ムテインがK 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、V 1 2 8 L、R 1 3 4 G、V 1 4 6 I、N 1 6 4 D、K 1 6 7 TおよびV 1 6 8 L置換の少なくとも1つを含む、請求項3記載のタンパク質。

【請求項5】

ヒトCD4ドメイン1およびドメイン2（CD4 D1D2）ムテインを含むタンパク質であって、ここで、CD4 D1D2ムテインは野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）に対して少なくとも90%同一であり、CD4ドメイン1（D1）に少なくとも1つ、およびCD4ドメイン2（D2）に少なくとも1つの置換を含み、

該置換のそれぞれが

（a）非荷電アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の置換、

（b）酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の置換、

（c）酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における非荷電アミノ酸の置換、または

（d）置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるグリシンもしくは埋もれた疎水性側鎖を有するアミノ酸の置換

であり、

該置換のそれぞれが、非ヒト霊長類CD4 D1D2において野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）とは非同一である位置におけるものであり、

CD4 D1D2ムテインが、以下の置換：

（1）A 5 5 VおよびK 7 2 S；

（2）A 5 5 VおよびK 7 5 E；

10

20

30

40

50

- (3) A 5 5 V および K 7 5 Q ;
- (4) A 5 5 V および Q 9 4 E ;
- (5) A 5 5 V および Q 1 1 0 E ;
- (6) A 5 5 V および L 1 1 6 F ;
- (7) A 5 5 V および V 1 2 8 L ;
- (8) A 5 5 V および R 1 3 4 G ;
- (9) A 5 5 V および V 1 4 6 I ;
- (10) A 5 5 V および N 1 6 4 D ;
- (11) A 5 5 V および K 1 6 7 T ;
- (12) A 5 5 V および V 1 6 8 L ;
- (13) S 2 3 N および K 7 2 S ;
- (14) S 2 3 N および K 7 5 E ;
- (15) S 2 3 N および K 7 5 Q ;
- (16) S 2 3 N および Q 9 4 E ;
- (17) S 2 3 N および Q 1 1 0 E ;
- (18) S 2 3 N および L 1 1 6 F ;
- (19) S 2 3 N および V 1 2 8 I ;
- (20) S 2 3 N および R 1 3 4 G ;
- (21) S 2 3 N および V 1 4 6 I ;
- (22) S 2 3 N および N 1 6 4 D ;
- (23) S 2 3 N および K 1 6 7 T ; または
- (24) S 2 3 N および V 1 6 8 L

10

20

を含むタンパク質。

【請求項 6】

C D 4 D 1 D 2 ムテインが G 6 A、S 2 3 N、A 5 5 V、V 1 2 8 L、R 1 3 4 G およ
び V 1 6 8 L の置換を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 7】

C D 4 D 1 D 2 ムテインが (a) プロリンによる I 7 6 の置換 (I 7 6 P) を含まない、または、(b) バリンによる F 9 8 の置換 (F 9 8 V) を含まない、請求項 1 ～ 6 のい
ずれか一項に記載のタンパク質。

30

【請求項 8】

霊長類レンチウイルスエンベロープ糖タンパク質結合部分を更に含み、該結合部分が少
なくとも 1 つのスルホチロシンを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9】

該結合部分が配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 または配
列番号 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 記載のタンパク質。

【請求項 10】

免疫グロブリン F c ドメインを更に含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のタンパ
ク質。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む
単離された核酸。

40

【請求項 12】

請求項 1 1 記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 13】

発現ベクターがウイルスベクターである、請求項 1 2 記載の発現ベクター。

【請求項 14】

ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターである、請求項 1 3 記載の
発現ベクター。

【請求項 15】

50

請求項 12 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 16】

請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のタンパク質を含む医薬組成物。

【請求項 17】

HIV 感染の治療における使用のための、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本特許出願は米国仮特許出願第 62 / 645, 903 号 (2018 年 3 月 21 日付け出願) に基づく優先権の利益を主張するものである。該優先権出願の全開示の全体をあらゆる目的で参照により本明細書に組み入れることとする。

【0002】

米国政府の援助に関する陳述

本発明は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) により授与された助成金番号 AI091476、AI129868 および AI126623 に基づく米国政府の援助によりなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、全般的には、CD4 を含むタンパク質、および HIV の治療におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0004】

許容宿主 CD4⁺ T 細胞上で発現されるヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する膜貫通受容体である CD4 に由来するポリペプチドは、HIV 感染を抑制するために使用されうる。そのような CD4 由来ポリペプチドは、ウイルス粒子に結合して許容宿主細胞上の CD4 の認識を妨げることにより、HIV 感染を遮断または「中和」するように仲介しうる。CD4 の可溶性形態 (sCD4) は、HIV 感染を抑制するためのアプローチとして 1980 年代に最初に提示された (Hussey, R. E. ら (1988) NATURE, 331 (6151): 78-81; Deen, K. C. ら (1988) NATURE, 331 (6151): 82-4; Smith, D. H. ら (1987) SCIENCE, 238 (4834): 1704-7; Fisher, R. A. ら (1988) NATURE, 331 (6151): 76-8; Watanabe, M. ら (1989) NATURE, 337 (6204): 267-70; Trauneker, A. ら (1988) NATURE, 331 (6151): 84-6)。しかし、血漿中の sCD4 の短い半減期は、HIV 感染を治療するための組換えタンパク質治療薬としてのその使用に対する熱意をくじいた (Watanabe ら (1989), 前掲; Schooley, R. T. ら (1990) ANN. INTERN. MED., 112 (4): 247-53)。更に、患者から直接分離された HIV 株 (すなわち、一次分離株) の相当な割合が sCD4 による中和に対して耐性である (Ashkenazi, A. ら (1991) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 88 (16): 7056-60; Daar, E. S. ら (1990) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 87 (17): 6574-8; O'Brien, W. A. ら (1992) J. VIROL., 66 (5): 3125-30)。

【0005】

sCD4 の半減期のこれまでの改善は、免疫グロブリン (Ig) 結晶化可能フラグメント (Fc) を加えることにより行われている (Capon, D. J. ら (1989) NATURE, 337 (6207): 525-31; Chamow, S. M. ら (1992) INT. J. CANCER SUPPL., 7: 69-72; Byrn, R. A. ら (1

10

20

30

40

50

990) NATURE, 344 (6267): 667-70)。免疫グロブリンFcを含有するsCD4の形態はCD4-Igと称される。このアプローチにもかかわらず、ヒトCD4-Igの半減期は、通常の抗体で予想されるものに尚も達していない(Hodges, T. L. ら(1991) ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER., 35(12): 2580-6; Kahn, J. O. ら(1990) ANN. INTERN. MED., 112(4): 254-61; Chamow, S. M. ら(1994) BIOCONJUG. CHEM., 5(2): 133-40)。CD4-Igの最適とは言えない薬物動態学的特性は治療状況におけるその有用性を制限している。

【0006】

これまでに種々の開発がなされているが、HIVおよびエイズの治療および処置のための新規かつ有効な療法が尚も絶えず必要とされている。

【発明の概要】

【0007】

発明の概括

本発明は、天然に存在するヒトCD4 D1D2 (すなわち、ヒトCD4ドメイン1およびCD4ドメイン2) を含むタンパク質より高い安定性および／または活性を有するヒトCD4ドメイン1およびCD4ドメイン2の両方(CD4 D1D2) を含むタンパク質の知見に部分的に基づいている。ある実施形態においては、該タンパク質は、天然に存在するヒトCD4 D1D2を含むタンパク質と比較して、例えば熱スキャンアッセイにおける動的光散乱(DLS)により測定された場合の、より高い凝集温度、および／またはより長い血漿半減期を示す。更に、本明細書に記載されているタンパク質はヒト対象におけるHIVの治療に好適でありうると想定される。

【0008】

1つの態様においては、本発明は、ヒトCD4ドメイン1およびドメイン2(CD4 D1D2) ムテインを含むタンパク質を提供し、ここで、CD4 D1D2 ムテインは野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) に対して少なくとも90%同一であり、

a. 非荷電アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) における塩基性アミノ酸の置換、

b. 酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) における塩基性アミノ酸の置換、

c. 酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) における非荷電アミノ酸の置換、または

d. 置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) におけるグリシンもしくは埋もれた疎水性側鎖を有するアミノ酸の置換

のうちの少なくとも1つの置換を含み、該置換は、非ヒト霊長類CD4 D1D2において野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) とは非同一である位置におけるものである。

【0009】

もう1つの態様においては、本発明は、CD4 D1D2 ムテインが野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) に対して少なくとも90%同一であり、野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のK1、K2、V4、L5、G6、K7、K8、D10、T11、V12、L14、T15、T17、A18、S19、Q20、K21、K22、S23、I24、Q25、H27、N30、N32、I34、K35、I36、L37、N39、G41、S42、L44、K46、P48、K50、L51、N52、D53、A55、D56、R58、R59、S60、L61、Q64、G65、N66、F67、P68、L69、I70、I71、K72、K73、L74、K75、I76、E77、D80、T81、V86、E87、D88、Q89、E91、V93、Q94、L95、L96、V97、F98、G99、T101、A102、N103、S104、D105、H107、L108、Q110、S113、L114、L116、T117、L118、S120、P121、P122、G123、S124、S125、V128、Q129、C130

、 R 1 3 1、 S 1 3 2、 P 1 3 3、 R 1 3 4、 G 1 3 5、 N 1 3 7、 I 1 3 8、 Q 1 3 9
、 G 1 4 0、 G 1 4 1、 K 1 4 2、 T 1 4 3、 L 1 4 4、 S 1 4 5、 V 1 4 6、 S 1 4 7
、 L 1 4 9、 E 1 5 0、 L 1 5 1、 Q 1 5 2、 D 1 5 3、 G 1 5 5、 T 1 5 6、 W 1 5 7
、 T 1 5 8、 T 1 6 0、 V 1 6 1、 L 1 6 2、 Q 1 6 3、 N 1 6 4、 Q 1 6 5、 K 1 6 6
、 K 1 6 7、 V 1 6 8、 E 1 6 9、 F 1 7 0、 K 1 7 1、 I 1 7 2、 D 1 7 3、 I 1 7 4
、 V 1 7 5、 V 1 7 6 または A 1 7 8 に対応する位置に少なくとも1つの置換を含む、 C
D 4 D 1 D 2 ムテインを含むタンパク質を提供する。

【0010】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、非ヒト霊長類 C D 4 D 1 D 2
における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）
におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、
C D 4 D 1 D 2 ムテインは、例えば非ヒト霊長類 C D 4 D 1 D 2 における対応位置にお
けるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）の K 1、K 2、V 4、
G 6、K 7、D 1 0、T 1 1、V 1 2、T 1 5、T 1 7、A 1 8、S 1 9、Q 2 0、K 2
1、K 2 2、S 2 3、I 2 4、Q 2 5、H 2 7、N 3 0、N 3 2、I 3 4、K 3 5、N 3
9、G 4 1、S 4 2、L 4 4、K 4 6、P 4 8、K 5 0、L 5 1、N 5 2、D 5 3、A 5
5、D 5 6、R 5 8、R 5 9、S 6 0、L 6 1、Q 6 4、G 6 5、N 6 6、P 6 8、L 6
9、I 7 0、K 7 2、K 7 3、L 7 4、K 7 5、I 7 6、E 7 7、D 8 0、T 8 1、E 8
7、D 8 8、Q 8 9、E 9 1、Q 9 4、L 9 6、G 9 9、T 1 0 1、A 1 0 2、N 1 0 3
、 S 1 0 4、D 1 0 5、H 1 0 7、L 1 0 8、Q 1 1 0、S 1 1 3、T 1 1 7、S 1 2 0
、 P 1 2 2、G 1 2 3、S 1 2 4、S 1 2 5、V 1 2 8、Q 1 2 9、C 1 3 0、R 1 3 1
、 S 1 3 2、R 1 3 4、G 1 3 5、N 1 3 7、I 1 3 8、Q 1 3 9、G 1 4 0、G 1 4 1
、 K 1 4 2、T 1 4 3、L 1 4 4、S 1 4 5、V 1 4 6、S 1 4 7、E 1 5 0、L 1 5 1
、 Q 1 5 2、D 1 5 3、T 1 5 6、W 1 5 7、T 1 5 8、T 1 6 0、V 1 6 1、L 1 6 2
、 Q 1 6 3、N 1 6 4、Q 1 6 5、K 1 6 6、K 1 6 7、V 1 6 8、E 1 6 9、F 1 7 0
、 K 1 7 1、I 1 7 2、D 1 7 3、I 1 7 4、V 1 7 5 または A 1 7 8 に対応する位置に
おける少なくとも1つの置換を含む。

【0011】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、類人猿、旧世界ザルまたは新
世界ザル C D 4 D 1 D 2 における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4
D 1 D 2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、あ
る実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、例えば類人猿、旧世界ザルまたは
新世界ザル C D 4 D 1 D 2 における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4
D 1 D 2（配列番号1）の K 1、K 2、K 7、D 1 0、T 1 1、T 1 5、T 1 7、A 1 8
、 S 1 9、Q 2 0、K 2 1、K 2 2、S 2 3、I 2 4、Q 2 5、H 2 7、N 3 0、N 3 2
、 I 3 4、N 3 9、G 4 1、S 4 2、L 4 4、K 4 6、P 4 8、N 5 2、D 5 3、A 5 5
、 R 5 9、L 6 1、Q 6 4、G 6 5、N 6 6、P 6 8、L 6 9、I 7 0、K 7 2、K 7 3
、 L 7 4、K 7 5、I 7 6、D 8 0、E 8 7、D 8 8、Q 8 9、Q 9 4、L 9 6、A 1 0
2、N 1 0 3、S 1 0 4、Q 1 1 0、S 1 1 3、T 1 1 7、S 1 2 0、S 1 2 4、Q 1 2
9、R 1 3 1、R 1 3 4、N 1 3 7、Q 1 3 9、G 1 4 0、G 1 4 1、K 1 4 2、T 1 4
3、L 1 4 4、S 1 4 5、V 1 4 6、S 1 4 7、E 1 5 0、L 1 5 1、Q 1 5 2、T 1 5
6、W 1 5 7、T 1 5 8、T 1 6 0、V 1 6 1、L 1 6 2、N 1 6 4、Q 1 6 5、K 1 6
6、K 1 6 7、V 1 6 8、K 1 7 1、D 1 7 3、I 1 7 4 または V 1 7 5 に対応する位置
における少なくとも1つの置換を含む。

【0012】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、類人猿または旧世界ザル C D 4
D 1 D 2 における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列
番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態にお
いては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、例えば類人猿または旧世界ザル C D 4 D 1 D 2 に
おける対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）の

K 2、D 10、T 15、T 17、S 19、Q 20、K 21、K 22、S 23、I 24、Q 25、N 30、N 32、I 34、N 39、P 48、N 52、D 53、A 55、R 59、G 65、N 66、P 68、L 69、D 80、E 87、D 88、Q 89、Q 94、Q 110、T 117、S 120、S 124、Q 129、R 134、G 140、K 142、L 144、S 147、L 151、T 156、W 157、T 160、V 161、L 162、N 164、K 166またはK 167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

【0013】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、類人猿 C D 4 D 1 D 2 における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、例えば類人猿 C D 4 D 1 D 2 における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）のK 1、T 15、T 17、Q 20、I 34、N 52、D 53、A 55、R 59、G 65、P 68、E 87、D 88、T 117、S 120、R 134、G 140、S 147、W 157、T 160、N 164またはK 166に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

10

【0014】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、旧世界ザル C D 4 D 1 D 2 における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、例えば旧世界ザル C D 4 D 1 D 2 における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）のK 2、D 10、T 15、T 17、S 19、Q 20、K 21、K 22、S 23、I 24、Q 25、N 30、N 32、I 34、N 39、P 48、N 52、A 55、R 59、N 66、P 68、L 69、D 80、D 88、Q 89、Q 94、Q 110、S 124、Q 129、R 134、G 140、K 142、L 144、S 147、L 151、T 156、T 160、V 161、L 162、N 164、K 166またはK 167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

20

【0015】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、置換されるアミノ酸より大きな体積、例えば側鎖体積を有する疎水性アミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）におけるグリシンもしくは疎水性アミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、例えば置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）のL 5、G 6、V 12、L 14、A 18、I 24、I 36、L 37、L 44、L 51、A 55、G 65、F 67、P 68、L 69、V 93、G 99、I 71、L 74、V 86、V 93、L 95、L 96、V 97、F 98、A 102、L 108、L 114、L 116、L 118、P 121、V 128、P 133、I 138、G 141、L 144、V 146、L 149、G 155、V 161、V 168、F 170、I 172、I 174またはV 176に対応する位置におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、例えば置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）のG 6、A 55、L 116、V 128、V 146、V 168またはV 176に対応する位置におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、例えば置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1）のG 6、I 24、L 44、L 51、A 55、L 69、G 99、A 102、V 128、G 141、V 146、V 161およびV 168に対応する位置におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

30

40

【0016】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、正味正電荷の低減を伴うタンパク質を与える少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、非荷電アミノ酸による、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号1

50

）における塩基性アミノ酸の、少なくとも1つの置換、または酸性アミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、例えばG、A、S、T、N、Q、HまたはYによる、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、K7、K21、K22、K35、K46、K50、R58、R59、K72、K75、R131、R134、K142、K166、K167またはK171に対応する位置におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

【0017】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、酸性アミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における非荷電アミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、例えばDまたはEによる、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のV4、T11、T15、T17、S19、Q20、S23、Q25、H27、N30、N32、I34、S42、P48、N52、S60、L61、Q64、N66、I70、I76、T81、Q89、Q94、T101、N103、S104、H107、Q110、S113、T117、S120、P122、G123、S124、S125、Q129、G135、N137、Q139、G140、T143、S145、S147、L151、Q152、T156、T158、T160、L162、Q163、N164、Q165、V175またはA178に対応する位置におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

【0018】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、CD4 D1ドメインにおける少なくとも1つの置換、例えば、本明細書に記載されている置換の1以上、およびCD4 D2ドメインにおける少なくとも1つの置換、例えば、本明細書に記載されている置換の1以上を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の置換を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）に対して少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

【0019】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における表面露出側鎖を有するアミノ酸位置における10、9、8、7、6、5、4、3、2個または1個より少ない置換を含む。

【0020】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK2、G6、K8、T15、T17、K21、S23、A55、I70、K72、K75、Q94、L96、Q110、L116、V128、R134、K142、V146、N164、K166、K167、V168またはV176に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

【0021】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、L5、G6、K7、K8、T15、T17、K21、K22、S23、A55、I70、K72、K75、Q94、L96、G99、A102、Q110、R134、K142、N164、K166、K167またはK171に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

【0022】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のG6、S23、A55、K72、K75、Q94、L96、Q110、L116、V128、R134、V146、N164、K167、V168またはV176に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

【0023】

10

20

30

40

50

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のL5、K8、S23、A55、K75、Q94、L96、Q110、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。例えば、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のG6、S23、A55、K72、K75、Q94、L96、Q110、V128、R134、V146、N164、K167またはV168に対応する位置における少なくとも1つの置換、野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のL5、S23、A55、L96、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換、野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のK72、K75、Q94、Q110、L116、V128、R134、V146、N164、K167、V168またはV176に対応する位置における少なくとも1つの置換、野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のS23、A55、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換、あるいは野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のS23、A55、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換、野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のA55、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含みうる。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のG6、S23、A55、V128、V146またはV168に対応する位置における少なくとも1つの置換、野生型ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) のK2、K7、K8、T17、I70、K72、Q94、Q110、R134、K142、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

【0024】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の位置に置換を含む：A55およびK72；A55およびK75；A55およびQ94；A55およびQ110；A55およびL116；A55およびV128；A55およびR134；A55およびV146；A55およびN164；A55およびK167；A55およびV168；S23およびK72；S23およびK75；S23およびQ94；S23およびQ110；S23およびL116；S23およびV128；S23およびR134；S23およびV146；S23およびN164；S23およびK167；S23およびV168；G6およびK72；G6およびK75；G6およびQ94；G6およびQ110；G6およびL116；G6およびV128；G6およびR134；G6およびV146；G6およびN164；G6およびK167；G6およびV168；K72およびK75；K72およびQ94；K72およびQ110；K72およびL116；K72およびV128；K72およびR134；K72およびV146；K72およびN164；K72およびK167；K72およびV168；K75およびQ94；K75およびQ110；K75およびL116；K75およびV128；K75およびR134；K75およびV146；K75およびN164；K75およびK167；K75およびV168；Q94およびQ110；Q94およびL116；Q94およびV128；Q94およびR134；Q94およびV146；Q94およびN164；Q94およびK167；Q94およびV168；Q110およびL116；Q110およびV128；Q110およびR134；Q110およびV146；Q110およびN164；Q110およびK167；Q110およびV168；L116およびV128；L116およびR134；L116およびV146；L116およびN164；L116およびK167；L116およびV168；V128およびR134；V128およびV146；V128およびN164；V128およびK167；V128およびV168；V146およびN164；V146およびK167；V146およびV168；またはN164およびK167。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の位置に置換を含む：S23、A55およびK72；S23、A55およびK75；S23、A55およびQ94；S23、A55およびQ110；S23、A55およびL116；S23、A55およびV128；S23、A55およびR134；S23、A55およびV146；S23、A55およびN164；S23、A55および

10

20

30

40

50

K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3 および K 7 2 ; G 6、S 2 3 および K 7 5 ; G 6、S 2 3 および Q 9 4 ; G 6、S 2 3 および Q 1 1 0 ; G 6、S 2 3 および L 1 1 6 ; G 6、S 2 3 および V 1 2 8 ; G 6、S 2 3 および R 1 3 4 ; G 6、S 2 3 および V 1 4 6 ; G 6、S 2 3 および N 1 6 4 ; G 6、S 2 3 および K 1 6 7 ; G 6、S 2 3 および V 1 6 8 ; G 6、A 5 5 および K 7 2 ; G 6、A 5 5 および K 7 5 ; G 6、A 5 5 および Q 9 4 ; G 6、A 5 5 および Q 1 1 0 ; G 6、A 5 5 および L 1 1 6 ; G 6、A 5 5 および V 1 2 8 ; G 6、A 5 5 および R 1 3 4 ; G 6、A 5 5 および V 1 4 6 ; G 6、A 5 5 および N 1 6 4 ; G 6、A 5 5 および K 1 6 7 ; G 6、A 5 5 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および K 7 2 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および K 7 5 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および Q 9 4 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および Q 1 1 0 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および L 1 1 6 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および V 1 2 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および R 1 3 4 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および V 1 4 6 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および N 1 6 4 ; G 6、S 2 3、A 5 5 および K 1 6 7 ; または G 6、S 2 3、A 5 5 および V 1 6 8。

【0025】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の位置に置換を含む：R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 2、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0 および R 1 3 4 ; Q 9 4、Q 1 1 0 および N 1 6 4 ; Q 9 4、Q 1 1 0 および V 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; K 7 2、K 7 5 および R 1 3 4 ; K 7 2、K 7 5 および N 1 6 4 ; K 7 2、K 7 5 および K 1 6 7 ; K 7 2、K 7 5 および V 1 2 8、V 1 6 8 および R 1 3 4 ; V 1 2 8、V 1 6 8 および N 1 6 4 ; V 1 2 8、V 1 6 8 および K 1 6 7 ; V 1 2 8、V 1 6 8 および V 1 4 6 ; V 1 2 8、V 1 6 8 および L 1 1 6 ; V 1 2 8、V 1 6 8 および K 7 2 ; V 1 2 8、V 1 6 8 および K 7 5 ; V 1 2 8、V 1 6 8 および Q 9 4 ; V 1 2 8、V 1 6 8 および Q 1 1 0 ; V 1 4 6、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; V 1 4 6、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; R 1 3 4、K 1 4 2、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; I 7 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 2、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 2、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; V 1 2 8、V 1 6 8、R 1 3 4 および K 7 2 ; V 1 2 8、V 1 6 8、R 1 3 4 および K 7 5 ; V 1 2 8、V 1 6 8、R 1 3 4 および Q 9 4 ; V 1 2 8、V 1 6 8、R 1 3 4 および Q 1 1 0 ; V 1 2 8、V 1 6 8、R 1 3 4 および L 1 1 6 ; V 1 2 8、V 1 6 8、R 1 3 4 および V 1 4 6 ; V 1 2 8、V 1 6 8、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; V 1 2 8、V 1 6 8、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; V 1 2 8、V 1 6 8、V 1 4 6 および K 7 2 ; V 1 2 8、V 1 6 8、V 1 4 6 および K 7 5 ; V 1 2 8、V 1 6 8、V 1 4 6 および Q 9 4 ; V 1 2 8、V 1 6 8、V 1 4 6 および Q 1 1 0 ; V 1 2 8、V 1 6 8、V 1 4 6 および N 1 6 4 ; または V 1 2 8、V 1 6 8、V 1 4 6 および K 1 6 7。

【0026】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の位置に置換を含む：G 6、A 5 5、V 1 2 8 および V 1 6 8 ; G 6、A 5 5、V 1 4 6 および V 1 6 8 ; G 6、A 5 5、V 1 2 8 および V 1 4 6 ; G 6、A 5 5、V 1 2 8、V 1 4 6 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、V 1 2 8 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、V 1 2 8、V 1 4 6 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、V 1 2 8、R 1 3 4、V 1 4 6 および V 1 6 8 ; A 5 5、V 1 2 8、V 1 6 8 および K 7 2 ; A 5 5、V 1 2 8、V 1 6 8 および K 7 5 ; A 5 5、V 1 2 8、V 1 6 8 および Q 9 4 ; A 5 5、V 1 2 8、V 1 6 8 および Q 1 1 0 ; A 5 5、V 1 2 8、V 1 6 8 および L 1 1 6 ; A 5 5、V 1 2 8、V 1 6 8 および R 1 3 4 ; A 5 5、V 1 2 8、V 1 6 8 および V 1 4 6 ; A 5 5、V 1 2 8、V 1 6 8 および K 1 6 7 ; S 2 3、V 1 2 8、V 1 6 8 および K 7 2 ; S 2 3、V 1 2 8、V 1 6

8 および K 7 5 ; S 2 3、V 1 2 8、V 1 6 8 および Q 9 4 ; S 2 3、V 1 2 8、V 1 6
8 および Q 1 1 0 ; S 2 3、V 1 2 8、V 1 6 8 および L 1 1 6 ; S 2 3、V 1 2 8、V
1 6 8 および R 1 3 4 ; S 2 3、V 1 2 8、V 1 6 8 および V 1 4 6 ; S 2 3、V 1 2 8
、V 1 6 8 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5
、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、R 1 3 4 および K 1 6
7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、Q 9 4、R 1
3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5
5、Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、K 7 2、K 7 5、R 1 3 4 および K 1
6 7 ; S 2 3、K 7 2、K 7 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、
K 7 2、K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、R 1 3 4
、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1
6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、R 1 3 4、N 1 6 4 お
よび K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および
K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 お
よび K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、L 9 6、Q 1 1 0、R 1 3 4
、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0
、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1
2 8、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、
R 1 3 4、V 1 4 6 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1
0、R 1 3 4、K 1 6 7、V 1 6 8 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1
0、V 1 2 8、R 1 3 4、K 1 6 7、V 1 6 8 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9
4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、V 1 4 6、K 1 6 7、V 1 6 8 ; S 2 3、A 5 5、
K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、N 1 6 4、K 1 6 7、V 1 6
8 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、V 1 4
6、N 1 6 4、K 1 6 7、V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、
Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5
、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、V 1 4 6 および K 1 6 7 ; G 6、S 2 3、A 5 5、K 7
2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、K 1 6 7、V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5
、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、K 1 6 7、V 1 6 8 ; G 6
、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、V 1 4 6
、K 1 6 7、V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V
1 2 8、R 1 3 4、N 1 6 4、K 1 6 7、V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K
7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、V 1 4 6、N 1 6 4、K 1 6 7、V 1 6
8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、V 1 2 8 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、
K 7 5、V 1 2 8 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、Q 9 4、V 1 2 8 および V 1
6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、Q 1 1 0、V 1 2 8 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5
5、V 1 2 8、N 1 6 4 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、V 1 2 8、K 1 6 7 お
よび V 1 6 8 ; A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; L 5、S 2 3、A 5 5、L
9 6 および R 1 3 4 ; L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6 および N 1 6 4 ; L 5、S 2 3、A
5 5、L 9 6 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; G
6、S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、L 9 6、R
1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; L 5、S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K
1 6 7 ; または L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7。

【0027】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の位置に置換を含む：A 5
5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K
1 6 7 ; L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; A 5 5、
V 1 2 8 および V 1 6 8 ; S 2 3、A 5 5、V 1 2 8 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A
5 5、V 1 2 8 および V 1 6 8 ; G 6、S 2 3、A 5 5、V 1 2 8、V 1 4 6 および V 1
6 8 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;

10

20

30

40

50

G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、L 9 6、Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7
; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1
6 7 ; S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; または S 2 3、A 5
5、K 7 2、K 7 5、V 1 2 8、R 1 3 4、K 1 6 7 および V 1 6 8。

【0028】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の位置に置換を含む：R 1
3 4 および K 1 6 7 ; R 1 3 4 および N 1 6 4 ; N 1 6 4 および K 1 6 7 ; A 5 5 および
R 1 3 4 ; A 5 5 および N 1 6 4 ; A 5 5 および K 1 6 7 ; S 2 3 および R 1 3 4 ; S 2
3 および N 1 6 4 ; S 2 3 および K 1 6 7 ; K 7 2 および K 7 5 ; K 7 5 および R 1 3 4
; K 7 5 および N 1 6 4 ; K 7 5 および K 1 6 7 ; K 7 5 および Q 9 4 ; K 7 5 および Q
1 1 0 ; S 2 3 および K 7 5 ; A 5 5 および K 7 5 ; Q 9 4 および Q 1 1 0 ; S 2 3 およ
び A 5 5 ; L 5 および S 2 3 ; K 2 および N 1 6 4 ; K 2 および K 1 6 7 ; K 7 および K
8 ; K 7 および A 5 5 ; K 8 および N 1 6 4 ; K 8 および K 1 6 7 ; K 8 および A 5 5 ;
T 1 7 および N 1 6 4 ; T 1 7 および K 1 6 7 ; I 7 0 および N 1 6 4 ; I 7 0 および K
1 6 7 ; A 5 5 および I 7 0 ; A 5 5 および K 7 2 ; K 7 2 および N 1 6 4 ; K 7 2 およ
び K 1 6 7 ; Q 9 4 および N 1 6 4 ; Q 9 4 および K 1 6 7 ; Q 1 1 0 および N 1 6 4 ;
Q 1 1 0 および K 1 6 7 ; K 1 4 2 および K 1 6 7 ; R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7
; A 5 5、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; A 5 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; A 5 5、N 1 6
4 および K 1 6 7 ; A 5 5、K 7 および K 8 ; S 2 3、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; S 2 3
、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5 および R
1 3 4 ; S 2 3、A 5 5 および N 1 6 4 ; S 2 3、A 5 5 および K 1 6 7 ; K 7 5、R 1
3 4 および N 1 6 4 ; K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、N 1 6 4 および K 1 6
7 ; K 7 5、Q 9 4 および Q 1 1 0 ; A 5 5、K 7 5 および R 1 3 4 ; L 5、A 5 5 およ
び L 9 6 ; A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; A 5 5、K 7 5、R 1 3 4 およ
び K 1 6 7 ; L 5、S 2 3、A 5 5 および L 9 6 ; R 1 3 4、K 1 4 2、N 1 6 4 および
K 1 6 7 ; K 7、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 8、R 1 3 4、N 1 6 4 および
K 1 6 7 ; K 7 2、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、R 1 3 4、N 1 6 4 お
よび K 1 6 7 ; T 1 7、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; I 7 0、R 1 3 4、N 1 6
4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 1 1 0、R 1 3 4、
N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; S 2 3、A 5 5
、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K
1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、K 1 4 2 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、K
1 4 2、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7、K 8、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 . S
2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0
、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; または K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1
3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7。

【0029】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の位置に置換を含む：R 1
3 4 および K 1 6 7 ; R 1 3 4 および N 1 6 4 ; N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4 および
Q 1 1 0 ; K 2 および N 1 6 4 ; K 2 および K 1 6 7 ; K 7 および K 8 ; K 8 および N 1
6 4 ; K 8 および K 1 6 7 ; T 1 7 および N 1 6 4 ; T 1 7 および K 1 6 7 ; I 7 0 およ
び N 1 6 4 ; I 7 0 および K 1 6 7 ; K 7 2 および N 1 6 4 ; K 7 2 および K 1 6 7 ; K
7 5 および R 1 3 4 ; K 7 5 および N 1 6 4 ; K 7 5 および K 1 6 7 ; K 7 5 および Q 9
4 ; K 7 5 および Q 1 1 0 ; Q 9 4 および N 1 6 4 ; Q 9 4 および K 1 6 7 ; Q 1 1 0 お
よび N 1 6 4 ; Q 1 1 0 および K 1 6 7 ; K 1 4 2 および K 1 6 7 ; R 1 3 4、N 1 6 4
および K 1 6 7 ; K 7 5、Q 9 4 および Q 1 1 0 ; K 7、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1
6 7 ; K 8、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; T 1 7、R 1 3 4、N 1 6 4 および K
1 6 7 ; R 1 3 4、K 1 4 2、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; I 7 0、R 1 3 4、N 1 6 4 お
よび K 1 6 7 ; K 7 2、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、R 1 3 4、N 1 6

10

20

30

40

50

4 および K 1 6 7 ; Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、K 1 4 2 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、K 1 4 2、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; または K 7、K 8、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7。

【0030】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の位置に置換を含む：R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; A 5 5、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; A 5 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; A 5 5、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; L 5、A 5 5 および L 9 6 ; A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; L 5、S 2 3、A 5 5 および L 9 6 ; S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; L 5、S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; または L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7。ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の位置に置換を含む：L 5、A 5 5 および L 9 6 ; A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; または L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7。

【0031】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の位置に置換を含む：R 1 3 4 および K 1 6 7 ; R 1 3 4 および N 1 6 4 ; N 1 6 4 および K 1 6 7 ; A 5 5 および R 1 3 4 ; A 5 5 および N 1 6 4 ; A 5 5 および K 1 6 7 ; S 2 3 および R 1 3 4 ; S 2 3 および N 1 6 4 ; S 2 3 および K 1 6 7 ; K 7 2 および K 7 5 ; K 7 5 および R 1 3 4 ; K 7 5 および N 1 6 4 ; K 7 5 および K 1 6 7 ; K 7 5 および Q 9 4 ; K 7 5 および Q 1 1 0 ; S 2 3 および K 7 5 ; A 5 5 および K 7 5 ; Q 9 4 および Q 1 1 0 ; S 2 3 および A 5 5 ; L 5 および S 2 3 ; K 2 および N 1 6 4 ; K 2 および K 1 6 7 ; K 7 および K 8 ; K 7 および A 5 5 ; K 8 および N 1 6 4 ; K 8 および K 1 6 7 ; K 8 および A 5 5 ; T 1 7 および N 1 6 4 ; T 1 7 および K 1 6 7 ; I 7 0 および N 1 6 4 ; I 7 0 および K 1 6 7 ; A 5 5 および I 7 0 ; A 5 5 および K 7 2 ; K 7 2 および N 1 6 4 ; K 7 2 および K 1 6 7 ; Q 9 4 および N 1 6 4 ; Q 9 4 および K 1 6 7 ; Q 1 1 0 および N 1 6 4 ; Q 1 1 0 および K 1 6 7 ; K 1 4 2 および K 1 6 7 ; R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; A 5 5、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; A 5 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; A 5 5、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; A 5 5、K 7 および K 8 ; S 2 3、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; S 2 3、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5 および R 1 3 4 ; S 2 3、A 5 5 および N 1 6 4 ; S 2 3、A 5 5 および K 1 6 7 ; K 7 5、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、Q 9 4 および Q 1 1 0 ; A 5 5、K 7 5 および R 1 3 4 ; L 5、A 5 5 および L 9 6 ; A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; A 5 5、K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ; L 5、S 2 3、A 5 5 および L 9 6 ; R 1 3 4、K 1 4 2、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 8、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 2、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; T 1 7、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; I 7 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および N 1 6 4 ; S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、K 1 4 2 および K 1 6 7 ; Q 9 4、Q 1 1 0、K 1 4 2、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7、K 8、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ; または K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7。

10

20

30

40

50

【0032】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の位置に置換を含む：R134 および K167；R134 および N164；N164 および K167；Q94 および Q110；K2 および N164；K2 および K167；K7 および K8；K8 および N164；K8 および K167；T17 および N164；T17 および K167；I70 および N164；I70 および K167；K72 および N164；K72 および K167；K75 および R134；K75 および N164；K75 および K167；K75 および Q94；K75 および Q110；Q94 および N164；Q94 および K167；Q110 および N164；Q110 および K167；K142 および K167；R134、N164 および K167；K75、Q94 および Q110；K7、R134、N164 および K167；K8、R134、N164 および K167；T17、R134、N164 および K167；R134、K142、N164 および K167；I70、R134、N164 および K167；K72、R134、N164 および K167；Q94、R134、N164 および K167；Q110、R134、N164 および K167；Q94、Q110、R134 および N164；Q94、Q110、R134、N164 および K167；Q94、Q110、R134、K142 および K167；Q94、Q110、K142、N164 および K167；K75、Q94、Q110、R134、N164 および K167；K72、K75、Q94、Q110、R134、N164 および K167；または K7、K8、R134、N164 および K167。

10

【0033】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の位置に置換を含む：R134、N164 および K167；A55、R134 および N164；A55、R134 および K167；A55、N164 および K167；L5、A55 および L96；A55、R134、N164 および K167；L5、S23、A55 および L96；S23、A55、R134、N164 および K167；S23、A55、L96、R134、N164 および K167；L5、S23、A55、R134、N164 および K167；または L5、S23、A55、L96、R134、N164 および K167。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の位置に置換を含む：L5、A55 および L96；A55、R134、N164 および K167；S23、A55、R134、N164 および K167；または L5、S23、A55、L96、R134、N164 および K167。

20

30

【0034】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、非荷電アミノ酸による、野生型ヒト CD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の、少なくとも1つの置換；酸性アミノ酸による、野生型ヒト CD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の、少なくとも1つの置換；または酸性アミノ酸による、野生型ヒト CD4 D1D2（配列番号1）における非荷電アミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

【0035】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による、野生型ヒト CD4 D1D2（配列番号1）におけるグリシンもしくは疎水性アミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

40

【0036】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、非ヒト霊長類 CD4 D1D2 における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト CD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

【0037】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、類人猿、旧世界ザルまたは新世界ザル CD4 D1D2 における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒト CD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

【0038】

50

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、類人猿または旧世界ザルCD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

【0039】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、類人猿CD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

【0040】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、旧世界ザルCD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。

【0041】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の置換の少なくとも1つを含む：K1の、Nによる置換（K1N）；K2の、Eによる置換（K2E）、Nによる置換（K2N）またはTによる置換（K2T）；L5の、Yによる置換（L5Y）、Iによる置換（L5I）、Eによる置換（L5E）、Wによる置換（L5W）、Vによる置換（L5V）、Fによる置換（L5F）またはTによる置換（L5T）；K7の、Eによる置換（K7E）；K8の、Eによる置換（K8E）；T15の、Nによる置換（T15N）またはEによる置換（T15E）；T17の、Nによる置換（T17N）またはEによる置換（T17E）；S23の、Nによる置換（S23N）、Tによる置換（S23T）、Kによる置換（S23K）、Yによる置換（S23Y）またはAによる置換（S23A）；A55の、Vによる置換（A55V）、Iによる置換（A55I）、Pによる置換（A55P）、Lによる置換（A55L）、Mによる置換（A55M）、Fによる置換（A55F）、Yによる置換（A55Y）、Wによる置換（A55W）またはTによる置換（A55T）；I70の、Eによる置換（I70E）、Lによる置換（I70L）またはVによる置換（I70V）；K72の、Sによる置換（K72S）；K75の、Eによる置換（K75E）またはQによる置換（K75Q）；Q94の、Eによる置換（Q94E）；L96の、Vによる置換（L96V）、Qによる置換（L96Q）、Tによる置換（L96T）、Iによる置換（L96I）またはYによる置換（L96Y）；Q110の、Eによる置換（Q110E）またはHによる置換（Q110H）；L116の、Fによる置換（L116F）またはWによる置換（L116W）；V128の、Iによる置換（V128I）またはLによる置換（V128L）；R134の、Gによる置換（R134G）またはTによる置換（R134T）；K142の、Rによる置換（K142R）、Gによる置換（K142G）またはSによる置換（K142S）；V146の、Iによる置換（V146I）、Lによる置換（V146L）、Fによる置換（V146F）またはWによる置換（V146W）；N164の、Dによる置換（N164D）、Hによる置換（N164H）、Rによる置換（N164R）またはEによる置換（N164E）；K167の、Tによる置換（K167T）、Rによる置換（K167R）またはLによる置換（K167L）；V168の、Iによる置換（V168I）またはLによる置換（V168L）；およびV176の、Iによる置換（V176I）。

【0042】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインはK2E、K7E、K8E、T17N、T17E、A55V、I70E、K72S、K75E、Q94E、Q110E、R134G、K142R、N164DおよびK167T置換の少なくとも1つを含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の置換を含む：K2EおよびN164D；K2EおよびK167T；K7EおよびK8E；K8EおよびN164D；K8EおよびK167T；T17NおよびN164D；T17NおよびK167T；T17EおよびN164D；T17NおよびK167T；I70EおよびN164D；I70EおよびK167T；K72SおよびN164D；K72SおよびK167T；Q94EおよびQ110E；Q94EおよびN164D；Q94EおよびK167T；Q11

10

20

30

40

50

O EおよびN 1 6 4 D ; Q 1 1 0 EおよびK 1 6 7 T ; R 1 3 4 GおよびN 1 6 4 D ; R 1 3 4 GおよびK 1 6 7 T ; K 1 4 2 RおよびK 1 6 7 T ; N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; K 2 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; K 8 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; T 1 7 N、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; T 1 7 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; I 7 0 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; K 7 2 S、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; K 7 5 E、Q 9 4 EおよびQ 1 1 0 E ; またはK 7 2 S、K 7 5 E、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T。

【0043】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインはL 5 Y、K 8 E、S 2 3 N、A 5 5 V、K 7 5 E、Q 9 4 E、L 9 6 V、Q 1 1 0 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T置換の少なくとも1つ、L 5 Y、S 2 3 N、A 5 5 V、L 9 6 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T置換の少なくとも1つ、S 2 3 N、A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T置換の少なくとも1つ、またはA 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T置換の少なくとも1つを含む。例えば、ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の置換を含む：A 5 5 V ; L 5 Y、A 5 5 VおよびL 9 6 V ; A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; S 2 3 N、A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; L 5 Y、A 5 5 V、L 9 6 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T ; またはL 5 Y、S 2 3 N、A 5 5 V、L 9 6 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T。

【0044】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインはG 6 A、S 2 3 N、A 5 5 V、K 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、V 1 2 8 L、R 1 3 4 G、V 1 4 6 I、N 1 6 4 D、K 1 6 7 TおよびV 1 6 8 L置換の少なくとも1つを含む。

【0045】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインはK 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、V 1 2 8 L、R 1 3 4 G、V 1 4 6 I、N 1 6 4 D、K 1 6 7 TおよびV 1 6 8 L置換の少なくとも1つを含む。

【0046】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインはK 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 DおよびK 1 6 7 T置換の少なくとも1つを含む。

【0047】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインはL 1 1 6 F、V 1 2 8 L、V 1 4 6 IおよびV 1 6 8 L置換の少なくとも1つを含む。

【0048】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは以下の置換を含む：A 5 5 VおよびK 7 2 S ; A 5 5 VおよびK 7 5 E ; A 5 5 VおよびK 7 5 Q ; A 5 5 VおよびQ 9 4 E ; A 5 5 VおよびQ 1 1 0 E ; A 5 5 VおよびL 1 1 6 F ; A 5 5 VおよびV 1 2 8 L ; A 5 5 VおよびR 1 3 4 G ; A 5 5 VおよびV 1 4 6 I ; A 5 5 VおよびN 1 6 4 D ; A 5 5 VおよびK 1 6 7 T ; A 5 5 VおよびV 1 6 8 L ; S 2 3 NおよびK 7 2 S ; S 2 3 NおよびK 7 5 E ; S 2 3 NおよびK 7 5 Q ; S 2 3 NおよびQ 9 4 E ; S 2 3 NおよびQ 1 1 0 E ; S 2 3 NおよびL 1 1 6 F ; S 2 3 NおよびV 1 2 8 I ; S 2 3 NおよびR 1 3 4 G ; S 2 3 NおよびV 1 4 6 I ; S 2 3 NおよびN 1 6 4 D ; S 2 3 NおよびK 1 6 7 T ; S 2 3 NおよびV 1 6 8 L ; G 6 AおよびK 7 2 S ; G 6 AおよびK 7 5 E ; G 6 AおよびK 7 5 Q ; G 6 AおよびQ 9 4 E ; G 6 AおよびQ 1 1 0 E ; G 6 AおよびL 1 1 6 F ; G 6 AおよびV 1 2 8 L ; G 6 AおよびR 1 3 4 G ; G 6 AおよびV 1 4 6 I ; G 6 AおよびN 1 6 4 D ; G 6 AおよびK 1 6 7 T ; G 6 AおよびV 1 6 8 L ; K 7 2 SおよびK 7 5 E ; K 7 2 SおよびK 7 5 Q ; K 7 2 SおよびQ 9 4 E ; K 7 2 Sお

10

20

30

40

50

よび Q 1 1 0 E ; K 7 2 S および L 1 1 6 F ; K 7 2 S および V 1 2 8 L ; K 7 2 S およ
び R 1 3 4 G ; K 7 2 S および V 1 4 6 I ; K 7 2 S および N 1 6 4 D ; K 7 2 S および
K 1 6 7 T ; K 7 2 S および V 1 6 8 L ; K 7 5 E および Q 9 4 E ; K 7 5 E および Q 1
1 0 E ; K 7 5 E および L 1 1 6 F ; K 7 5 E および V 1 2 8 L ; K 7 5 E および R 1 3
4 G ; K 7 5 E および V 1 4 6 I ; K 7 5 E および N 1 6 4 D ; K 7 5 E および K 1 6 7
T ; K 7 5 E および V 1 6 8 L ; K 7 5 Q および Q 9 4 E ; K 7 5 Q および Q 1 1 0 E ;
K 7 5 Q および L 1 1 6 F ; K 7 5 Q および V 1 2 8 L ; K 7 5 Q および R 1 3 4 G ; K
7 5 Q および V 1 4 6 I ; K 7 5 Q および N 1 6 4 D ; K 7 5 Q および K 1 6 7 T ; K 7
5 Q および V 1 6 8 L ; Q 9 4 E および Q 1 1 0 E ; Q 9 4 E および L 1 1 6 F ; Q 9 4
E および V 1 2 8 L ; Q 9 4 E および R 1 3 4 G ; Q 9 4 E および V 1 4 6 I ; Q 9 4 E
および N 1 6 4 D ; Q 9 4 E および K 1 6 7 T ; Q 9 4 E および V 1 6 8 L ; Q 1 1 0 E
および L 1 1 6 F ; Q 1 1 0 E および V 1 2 8 L ; Q 1 1 0 E および R 1 3 4 G ; Q 1 1
0 E および V 1 4 6 I ; Q 1 1 0 E および N 1 6 4 D ; Q 1 1 0 E および K 1 6 7 T ; Q
1 1 0 E および V 1 6 8 L ; L 1 1 6 F および V 1 2 8 L ; L 1 1 6 F および R 1 3 4 G
; L 1 1 6 F および V 1 4 6 I ; L 1 1 6 F および N 1 6 4 D ; L 1 1 6 F および K 1 6
7 T ; L 1 1 6 F および V 1 6 8 L ; V 1 2 8 L および R 1 3 4 G ; V 1 2 8 L および V
1 4 6 I ; V 1 2 8 L および N 1 6 4 D ; V 1 2 8 L および K 1 6 7 T ; V 1 2 8 L およ
び V 1 6 8 L ; V 1 4 6 I および N 1 6 4 D ; V 1 4 6 I および K 1 6 7 T ; V 1 4 6 I
および V 1 6 8 L ; または N 1 6 4 D および K 1 6 7 T。

【 0 0 4 9 】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは A 5 5 V 置換を含む。

【 0 0 5 0 】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは S 2 3 N 置換を含む。

【 0 0 5 1 】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは L 5 Y、A 5 5 V および L 9 6
V 置換を含む。

【 0 0 5 2 】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6
4 D および K 1 6 7 T 置換を含む。

【 0 0 5 3 】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは S 2 3 N、A 5 5 V、R 1 3 4
G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 置換を含む。

【 0 0 5 4 】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは L 5 Y、A 5 5 V、L 9 6 V、
R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 置換を含む。

【 0 0 5 5 】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは L 5 Y、S 2 3 N、A 5 5 V、
L 9 6 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 置換を含む。

【 0 0 5 6 】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは Q 4 0 A 置換を含む。

【 0 0 5 7 】

ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは配列番号 8、配列番号 1 0、配
列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2
、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号
3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2 もしくは配列番号 4 4 のアミノ酸配列
を含み、または配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6
、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号
2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列
番号 4 2 もしくは配列番号 4 4 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9
8 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0058】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、配列番号46のアミノ酸配列を含むリーダー配列を含み、これは配列番号47のヌクレオチド配列によりコードされる。ある実施形態においては、リーダー配列は配列番号46に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0059】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、gp120と接触する野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸残基の置換を含まない。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のN32、K35、L44、K46またはR59に対応する位置に置換を含まない。

10

【0060】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩橋を形成するアミノ酸残基の置換を含まない。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、K50、D56、R58、R59、K72、E77、E91、R131、D153、K167、E169またはK171に対応する位置に置換を含まない。

【0061】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のF98に対応する位置に置換を含まず、例えば、CD4 D1D2 ムテインはバリンによるF98の置換（F98V）を含まない。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のI76に対応する位置に置換を含まず、例えば、CD4 D1D2 ムテインはプロリンによるI76の置換（I76P）を含まない。

20

【0062】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、動的光散乱（DLS）による測定で該タンパク質の凝集温度を増加させる少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、本明細書に記載されている置換の1以上を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、CD4⁺CCR5⁺細胞系のHIV感染に対する該タンパク質のIC₅₀を減少させる少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、本明細書に記載されている置換の1以上を含む。

30

【0063】

ある実施形態においては、該タンパク質は、動的光散乱（DLS）による測定で少なくとも60℃の凝集温度を、または動的光散乱（DLS）による測定で野生型ヒトCD4 D1D2の対応タンパク質の凝集温度より少なくとも7℃高い凝集温度を有する。ある実施形態においては、該タンパク質は少なくとも12時間、24時間、1日、1.5日、2日、2.5日、3日、3.5日、4日、4.5日、5日、5.5日、6日、6.5日、7日、7.5日、8日、8.5日、9日、9.5日または10日の血漿半減期を有する。ある実施形態においては、該タンパク質は少なくとも12時間の血漿半減期を有する。ある実施形態においては、該タンパク質は少なくとも3日の血漿半減期を有する。

40

【0064】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、色素インターカレーションアッセイによる測定で該タンパク質の融解温度を増加させる少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。

【0065】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、発現されるCD4 D1D2 ムテインの量を増加させる少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。

【0066】

ある実施形態においては、該タンパク質は霊長類レンチウイルスエンベロープ糖タンパク質結合部分を更に含む。該結合部分は、例えば、少なくとも1つのスルホチロシンを含

50

むことが可能であり、および／または配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 もしくは配列番号 7 のアミノ酸配列を含むことが可能である。

【0067】

ある実施形態においては、該タンパク質は免疫グロブリン F c ドメインを更に含む。ある実施形態においては、F c ドメインはヒト I g G 1 または I g G 2 F c ドメイン、例えば I g G 1 F c ドメインである。ある実施形態においては、F c ドメインは C 2 2 0 における置換または欠失を含む。ある実施形態においては、F c ドメインは M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、T 2 5 6 E、M 4 2 8 L、H 4 3 3 K、N 4 3 4 S および N 4 3 4 F 置換の少なくとも 1 つを含む。例えば、F c ドメインは M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T および T 2 5 6 E 置換、または M 4 2 8 L および N 4 3 4 S 置換を含みうる。

10

【0068】

ある実施形態においては、該タンパク質は、天然に存在する野生型非ヒト霊長類タンパク質と同一ではない。ある実施形態においては、C D 4 D 1 D 2 ムテインは、野生型非ヒト霊長類タンパク質の対応部分と同一ではない。

【0069】

ある実施形態においては、該タンパク質は C D 4 ドメイン 3 (D 3) および／またはドメイン 4 (D 4) 領域、例えばヒト C D 4 D 3 および／または D 4 領域を含まない。

【0070】

もう 1 つの態様においては、本発明は、前記タンパク質のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。もう 1 つの態様においては、本発明は、前記核酸のいずれかを含む発現ベクターを提供する。ある実施形態においては、発現ベクターはウイルスベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターである。もう 1 つの態様においては、本発明は、前記発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。もう 1 つの態様においては、本発明は、前記タンパク質のいずれかまたは前記発現ベクターのいずれかを含む医薬組成物を提供する。

20

【0071】

もう 1 つの態様においては、本発明は、H I V 感染の治療を要する対象における H I V 感染の治療方法を提供する。該方法は、前記タンパク質のいずれか、前記発現ベクターのいずれか、または前記医薬組成物のいずれかの有効量を対象に投与することを含む。

【0072】

本発明のこれら及び他の態様および特徴は以下の詳細な説明および特許請求の範囲に記載されている。

30

【0073】

詳細な説明

本発明は、天然に存在するヒト C D 4 D 1 D 2 (すなわち、ヒト C D 4 ドメイン 1 および C D 4 ドメイン 2) を含むタンパク質より高い安定性および／または活性を有するヒト C D 4 ドメイン 1 および C D 4 ドメイン 2 の両方 (C D 4 D 1 D 2) を含むタンパク質の知見に部分的に基づいている。ある実施形態においては、該タンパク質は、より高い生産収率、例えば熱スキャンアッセイにおける動的光散乱 (D L S) により測定された場合の、より高い凝集温度、例えば色素インターカレーションアッセイにより測定された場合の、より高い融解温度、および／または天然に存在するヒト C D 4 D 1 D 2 を含むタンパク質より長い血漿半減期を示す。更に、本明細書に記載されているタンパク質はヒト対象における H I V の治療に適している可能性があるとして想定される。

40

【0074】

本発明の種々の特徴および態様を以下に更に詳細に記載する。

【0075】

I. タンパク質

1 つの態様においては、本発明は、C D 4 D 1 D 2 ムテインが野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) に対して少なくとも 90 % 同一であり、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) の K 1、K 2、V 4、L 5、G 6、K 7、K 8、D 10、T 11、V 12

50

、L14、T15、T17、A18、S19、Q20、K21、K22、S23、I24
、Q25、H27、N30、N32、I34、K35、I36、L37、N39、G41
、S42、L44、K46、P48、K50、L51、N52、D53、A55、D56
、R58、R59、S60、L61、Q64、G65、N66、F67、P68、L69
、I70、I71、K72、K73、L74、K75、I76、E77、D80、T81
、V86、E87、D88、Q89、E91、V93、Q94、L95、L96、V97
、F98、G99、T101、A102、N103、S104、D105、H107、L
108、Q110、S113、L114、L116、T117、L118、S120、P
121、P122、G123、S124、S125、V128、Q129、C130、R
131、S132、P133、R134、G135、N137、I138、Q139、G
140、G141、K142、T143、L144、S145、V146、S147、L
149、E150、L151、Q152、D153、G155、T156、W157、T
158、T160、V161、L162、Q163、N164、Q165、K166、K
167、V168、E169、F170、K171、I172、D173、I174、V
175、V176またはA178に対応する位置に少なくとも1つの置換を含む、ヒトC
D4 D1D2ムテインを含むタンパク質を提供する。本明細書中で用いる「ムテイン」
なる語は、野生型アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するタンパク質を意味する。

【0076】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、非ヒト霊長類CD4 D1D2
における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）
におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、
CD4 D1D2ムテインは、例えば非ヒト霊長類CD4 D1D2における対応位置にお
けるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、V4、
G6、K7、D10、T11、V12、T15、T17、A18、S19、Q20、K2
1、K22、S23、I24、Q25、H27、N30、N32、I34、K35、N3
9、G41、S42、L44、K46、P48、K50、L51、N52、D53、A5
5、D56、R58、R59、S60、L61、Q64、G65、N66、P68、L6
9、I70、K72、K73、L74、K75、I76、E77、D80、T81、E8
7、D88、Q89、E91、Q94、L96、G99、T101、A102、N103
、S104、D105、H107、L108、Q110、S113、T117、S120
、P122、G123、S124、S125、V128、Q129、C130、R131
、S132、R134、G135、N137、I138、Q139、G140、G141
、K142、T143、L144、S145、V146、S147、E150、L151
、Q152、D153、T156、W157、T158、T160、V161、L162
、Q163、N164、Q165、K166、K167、V168、E169、F170
、K171、I172、D173、I174、V175またはA178に対応する位置に
おける少なくとも1つの置換を含む。

【0077】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、類人猿、旧世界ザルまたは新
世界ザルCD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4
D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、あ
る実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、例えば類人猿、旧世界ザルまたは
新世界ザルCD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4
D1D2（配列番号1）のK1、K2、K7、D10、T11、T15、T17、A18
、S19、Q20、K21、K22、S23、I24、Q25、H27、N30、N32
、I34、N39、G41、S42、L44、K46、P48、N52、D53、A55
、R59、L61、Q64、G65、N66、P68、L69、I70、K72、K73
、L74、K75、I76、D80、E87、D88、Q89、Q94、L96、A10
2、N103、S104、Q110、S113、T117、S120、S124、Q12
9、R131、R134、N137、Q139、G140、G141、K142、T14

3、L144、S145、V146、S147、E150、L151、Q152、T156、W157、T158、T160、V161、L162、N164、Q165、K166、K167、V168、K171、D173、I174またはV175に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

【0078】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、類人猿または旧世界ザルCD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、例えば類人猿または旧世界ザルCD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK2、D10、T15、T17、S19、Q20、K21、K22、S23、I24、Q25、N30、N32、I34、N39、P48、N52、D53、A55、R59、G65、N66、P68、L69、D80、E87、D88、Q89、Q94、Q110、T117、S120、S124、Q129、R134、G140、K142、L144、S147、L151、T156、W157、T160、V161、L162、N164、K166またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

10

【0079】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、類人猿CD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、例えば類人猿CD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、T15、T17、Q20、I34、N52、D53、A55、R59、G65、P68、E87、D88、T117、S120、R134、G140、S147、W157、T160、N164またはK166に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

20

【0080】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、旧世界ザルCD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、例えば旧世界ザルCD4 D1D2における対応位置におけるアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK2、D10、T15、T17、S19、Q20、K21、K22、S23、I24、Q25、N30、N32、I34、N39、P48、N52、A55、R59、N66、P68、L69、D80、D88、Q89、Q94、Q110、S124、Q129、R134、G140、K142、L144、S147、L151、T156、T160、V161、L162、N164、K166またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

30

【0081】

類人猿、旧世界ザル、新世界ザルおよび原猿類を含む典型的な非ヒト霊長類（NHP）が、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）アミノ酸配列と典型的なNHP CD4 D1D2アミノ酸配列との間の配列アライメントと共に、図4に挙げられている。

40

【0082】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、置換されるアミノ酸より大きな体積、例えば側鎖体積を有する疎水性アミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるグリシンもしくは疎水性アミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。疎水性アミノ酸は、例えば、埋もれた疎水性アミノ酸でありうる。本明細書中で用いるアミノ酸A、V、P、L、I、M、F、YおよびWは疎水性アミノ酸とみなされ、グリシンおよび疎水性アミノ酸の相対体積は以下のとおりである： $G < A < V < P < L = I < M < F < Y < W$ 。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、例えば置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のL5、G6、V12、L14、A18、I24、I36、L3

50

7、L44、L51、A55、G65、F67、P68、L69、V93、G99、I71、L74、V86、V93、L95、L96、V97、F98、A102、L108、L114、L116、L118、P121、V128、P133、I138、G141、L144、V146、L149、G155、V161、V168、F170、I172、I174またはV176に対応する位置におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、例えば置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のG6、I24、L44、L51、A55、L69、G99、A102、V128、G141、V146、V161およびV168に対応する位置におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、表1において特定されている1以上のアミノ酸置換を含む。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

野生型 ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1) アミノ酸	特定された位置における置 換
L5	M, F, Y 又は W
G6	A, V, P, L, I, M, F, Y 又は W
V12	P, L, I, M, F, Y 又は W
L14	M, F, Y 又は W
A18	V, P, L, I, M, F, Y 又は W
I24	M, F, Y 又は W
I36	M, F, Y 又は W
L37	M, F, Y 又は W
L44	M, F, Y 又は W
L51	M, F, Y 又は W
A55	V, P, L, I, M, F, Y 又は W
G65	A, V, P, L, I, M, F, Y 又は W
F67	Y 又は W
P68	L, I, M, F, Y 又は W
L69	M, F, Y 又は W
I71	M, F, Y 又は W
L74	M, F, Y 又は W
V86	P, L, I, M, F, Y 又は W
V93	P, L, I, M, F, Y 又は W
L95	M, F, Y 又は W
L96	M, F, Y 又は W
V97	P, L, I, M, F, Y 又は W
F98	Y 又は W
G99	A, V, P, L, I, M, F, Y 又は W
A102	V, P, L, I, M, F, Y 又は W
L108	M, F, Y 又は W
L114	M, F, Y 又は W
L116	M, F, Y 又は W
L118	M, F, Y 又は W
P121	L, I, M, F, Y 又は W
V128	P, L, I, M, F, Y 又は W
P133	L, I, M, F, Y 又は W
I138	M, F, Y 又は W

10

20

30

40

50

G141	A, V, P, L, I, M, F, Y 又は W
L144	M, F, Y 又は W
V146	P, L, I, M, F, Y 又は W
L149	M, F, Y 又は W
G155	A, V, P, L, I, M, F, Y 又は W
V161	P, L, I, M, F, Y 又は W
V168	P, L, I, M, F, Y 又は W
F170	Y 又は W
I172	M, F, Y 又は W
I174	M, F, Y 又は W
V176	P, L, I, M, F, Y 又は W

10

【0083】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、置換されるアミノ酸より大きな体積、例えば側鎖体積を有する、そしてまた、非ヒト霊長類CD4 D1D2における対応位置に存在する疎水性アミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるグリシンもしくは疎水性アミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の少なくとも1つを含む：G6の、Aによる置換（G6A）；I24の、Mによる置換（I24M）；L44の、Wによる置換（L44W）；L51の、Mによる置換（L51M）；A55の、Vによる置換（A55V）またはIによる置換（A55I）；L69の、Mによる置換（L69M）；G99の、Aによる置換（G99A）；A102の、Vによる置換（A102V）；V128の、Lによる置換（V128L）；G141の、Vによる置換（G141V）またはMによる置換（G141M）；V146の、Iによる置換（V146I）またはMによる置換（V146M）；V161の、Iによる置換（V161I）またはLによる置換（V161L）；およびV168の、Lによる置換（V168L）。

20

【0084】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、正味正電荷の低減を伴うタンパク質を与える少なくとも1つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、非荷電アミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の、少なくとも1つの置換、または酸性アミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩基性アミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。ある実施形態においては、非荷電アミノ酸は、非荷電極性アミノ酸（G、S、T、N、QおよびH）、AまたはYである。

30

【0085】

本明細書中で用いるアミノ酸G、A、S、T、N、Q、H、Y、L、I、V、M、F、W、PおよびCは非荷電アミノ酸であるとみなされ、アミノ酸G、S、T、N、QおよびHは非荷電極性アミノ酸であるとみなされ、アミノ酸DおよびEは酸性アミノ酸であると見なされ、アミノ酸KおよびRは塩基性アミノ酸であるとみなされる。

40

【0086】

例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、例えばG、A、S、T、N、Q、HまたはYによる、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、K7、K21、K22、K35、K46、K50、R58、R59、K72、K75、R131、R134、K142、K166、K167またはK171に対応する位置におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、表2において特定されている1以上のアミノ酸置換を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、酸性アミノ酸による、野生型ヒトCD4

50

D 1 D 2（配列番号 1）における塩基性アミノ酸の、表 3 において特定されている 1 以上の置換を含む。

【表 2】

表 2

野生型 ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1) アミノ酸	特定された位置における置換
K1	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K2	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K7	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K21	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K22	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K35	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K46	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K50	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
R58	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
R59	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K72	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K75	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
R131	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
R134	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K142	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K166	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K167	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y
K171	G, A, S, T, N, Q, H 又は Y

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3

野生型 ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1) アミノ酸	特定された位置における置換
K1	D 又は E
K2	D 又は E
K7	D 又は E
K21	D 又は E
K22	D 又は E
K35	D 又は E
K46	D 又は E
K50	D 又は E
R58	D 又は E
R59	D 又は E
K72	D 又は E
K75	D 又は E
R131	D 又は E
R134	D 又は E
K142	D 又は E
K166	D 又は E
K167	D 又は E
K171	D 又は E

10

20

30

【0087】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、非ヒト霊長類 CD4 D1D2 における対応位置にも存在する非荷電または酸性アミノ酸による、野生型ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1) における塩基性アミノ酸の、少なくとも 1 つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の少なくとも 1 つを含む：K1 の、N による置換 (K1N)；K2 の、N による置換 (K2N)、T による置換 (K2T) または E による置換 (K2E)；K7 の、E による置換 (K7E)；K21 の、N による置換 (K21N)；K22 の、T による置換 (K22T)；K46 の、T による置換 (K46T)；R59 の、Q による置換 (R59Q)；K75 の、Q による置換 (K75Q) または E による置換 (K75E)；R131 の、T による置換 (R131T) または Q による置換 (R131Q)；R134 の、T による置換 (R134T) または G による置換 (R134G)；K142 の、G による置換 (K142G) または S による置換 (K142S)；K166 の、N による置換 (K166N)、Q による置換 (K166Q)、H による置換 (K166H) または E による置換 (K166E)；K167 の、T による置換 (K167T)；および K171 の、Q による置換 (K171Q)、S による置換 (K171S)、N による置換 (K171N) または E による置換 (K171E)。

40

【0088】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、酸性アミノ酸による、野生型ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1) における非荷電アミノ酸の、少なくとも 1 つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、例えば D また

50

は E による、野生型ヒト CD4 D1D2（配列番号 1）の V4、T11、T15、T17、S19、Q20、S23、Q25、H27、N30、N32、I34、S42、P48、N52、S60、L61、Q64、N66、I70、I76、T81、Q89、Q94、T101、N103、S104、H107、Q110、S113、T117、S120、P122、G123、S124、S125、Q129、G135、N137、Q139、G140、T143、S145、S147、L151、Q152、T156、T158、T160、L162、Q163、N164、Q165、V175 または A178 に対応する位置におけるアミノ酸の、少なくとも 1 つの置換を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、表 4 において特定されている 1 以上のアミノ酸置換を含む。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4

野生型 ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1) アミノ酸	特定された 位置におけ る置換
V4	D 又は E
T11	D 又は E
T15	D 又は E
T17	D 又は E
S19	D 又は E
Q20	D 又は E
S23	D 又は E
Q25	D 又は E
H27	D 又は E
N30	D 又は E
N32	D 又は E
I34	D 又は E
S42	D 又は E
P48	D 又は E
N52	D 又は E
S60	D 又は E
L61	D 又は E
Q64	D 又は E
N66	D 又は E
I70	D 又は E
I76	D 又は E
T81	D 又は E
Q89	D 又は E
Q94	D 又は E
T101	D 又は E
N103	D 又は E
S104	D 又は E
H107	D 又は E
Q110	D 又は E
S113	D 又は E
T117	D 又は E
S120	D 又は E
P122	D 又は E

10

20

30

40

50

G123	D 又は E
S124	D 又は E
S125	D 又は E
Q129	D 又は E
G135	D 又は E
N137	D 又は E
Q139	D 又は E
G140	D 又は E
T143	D 又は E
S145	D 又は E
S147	D 又は E
L151	D 又は E
Q152	D 又は E
T156	D 又は E
T158	D 又は E
T160	D 又は E
L162	D 又は E
Q163	D 又は E
N164	D 又は E
Q165	D 又は E
V175	D 又は E
A178	D 又は E

10

20

【0089】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、非ヒト霊長類 CD4 D1D2 における対応位置にも存在する酸性アミノ酸による、野生型ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1) における非荷電アミノ酸の少なくとも 1 つの置換を含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の少なくとも 1 つを含む：T17 の、E による置換 (T17E)；N32 の、D による置換 (N32D)；Q94 の、E による置換 (Q94E)；Q110 の、E による置換 (Q110E)；G123 の、D による置換 (G123D)；Q129 の、E による置換 (Q129E)；および N164 の、D による置換 (N164D)。

30

【0090】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、CD4 D1 ドメイン (配列番号 1 のアミノ酸残基 1～98 に対応する) における少なくとも 1 つの置換、例えば、本明細書に記載されている置換の 1 以上、および CD4 D2 ドメイン (配列番号 1 のアミノ酸残基 99～178 に対応する) における少なくとも 1 つの置換、例えば、本明細書に記載されている置換の 1 以上を含む。

40

【0091】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 個の置換を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは野生型ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1) に対して少なくとも 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である。

【0092】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒト CD4 D1D2 (

50

配列番号1)における表面露出側鎖を有するアミノ酸位置における10、9、8、7、6、5、4、3、2個または1個より少ない置換を含む。

【0093】

配列同一性は、当技術分野における技量の範囲内である種々の方法により、例えば、公的に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアを使用して決定される。プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastx(Karlinら、(1990)PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 87:2264-2268; Altschul、(1993)J. MOL. EVOL. 36, 290-300; Altschulら、(1997)NUCLEIC ACIDS RES. 25:3389-3402(それらを参照により本明細書に組み入れることとする))により利用されるアルゴリズムを使用するBLAST(Basic Local Alignment Search Tool)分析は配列類似性検索に適合化される。配列データベースの検索における基本的問題の考察は、Altschulら、(1994)NATURE GENETICS 6:119-129(その全てを参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。当業者は、比較される配列の全長にわたる最大アラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することが可能である。ヒストグラム、記述、アラインメント、期待値[すなわち、データベース配列に対するマッチ(一致)を報告するための統計的有意性閾値]、カットオフ、マトリックスおよびフィルターに関する検索パラメータはデフォルト設定である。blastp、blastx、tblastnおよびtblastxにより使用されるデフォルト・スコアリング・マトリックスはBLOSUM62マトリックス(Henikoffら、(1992)PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 89:10915-10919(その全てを参照により本明細書に組み入れることとする))である。4つのblastnパラメータは以下のとおりに調整される: Q=10(ギャップ生成ペナルティ); R=10(ギャップ拡張ペナルティ); wink=1(クエリに沿った全てのwink.sup.th位置で単語ヒットを生成させる); およびgapw=16(ギャップ化アライメントが生成されるウィンドウ幅を設定する)。同等のblastpパラメータ設定はQ=9; R=2; wink=1; およびgapw=32である。検索は、NCBI(National Center for Biotechnology Information)BLAST Advanced Optionパラメータを使用することによっても行われうる(例えば、-G, ギャップを開くためのコスト[整数]: デフォルト=ヌクレオチドでは5、タンパク質では11; -E, ギャップを拡張するためのコスト[整数]: デフォルト=ヌクレオチドでは2/タンパク質では1; -q, ヌクレオチドミスマッチに関するペナルティ[整数]: デフォルト=-3; -r, ヌクレオチドマッチに関する報酬[整数]: デフォルト=1; -e, 期待値[実数]: デフォルト=10; -W, 語長[整数]: デフォルト=ヌクレオチドでは11/メガブラスト(megablast)では28/タンパク質では3; -y, ビット単位のブラスト拡張に関するドロップオフ(X): デフォルト=blastnでは20/その他では7; -X, ギャップ化アライメントに関するXドロップオフ値(ビット単位): デフォルト=全てのプログラムに関して15(blastnには適用不可能); および-Z, ギャップ化アライメントに関する最終Xドロップオフ値(ビット単位): blastnでは50、その他では25)。ペアワイズタンパク質アライメントのためのClustalWも使用される(デフォルトパラメータは、例えば、Blosum62マトリックスおよびギャップ開始ペナルティ=10およびギャップ拡張ペナルティ=0.1を含みうる)。GCGパッケージバージョン10.0において利用可能な配列間のベストフィット(Best fit)比較はDNAパラメータGAP=50(ギャップ生成ペナルティ)およびLEN=3(ギャップ拡張ペナルティ)を使用し、タンパク質比較における同等の設定はGAP=8およびLEN=2である。

【0094】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、L5、G6、K7、K8、T15、T17、K21、K22、S23、A55、I70、K72、K75、Q94、L96、G99、A102、Q110、R134、K142、N164、K166、K167またはK171に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のL5、K8、S23、A55、K75、Q94、L96、Q110、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。例えば、CD4 D1D2ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のL5、S23、A55、L96、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のS23、A55、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換、あるいは野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のA55、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含みうる。ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK2、K7、K8、T17、I70、K72、Q94、Q110、R134、K142、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む。

【0095】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは以下の位置に置換を含む：R134およびK167；R134およびN164；N164およびK167；A55およびR134；A55およびN164；A55およびK167；S23およびR134；S23およびN164；S23およびK167；K72およびK75；K75およびR134；K75およびN164；K75およびK167；K75およびQ94；K75およびQ110；S23およびK75；A55およびK75；Q94およびQ110；S23およびA55；L5およびS23；K2およびN164；K2およびK167；K7およびK8；K7およびA55；K8およびN164；K8およびK167；K8およびA55；T17およびN164；T17およびK167；I70およびN164；I70およびK167；A55およびI70；A55およびK72；K72およびN164；K72およびK167；Q94およびN164；Q94およびK167；Q110およびN164；Q110およびK167；K142およびK167；R134、N164およびK167；A55、R134およびN164；A55、R134およびK167；A55、N164およびK167；A55、K7およびK8；S23、R134およびN164；S23、R134およびK167；S23、N164およびK167；S23、A55およびR134；S23、A55およびN164；S23、A55およびK167；K75、R134およびN164；K75、R134およびK167；K75、N164およびK167；K75、Q94およびQ110；A55、K75およびR134；L5、A55およびL96；A55、R134、N164およびK167；A55、K75、R134およびK167；L5、S23、A55およびL96；R134、K142、N164およびK167；K7、R134、N164およびK167；K8、R134、N164およびK167；K72、R134、N164およびK167；K75、R134、N164およびK167；T17、R134、N164およびK167；I70、R134、N164およびK167；Q94、R134、N164およびK167；Q110、R134、N164およびK167；Q94、Q110、R134およびN164；S23、A55、R134、N164およびK167；Q94、Q110、R134、N164およびK167；Q94、Q110、R134、K142およびK167；Q94、Q110、K142、N164およびK167；K7、K8、R134、N164およびK167；S23、A55、L96、R134、N164およびK167；K75、Q94、Q110、R134、N164およびK167；K72、K75、Q94、Q110、R134、N164およびK167；またはK2、T17、K21、K72、K75、Q94、Q110、R134、N164およびK167。

10

20

30

40

50

【0096】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは以下の位置に置換を含む：R134およびK167；R134およびN164；N164およびK167；Q94およびQ110；K2およびN164；K2およびK167；K7およびK8；K8およびN164；K8およびK167；T17およびN164；T17およびK167；I70およびN164；I70およびK167；K72およびN164；K72およびK167；K75およびR134；K75およびN164；K75およびK167；K75およびQ94；K75およびQ110；Q94およびN164；Q94およびK167；Q110およびN164；Q110およびK167；K142およびK167；R134、N164およびK167；K75、Q94およびQ110；K7、R134、N164およびK167；K8、R134、N164およびK167；T17、R134、N164およびK167；R134、K142、N164およびK167；I70、R134、N164およびK167；K72、R134、N164およびK167；Q94、R134、N164およびK167；Q110、R134、N164およびK167；Q94、Q110、R134およびN164；Q94、Q110、R134、N164およびK167；Q94、Q110、R134、K142およびK167；Q94、Q110、K142、N164およびK167；K75、Q94、Q110、R134、N164およびK167；K72、K75、Q94、Q110、R134、N164およびK167；またはK7、K8、R134、N164およびK167。

10

【0097】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは以下の位置に置換を含む：R134、N164およびK167；A55、R134およびN164；A55、R134およびK167；A55、N164およびK167；L5、A55およびL96；A55、R134、N164およびK167；L5、S23、A55およびL96；S23、A55、R134、N164およびK167；S23、A55、L96、R134、N164およびK167；L5、S23、A55、R134、N164およびK167；またはL5、S23、A55、L96、R134、N164およびK167。ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは以下の位置に置換を含む：L5、A55およびL96；A55、R134、N164およびK167；S23、A55、R134、N164およびK167；またはL5、S23、A55、L96、R134、N164およびK167。

20

30

【0098】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは以下の置換の少なくとも1つを含む：K1の、Nによる置換（K1N）；K2の、Eによる置換（K2E）、Nによる置換（K2N）またはTによる置換（K2T）；L5の、Yによる置換（L5Y）、Iによる置換（L5I）、Eによる置換（L5E）、Wによる置換（L5W）、Vによる置換（L5V）、Fによる置換（L5F）またはTによる置換（L5T）；K7の、Eによる置換（K7E）；K8の、Eによる置換（K8E）；T15の、Nによる置換（T15N）またはEによる置換（T15E）；T17の、Nによる置換（T17N）またはEによる置換（T17E）；S23の、Nによる置換（S23N）、Tによる置換（S23T）、Kによる置換（S23K）、Yによる置換（S23Y）またはAによる置換（S23A）；A55の、Vによる置換（A55V）、Iによる置換（A55I）、Pによる置換（A55P）、Lによる置換（A55L）、Mによる置換（A55M）、Fによる置換（A55F）、Yによる置換（A55Y）、Wによる置換（A55W）またはTによる置換（A55T）；I70の、Eによる置換（I70E）、Lによる置換（I70L）またはVによる置換（I70V）；K72の、Sによる置換（K72S）；K75の、Eによる置換（K75E）またはQによる置換（K75Q）；Q94の、Eによる置換（Q94E）；L96の、Vによる置換（L96V）、Qによる置換（L96Q）、Tによる置換（L96T）、Iによる置換（L96I）またはYによる置換（L96Y）；Q110の、Eによる置換（Q110E）またはHによる置換（Q110H）；R134の、Gによる置換

40

50

(R 1 3 4 G) または T による置換 (R 1 3 4 T) ; K 1 4 2 の、R による置換 (K 1 4 2 R) 、G による置換 (K 1 4 2 G) または S による置換 (K 1 4 2 S) ; N 1 6 4 の、D による置換 (N 1 6 4 D) 、H による置換 (N 1 6 4 H) 、R による置換 (N 1 6 4 R) または E による置換 (N 1 6 4 E) ; および K 1 6 7 の、T による置換 (K 1 6 7 T) 、R による置換 (K 1 6 7 R) または L による置換 (K 1 6 7 L) 。

【0099】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは K 2 E、K 7 E、K 8 E、T 1 7 N、T 1 7 E、A 5 5 V、I 7 0 E、K 7 2 S、K 7 5 E、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、R 1 3 4 G、K 1 4 2 R、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 置換の少なくとも 1 つを含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の置換を含む：K 2 E および N 1 6 4 D ; K 2 E および K 1 6 7 T ; K 7 E および K 8 E ; K 8 E および N 1 6 4 D ; K 8 E および K 1 6 7 T ; T 1 7 N および N 1 6 4 D ; T 1 7 N および K 1 6 7 T ; T 1 7 E および N 1 6 4 D ; T 1 7 N および K 1 6 7 T ; I 7 0 E および N 1 6 4 D ; I 7 0 E および K 1 6 7 T ; K 7 2 S および N 1 6 4 D ; K 7 2 S および K 1 6 7 T ; Q 9 4 E および Q 1 1 0 E ; Q 9 4 E および N 1 6 4 D ; Q 9 4 E および K 1 6 7 T ; Q 1 1 0 E および N 1 6 4 D ; Q 1 1 0 E および K 1 6 7 T ; R 1 3 4 G および N 1 6 4 D ; R 1 3 4 G および K 1 6 7 T ; K 1 4 2 R および K 1 6 7 T ; N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; K 2 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; K 8 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; T 1 7 N、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; T 1 7 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; I 7 0 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; K 7 2 S、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; K 7 5 E、Q 9 4 E および Q 1 1 0 E ; または K 7 2 S、K 7 5 E、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 。

【0100】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは L 5 Y、K 8 E、S 2 3 N、A 5 5 V、K 7 5 E、Q 9 4 E、L 9 6 V、Q 1 1 0 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 置換の少なくとも 1 つ、L 5 Y、S 2 3 N、A 5 5 V、L 9 6 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 置換の少なくとも 1 つ、S 2 3 N、A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 置換の少なくとも 1 つ、または A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 置換の少なくとも 1 つを含む。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは以下の置換を含む：A 5 5 V ; L 5 Y、A 5 5 V および L 9 6 V ; A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; S 2 3 N、A 5 5 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; L 5 Y、A 5 5 V、L 9 6 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T ; または L 5 Y、S 2 3 N、A 5 5 V、L 9 6 V、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 。

【0101】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42 もしくは配列番号 44 のアミノ酸配列を含み、または配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42 もしくは配列番号 44 に対して少なくとも 90 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0102】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、配列番号 46 のアミノ酸配列を含むリーダー配列を含み、これは配列番号 47 のヌクレオチド配列によりコードされる。ある実施形態においては、リーダー配列は配列番号 46 に対して少なくとも 90 %、9

10

20

30

40

50

5 %、96 %、97 %、98 %または99 %の配列同一性を有する。

【0103】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、gp120 と接触する野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸残基の置換を含まない。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のN32、K35、L44、K46またはR59 に対応する位置における置換を含まず、天然に存在するアミノ酸が維持されている。

【0104】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における塩橋を形成するアミノ酸残基の置換を含まない。例えば、ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、K50、D56、R58、R59、K72、E77、E91、R131、D153、K167、E169またはK171 に対応する位置における置換を含まず、天然に存在するアミノ酸が維持されている。

【0105】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のF98 に対応する位置に置換を含まず、例えば、CD4 D1D2 ムテインはバリンによるF98の置換（F98V）を含まない。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のI76 に対応する位置に置換を含まず、例えば、CD4 D1D2 ムテインはプロリンによるI76の置換（I76P）を含まない。

【0106】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、該タンパク質の凝集温度を増加させる少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、本明細書に記載されている置換の1以上を含む。ある実施形態においては、該タンパク質は少なくとも60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃または70℃の凝集温度を有する。ある実施形態においては、該タンパク質は、野生型ヒトCD4 D1D2を含む対応タンパク質の凝集温度より少なくとも7℃、8℃、9℃、10℃、11℃または12℃高い凝集温度を有する。凝集温度は、本明細書の実施例1および2に記載されている熱スキャンアッセイにおける動的光散乱（DLS）を含む、当技術分野で公知の任意の方法により測定されうる。

【0107】

ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、該タンパク質の融解温度を増加させる少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、本明細書に記載されている置換の1以上を含む。ある実施形態においては、該タンパク質は少なくとも50.3℃、51℃、52℃、53℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃または60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃の融解温度を有する。ある実施形態においては、該タンパク質は、野生型ヒトCD4 D1D2を含む対応タンパク質の融解温度より少なくとも0.1℃、1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、11℃、12℃、13℃、14℃、15℃または16℃高い融解温度を有する。融解温度は、本明細書の実施例3に記載されている色素インターカレーションアッセイを用いる熱スキャンアッセイを含む、当技術分野で公知の任意の方法により測定されうる。ある実施形態においては、CD4 D1D2 ムテインは、CD4 D1D2 ムテインの収量を増加させる少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、本明細書に記載されている1以上の置換を含む。ある実施形態においては、該タンパク質は、野生型ヒトCD4 D1D2を含む対応タンパク質の収量の約1.1～5倍、約1.5～5倍、約2～5倍、約3～5倍、約4～5倍、約1.1～4倍、約1.5～4倍、約2～4倍、約4～4倍、約1.1～3倍、約1.5～3倍、約2～3倍、約1.1～2倍、約1.5～2倍、または約1.1～1.5倍の収量で産生される。ある実施形態においては、該タンパク質は、野生型ヒトCD4 D1D2を含む対応タンパク質の収量より少なくとも約1%、約5%、約10

%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約150%、約200%、約250%、約300%、約350%、約400%、約450%高い収量で産生される。

【0108】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、CD4 D1D2ムテインによるウイルス、例えばHIVの中和を増強する少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、本明細書に記載されている置換の1以上を含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインは、CD4⁺CCR5⁺細胞系のHIV感染に対する該タンパク質のIC₅₀を減少させる少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。ウイルス中和は、本明細書の実施例5に記載されているとおり、CD4 D1D2ムテインを含むタンパク質をウイルスおよびCD4⁺CCR5⁺TZM-bl細胞（これはウイルス感染に際してホタルルシフェラーゼを発現する）と共にインキュベートすることを含む、当技術分野で公知の任意の方法により測定されうる。

10

【0109】

ある実施形態においては、該タンパク質は、例えばマウス（例えば、ヒトFcRnトランスジェニックマウス）、ラット、アカゲザルまたはヒトの血漿において、少なくとも12時間、24時間、1日、1.5日、2日、2.5日、3日、3.5日、4日、4.5日、5日、5.5日、6日、6.5日、7日、7.5日、8日、8.5日、9日、9.5日または10日の血漿半減期を有する。例えば、ある実施形態においては、該タンパク質はラットにおいて少なくとも12時間の血漿半減期を有する。ある実施形態においては、該タンパク質はヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいて少なくとも3日の血漿半減期を有する。

20

【0110】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインを含むタンパク質は霊長類レンチウイルスエンベロープ糖タンパク質結合部分を更に含む。該結合部分は、例えば、HIVに対する共受容体であるCCR5のペプチド模倣体を含みうる。ある実施形態においては、該結合部分は、少なくとも1つのスルホチロシンを含む。ある実施形態においては、該結合部分は配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号7のアミノ酸配列を含む。ある実施形態においては、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号7のいずれかにおけるチロシン残基が硫酸化されている。

30

【0111】

その代わりに、またはそれに加えて、ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインを含むタンパク質は免疫グロブリンFcドメインを更に含む。本明細書中で用いる「免疫グロブリンFcドメイン」なる語は、特に示されていない限り、免疫グロブリン重鎖定常領域のフラグメントを意味する。免疫グロブリンFcドメインは、例えば、免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインを含みうる。免疫グロブリンFcドメインは、例えば、免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインならびに免疫グロブリンヒンジ領域を含みうる。ある実施形態においては、免疫グロブリンヒンジ領域はC220の置換または欠失、例えばC220Sを含む。免疫グロブリンヒンジ領域、CH2およびCH3ドメイン間の境界は当技術分野でよく知られており、例えば、PROSITEデータベース（prosite.expasy.orgのワールド・ワイド・ウェブにおいて利用可能）において見出されうる。

40

【0112】

ある実施形態においては、免疫グロブリンFcドメインはヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgEおよびIgM Fcドメインに由来する。ある実施形態においては、免疫グロブリンFcドメインは、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)および／または補体媒介性細胞傷害性(CDC)をもたらすヒトIgG1アイソタイプまたは別のアイソタイプに由来する。ある実施形態においては

50

、免疫グロブリンFcドメインはヒトIgG1アイソタイプに由来する。ある実施形態においては、免疫グロブリンFcドメインは、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）および／または補体媒介性細胞傷害性（CDC）をほとんどまたは全く誘発しないヒトIgG2アイソタイプまたは別のアイソタイプに由来する。ある実施形態においては、免疫グロブリンFcドメインは、ヒトIgG3アイソタイプに由来する。ある実施形態においては、免疫グロブリンFcドメインは、ヒトIgG4アイソタイプに由来する。

【0113】

ある実施形態においては、Fcドメインは、Fcドメインの安定性および／または半減期を増加させる置換、例えば本明細書に記載されている置換の1以上を含む。例えば、ある実施形態においては、FcドメインはM252Y、S254T、T256E、M428L、H433K、N434SおよびN434F置換の少なくとも1つを含む。例えば、Fcドメインは、M252Y、S254TおよびT256E置換、またはM428LおよびN434S置換を含みうる。全てのFcドメイン残基番号は通常のヒトIgG番号付けに従っている（Hessellら（2007）NATURE, 449（7158）：101-4）。

【0114】

ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインを含むタンパク質は免疫グロブリンFcドメインおよび／または霊長類レンチウイルスエンベロープ糖タンパク質結合部分を更に含む。ある実施形態においては、CD4 D1D2ムテインはFcドメインおよび／またはエンベロープ糖タンパク質結合部分に直接的に連結または融合される。他の実施形態においては、CD4 D1D2ムテインはリンカーによりFcドメインおよび／またはエンベロープ糖タンパク質結合部分に共有結合されうる。

【0115】

II. タンパク質の製造

本発明のタンパク質の製造方法は当技術分野で公知である。例えば、CD4ムテインを含むタンパク質をコードするDNA分子を、本明細書に記載されている配列情報を使用して化学的に合成することが可能である。合成DNA分子を、例えば発現制御配列を含む他の適切なヌクレオチド配列に連結して、所望のタンパク質をコードする通常の遺伝子発現構築物を得ることが可能である。

【0116】

CD4を含む所望のタンパク質をコードする核酸を発現ベクター内に組込んで（連結）して、これを通常のトランスフェクションまたは形質転換技術により宿主細胞内に導入することが可能である。形質転換された宿主細胞を、該タンパク質をコードする遺伝子を宿主細胞が発現することを可能にする条件下で増殖させることが可能である。

【0117】

当技術分野で公知の方法を使用して、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号35）をコードするヌクレオチド配列を突然変異させることにより、CD4ムテインをコードする核酸を生成させることが可能である。更に、ある実施形態においては、本発明のタンパク質をコードする核酸を、当該分野で公知の方法を使用して、異種細胞、例えば大腸菌（E. coli）細胞、CHO細胞などにおける発現のためにコドン最適化することが可能である。

【0118】

本明細書に開示されているCD4ムテインをコードする典型的なヌクレオチド配列には、配列番号9（配列番号8に示されているアミノ酸配列をコードする）、配列番号11（配列番号10に示されているアミノ酸配列をコードする）、配列番号13（配列番号12に示されているアミノ酸配列をコードする）、配列番号15（配列番号14に示されているアミノ酸配列をコードする）、配列番号17（配列番号16に示されているアミノ酸配列をコードする）、配列番号19（配列番号18に示されているアミノ酸配列をコードする）、配列番号21（配列番号20に示されているアミノ酸配列をコードする）、配列番号23（配列番号22に示されているアミノ酸配列をコードする）、配列番号25（配列

番号 24 に示されているアミノ酸配列をコードする)、配列番号 27 (配列番号 26 に示されているアミノ酸配列をコードする)、配列番号 29 (配列番号 28 に示されているアミノ酸配列をコードする)、配列番号 31 (配列番号 30 に示されているアミノ酸配列をコードする)、配列番号 33 (配列番号 32 に示されているアミノ酸配列をコードする)、配列番号 37 (配列番号 36 に示されているアミノ酸配列をコードする)、配列番号 39 (配列番号 38 に示されているアミノ酸配列をコードする)、配列番号 41 (配列番号 40 に示されているアミノ酸配列をコードする)、配列番号 43 (配列番号 42 に示されているアミノ酸配列をコードする) および配列番号 45 (配列番号 44 に示されているアミノ酸配列をコードする) が含まれる。

【0119】

具体的な発現および精製条件は、使用される発現系に応じて変動する。例えば、遺伝子を大腸菌 (*E. coli*) 内で発現させたい場合には、それを、操作された遺伝子を適切な細菌プロモーター、例えば *Trp* または *Tac* および原核生物シグナル配列の下流に配置することにより、それを発現ベクター内にクローニングすることが可能である。発現された分泌タンパク質は屈折体または封入体内に蓄積し、フレンチプレスまたは超音波処理による細胞の破壊の後で回収することが可能である。ついで、当技術分野で公知の方法により、屈折体を可溶化し、該タンパク質をリフォールディングさせ、切断する。

【0120】

タンパク質は、該タンパク質の発現を可能にする条件下、そのようなタンパク質をコードする発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を増殖 (培養) させることにより産生されうる。発現後、当技術分野で公知の技術、例えばプロテイン A 精製を用いて、該タンパク質を回収し、精製または単離することが可能である。

【0121】

III. 発現ベクター

もう 1 つの態様においては、本発明は、前記タンパク質のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。もう 1 つの態様においては、本発明は、前記核酸のいずれかをを含む発現ベクターを提供する。ある実施形態においては、発現ベクターはウイルスベクター、例えばアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである。

【0122】

アデノ随伴ウイルス (AAV) はデPENDOPARVOVIRUS 属およびパルボウイルス (Parvovirus) 科の小さな無エンベロープ正二十面体ウイルスである。AAV は約 4.7 kb の一本鎖直鎖状 DNA ゲノムを有する。AAV は、血清型 AAV1 ~ AAV12 および非ヒト霊長類由来の 100 個を超える血清型を含む血清学的に識別可能な多数の型を含む (例えば、Srivastava (2008) J. CELL BIOCHEM., 105 (1): 17-24 および Gao (2004) J. VIROL., 78 (12), 6381-6388 を参照されたい)。AAV は幾つかの組織型の分裂細胞および静止細胞の両方に感染可能であり、AAV 血清型は、それによって異なる組織向性を示す。

【0123】

野生型 AAV ゲノムは 2 つの 145 ヌクレオチドの逆方向末端反復配列 (ITR) を含有し、これらは、AAV 複製、ゲノムキャプシド形成および組込みを導くシグナル配列を含有する。ITR に加えて、3 つの AAV プロモーター、すなわち、p5、p19 および p40 が、rep および cap 遺伝子をコードする 2 つのオープンリーディングフレームの発現を駆動する。2 つの rep プロモーターは、単一の AAV イントロンの特異的スプライシングと組合されて、rep 遺伝子由来の 4 つの rep タンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52 および Rep40) の産生をもたらす。Rep タンパク質はゲノム複製をもたらす。Cap 遺伝子は p40 プロモーターから発現され、cap 遺伝子のスプライス変異体である 3 つのキャプシドタンパク質 (VP1、VP2 および VP3) をコードする。これらのタンパク質は AAV 粒子のキャプシドを形成する。

【0124】

複製、キャプシド形成および組込みのためのシス作用性シグナルはITR内に含有されているため、4.3 kbの内部ゲノムの一部または全部は外来DNA（例えば、目的の外因性タンパク質のための発現カセット）で置換されうる。この場合、repおよびcapタンパク質は、例えばプラスミド上で、トランスで提供される。AAVベクターを製造するためには、AAV複製を許容する宿主細胞系は、repおよびcap遺伝子、ITR隣接発現カセット、ならびにヘルパーウイルスにより提供されるヘルパー機能（例えば、AV遺伝子E1a、E1b55K、E2a、E4orf6およびVA）を発現する必要がある（Weitzmanら、Adeno-associated virus biology. Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols, pp. 1-23, 2011）。AAVベクターを作製および精製するための方法は詳細に記載されている（例えば、Muellerら、(2012) CURRENT PROTOCOLS IN MICROBIOLOGY, 14D. 1. 1-14D. 1. 21, Production and Discovery of Novel Recombinant Adeno-Associated Viral Vectorsを参照されたい）。AAVベクターの製造には多数の細胞型が適しており、それらには、HEK293細胞、COS細胞、HeLa細胞、BHK細胞、Vero細胞および昆虫細胞が含まれる（例えば、米国特許第6,156,303号、第5,387,484号、第5,741,683号、第5,691,176号、第5,688,676号、第8,163,543号、米国特許公開番号20020081721、PCT公開番号WO00/47757、WO00/24916およびWO96/17947を参照されたい）。AAVベクターは、典型的には、ITR隣接発現カセットを含有する1つのプラスミドと、追加的AAVおよびヘルパーウイルス遺伝子を提供する1以上の追加的プラスミドとにより、これらの細胞型において製造される。

【0125】

任意の血清型のAAVが本発明において使用されうる。同様に、任意のAV型が使用されうると想定され、当業者は、所望の組換えAAVベクター（rAAV）の製造に適したAAVおよびAV型を特定することが可能であろう。AAVおよびAV粒子は、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオジキソナル勾配またはCsCl勾配により精製されうる。

【0126】

AAVベクターは、4.7 kbのサイズの又は4.7 kbより大きな若しくは小さな（5.2 kbもの又は僅か3.0 kbの特大または特小ゲノムを含む）一本鎖ゲノムを有しうる。更に、ベクターゲノムは、ウイルス内でゲノムが実質的に二本鎖となるように、実質的に自己相補的でありうる。全ての型のゲノムを含むAAVベクターが本発明の方法における使用に適している。

【0127】

典型的なAAVベクターはGardner, M. R.ら(2015) NATURE, 519 (7541): 87-91に記載されている。典型的なAAVベクターヌクレオチド配列は配列番号34に示されている。

【0128】

IV. 医薬組成物

治療用途の場合、本明細書に開示されているタンパク質または発現ベクターは、好ましくは、薬学的に許容される担体と組合される。本明細書中で用いる「薬学的に許容される」なる語は、妥当な医学的判断の範囲内で、妥当な利益／リスク比に相応して、過度の毒性、刺激、アレルギー反応または他の問題もしくは合併症を伴うことなくヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適した化合物、物質、組成物および／または剤形に関するものである。

【0129】

本明細書中で用いる「薬学的に許容される担体」なる語は、妥当な利益／リスク比に相応して、過度の毒性、刺激、アレルギー反応または他の問題もしくは合併症を伴うことな

10

20

30

40

50

くヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適したバッファー、担体および賦形剤を意味する。薬学的に許容される担体には、標準的な医薬担体のいずれか、例えば、リン酸緩衝食塩水、水、エマルジョン（例えば、油／水または水／油エマルジョン）、および種々のタイプの湿潤剤が含まれる。組成物は安定剤および保存剤をも含む。担体、安定剤およびアジュバントの具体例は、例えば、Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PAを参照されたい。薬学的に許容される担体には、薬学的投与に適したバッファー、溶媒、分散媒、コーティング、等張および吸収遅延剤などが含まれる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および物質の使用は当技術分野で公知である。

【0130】

ある実施形態においては、医薬組成物は、例えば、組成物のpH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、におい、無菌性、安定性、溶解または放出速度、吸着または浸透を修飾、維持または保持するための製剤化物質を含有しうる。そのような実施形態においては、適切な製剤化物質には以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；抗菌生物剤；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム）；バッファー（例えば、ボラート、ピカルボナート、Tris-HCl、シトラート、ホスファートまたは他の有機酸）；増量剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））；錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータシクロデキストリンまたはヒドロキシプロピルベータシクロデキストリン）；充填剤；単糖；二糖；および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；着色剤、香味剤および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素）；溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えばポリソルベート20、ポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパル）；安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）；張性増強剤（例えば、アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトール）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤および／または医薬アジュバント（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990)を参照されたい）。

【0131】

ある実施形態においては、医薬組成物はナノ粒子、例えばポリマーナノ粒子、リポソームまたはミセルを含有しうる（Anselmoら（2016）BIOENG. TRANS L. MED. 1: 10-29を参照されたい）。

【0132】

ある実施形態においては、医薬組成物は持続性または制御化送達製剤を含む。持続性または制御化送達手段、例えばリポソーム担体、生分解性微粒子または多孔性ビーズおよびデポー注射剤を製剤化するための技術も当業者に公知である。徐放性製剤には、造形物、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態の、例えば多孔性ポリマー微粒子または半透性ポリマーマトリックスが含まれる。徐放性マトリックスには、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド、L-グルタミン酸とガンマエチル-L-グルタマートとのコポリマー、ポリ（2-ヒドロキシエチル-インエタクリラート）、エチレンビニルアセタートまたはポリ-D（-）-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。徐放性組成物には、当技

10

20

30

40

50

術分野で公知の幾つかの方法のいずれかにより製造されうるリボソームが含まれる。

【0133】

本明細書に開示されているタンパク質または発現ベクターを含有する医薬組成物は単位剤形として提供されることが可能であり、任意の適切な方法により製造されうる。医薬組成物は、その意図された投与経路に適合するように製剤化されるべきである。投与経路の例としては、静脈内（IV）、皮下、皮内、吸入、経皮、局所、経粘膜、くも膜下腔内および直腸投与が挙げられる。典型的な投与経路はIV注入である。有用な製剤は薬学分野で公知の方法により製造されうる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990) を参照されたい。非経口投与に適した製剤化成分には、無菌希釈剤、例えば注射用水、塩類溶液（生理食塩水）、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばEDTA；バッファー、例えばアセタート、シトラートまたはホスファート；張性調整剤、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロースが含まれる。

10

【0134】

静脈内投与の場合、適切な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL TM (BASF, Parsippany, NJ) またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が含まれる。担体は製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、微生物に対して保護されるべきである。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール）およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒でありうる。

20

【0135】

医薬製剤は、好ましくは無菌である。滅菌は、任意の適切な方法、例えば、滅菌濾過膜による濾過により達成されうる。組成物が凍結乾燥される場合、凍結乾燥および還元（再構成）の前または後に濾過滅菌が行われうる。

【0136】

本明細書に記載されている組成物は局所的または全身的に投与されうる。ある実施形態においては、投与は非経口投与である。ある実施形態においては、医薬組成物は皮下投与され、ある実施形態においては、静脈内投与される。非経口投与のための製剤には、無菌の水性または非水性の溶液、懸濁液およびエマルションが含まれる。

30

【0137】

ある実施形態においては、有効成分の治療的有效量は $0.1 \text{ mg/kg} \sim 100 \text{ mg/kg}$ 、例えば、 $1 \text{ mg/kg} \sim 100 \text{ mg/kg}$ 、 $1 \text{ mg/kg} \sim 50 \text{ mg/kg}$ 、 $1 \text{ mg/kg} \sim 40 \text{ mg/kg}$ 、 $1 \text{ mg/kg} \sim 30 \text{ mg/kg}$ 、 $1 \text{ mg/kg} \sim 20 \text{ mg/kg}$ 、 $1 \text{ mg/kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$ 、 $1 \text{ mg/kg} \sim 5 \text{ mg/kg}$ の範囲、 50 mg/kg 、 40 mg/kg 、 30 mg/kg 、 20 mg/kg 、 10 mg/kg 、 7.5 mg/kg 、 5 mg/kg または 2.5 mg/kg である。ある実施形態においては、ウイルスベクターの治療有効量は $10^2 \sim 10^{15}$ ベクターゲノム（vg）コピー、例えば、 $10^2 \sim 10^{10}$ 、 $10^2 \sim 10^5$ 、 $10^5 \sim 10^{15}$ 、 $10^5 \sim 10^{10}$ 、 $10^{10} \sim 10^{15}$ 、 $10^{10} \sim 10^{14}$ 、 $10^{10} \sim 10^{12}$ 、または $10^{12} \sim 10^{14}$ vg コピーの範囲である。投与される量は、治療される疾患または適応症のタイプおよび度合、患者の全身健康状態、有効成分のインビボ効力、医薬製剤および投与経路のような変数に左右される。望ましい血中レベルまたは組織レベルを迅速に達成するために、初期投与量は、上限レベルを超えて増加されうる。あるいは、初期投与量は最適より少なくすることが可能であり、1日投与量は治療の経過中で徐々に増加されうる。ヒトへの投与量は、例えば、 $0.5 \text{ mg/kg} \sim 30 \text{ mg/kg}$ を投与するように設計された通常の第I相用量漸増試験において最適化されうる。投与頻度は、投与経路、投与量、抗体の血清半減期、治療される疾患のような要因により変動しうる。典型的な投与頻度は1日1回、週1回および2週間に1回である。典型的な投与経路は非経口、例えば静脈内注入である。ある実施形態にお

40

50

いては、本明細書に開示されているタンパク質または発現ベクターは凍結乾燥され、ついで、投与時に緩衝生理食塩水で還元（再構成）される。

【0138】

V. 治療用途

本明細書に開示されているタンパク質、発現ベクター、組成物および方法は、対象におけるヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染を治療するために使用されうる。本発明は対象におけるHIV感染の治療方法を提供する。該方法は、本明細書に開示されているタンパク質、発現ベクターまたは医薬組成物の有効量を、単独で、または別の治療用物質と組合せて、対象に投与して、対象におけるHIV感染を治療することを含む。本発明はまた、宿主細胞、例えばヒト宿主細胞内へのHIVの侵入を遮断する方法を提供する。該方法は、本明細書に開示されているタンパク質、発現ベクターまたは医薬組成物の有効量を、単独で、または別の治療用物質と組合せて、宿主細胞にさらして、宿主細胞内へのHIVの侵入を遮断することを含む。本発明はまた、HIVに感染した宿主細胞、例えばヒト宿主細胞を殺滅する方法を提供する。該方法は、本明細書に開示されているタンパク質、発現ベクターまたは医薬組成物の有効量を、単独で、または別の治療用物質と組合せて、宿主細胞にさらして、感染宿主細胞を殺滅することを含む。本発明はまた、ウイルス粒子、例えばHIVウイルス粒子の不活化を引き起こす方法を提供する。該方法は、本明細書に開示されているタンパク質、発現ベクターまたは医薬組成物の有効量を、単独で、または別の治療用物質と組合せて、ウイルス粒子の不活化を引き起こすことを含む。本発明はまた、対象の血漿からウイルス粒子、例えばHIVウイルス粒子を除去する方法を提供する。該方法は、本明細書に開示されているタンパク質、発現ベクターまたは医薬組成物の有効量を、単独で、または別の治療用物質と組合せて、対象にさらして、対象の血漿からウイルス粒子を除去することを含む。

【0139】

本明細書中で用いる「有効量」なる語は、有益なまたは所望の結果を得るのに十分な、活性物質（例えば、本発明の突然変異CD4 D1D2を含むタンパク質、または本発明の突然変異CD4 D1D2を含むタンパク質を発現するウイルスベクター）の量を意味する。有効量は1以上の投与、適用または投薬において投与可能であり、特定の製剤または投与経路に限定されるとは意図されない。

【0140】

本明細書中で用いる「治療する」、「治療し」および「治療」は、対象、例えばヒトにおける疾患の治療を意味する。これは、（a）疾患を抑制すること、すなわち、その発生を阻止すること、および（b）疾患を緩和すること、すなわち、病態を退縮させることを含む。本明細書中で用いる「対象」および「患者」なる語は、本明細書に記載されている方法および組成物により治療される生物を意味する。そのような生物は、好ましくは哺乳動物（例えば、マウス、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど）を含み、より好ましくはヒトを含むが、これらに限定されるものではない。

【0141】

本明細書に記載されている方法および組成物は、単独で、または他の治療用物質および／もしくは治療方式と組合せて使用されうる。本明細書中で用いる「組合せて」投与されるなる語は、患者に対する複数の治療の効果が或る時点で重複するように、対象の障害罹患の経過中に2つ（またはそれ以上）の異なる治療が対象に適用されることを意味すると理解される。ある実施形態においては、1つの治療の適用が、第2の治療の適用が始まる際に尚も行われていて、投与に関する重複が存在する。これは、本明細書においては、「同時」または「共通適用」と称されることがある。他の実施形態においては、1つの治療の適用が、その他の治療の適用が始まる前に終了する。いずれの場合も、ある実施形態においては、治療は、組合せ投与ゆえに、より有効である。例えば、第2の治療はより有効であり、例えば、第2の治療をより少量で用いた場合に同等の効果が見られ、または第1の治療の非存在下で第2の治療が適用された場合に見られるものよりも症状を大幅に軽減し、あるいは第1の治療で同様の状況が見られる。ある実施形態においては、症状または他

の障害関連パラメータにおける低減が、その他の治療の非存在下で適用される1つの治療で観察されるものより大きくなるように、適用が行われる。そのような2つの治療の効果は部分的に相加的、完全に相加的、または相加的を超えるものでありうる。適用された第1の治療の効果は、第2の治療が適用される際に尚も検出可能であるように、適用が行われうる。

【0142】

ある実施形態においては、本明細書に記載されている方法または組成物は、ヌクレオシド／ヌクレオチド逆転写酵素インヒビター（例えば、ラミブジン、アバカビル、ジドブジン、スタブジン、ジダノシン、エムトリシタビンおよびテノホビル）、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター（例えば、デラビルジン、エファビレンツ、エトラビルンおよびネビラピン）、プロテアーゼインヒビター（例えば、アンブレナビル、フォサムブレナビル、アタザナビル、ダルナビル、インジナビル、ロピナビル、リトナビル、ネルフィナビル、サキナビルおよびチプラナビル）、融合または侵入インヒビター（例えば、エンフビルチドおよびマラビロック）、インテグラーゼインヒビター（例えば、ラルテグラビルおよびカボテグラビル）またはそれらの任意の組合せと組合せて投与（適用）される。ある実施形態においては、本明細書に記載されている方法または組成物は、潜伏感染再活性化剤（LRA）、例えば、HDACインヒビター（例えば、ポリノスタット）またはTLR7アゴニスト（例えば、米国特許公開番号US20160008374A1に記載されているGS-9620）と組合せて投与される。

【0143】

本明細書の全体において、組成物が特定の成分を有する、含有する又は含むと記載されている場合、あるいはプロセスおよび方法が特定の工程を有する、含有する又は含むと記載されている場合、挙げられている成分から実質的になる又はそれらからなる本発明の組成物が追加的に存在すること、および挙げられているプロセス工程から実質的になる又はそれらからなる本発明のプロセスおよび方法が存在することが想定される。

【0144】

本出願においては、要素または成分が、挙げられている要素または成分の一覧に含まれる又は該一覧から選択されると記載されている場合、該要素または成分は、挙げられている要素または成分の任意の1つでありうる、あるいは該要素または成分は、挙げられている要素または成分の2以上からなる群から選択されうると理解されるべきである。

【0145】

更に、本明細書に記載されている組成物または方法の要素および／または特徴は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、種々の状態で組合されることが、それが本明細書において明示的または暗示的であるかどうかにかかわらず可能である、と理解されるべきである。例えば、特定の化合物に言及されている場合、文脈から別のように理解されない限り、その化合物は、本発明の組成物の種々の実施形態において、および／または本発明の方法において使用されうる。換言すれば、本出願においては、明確かつ簡潔な適用が記載され示されることを可能にする状態で実施形態が記載され示されているが、実施形態は、本教示および本発明から切り離されることなく種々に組合され又は分離されうる、と意図され、理解される。例えば、本明細書に記載され示されている全ての特徴は、本明細書に記載され示されている本発明の全態様に適用可能でありうると理解される。

【0146】

「の少なくとも1つ」なる表現は、文脈および用法から別のように理解されない限り、該表現の前の列挙物のそれぞれを個々に、および該列挙物の2以上の種々の組合せを含むと理解されるべきである。3以上の列挙物に関する「および／または」なる表現は、文脈から別のように理解されない限り、同じ意味を有すると理解されるべきである。

【0147】

「含む」、「含み」、「含んで」、「有する」、「有して」、「有し」、「含有する」、「含有して」または「含有し」（それらの文法的等価物を含む）なる語の使用は、特に示されていない限り又は文脈から別のように理解されない限り、オープンエンドかつ非限

10

20

30

40

50

定的であり、例えば、追加的な非列挙要素または工程を除外しない、と一般に理解されるべきである。

【0148】

「約」なる語が定量的な値の前で用いられている場合、特に示されていない限り、本発明はその特定の定量的な値自体をも含む。本明細書中で用いる「約」なる語は、特に記載または示唆されていない限り、名目値からの±10%の変動を意味する。

【0149】

工程の順序または或る行為の実施の順序は、本発明が依然として実施可能である限り、重要でないと理解されるべきである。更に、2以上の工程または行為は同時に実施される。

【0150】

本明細書におけるあらゆる全ての例示、または例示的言語表現、例えば「例えば」または「含む」の使用は、本発明をより詳細に例示することを意図しているに過ぎず、特許請求の範囲において限定されていない限り本発明の範囲を限定するものではない。本明細書におけるいかなる表現も、特許請求されていない要素が本発明の実施に必須であることを示すと解釈されるべきではない。

本発明は一態様において以下を提供する。

[項目1]

ヒトCD4ドメイン1およびドメイン2(CD4 D1D2)ムテインを含むタンパク質であって、ここで、CD4 D1D2ムテインは野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)に対して少なくとも90%同一であり、

(a) 非荷電アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)における塩基性アミノ酸の置換、

(b) 酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)における塩基性アミノ酸の置換、

(c) 酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)における非荷電アミノ酸の置換、または

(d) 置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)におけるグリシンもしくは埋もれた疎水性側鎖を有するアミノ酸の置換

のうちの少なくとも1つの置換を含み、該置換が、非ヒト霊長類CD4 D1D2において野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)とは非同位である位置におけるものである、タンパク質。

[項目2]

ヒトCD4ドメイン1およびドメイン2(CD4 D1D2)ムテインを含むタンパク質であって、CD4 D1D2ムテインが野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)に対して少なくとも90%同一であり、野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)のK1、K2、V4、L5、G6、K7、K8、D10、T11、V12、L14、T15、T17、A18、S19、Q20、K21、K22、S23、I24、Q25、H27、N30、N32、I34、K35、I36、L37、N39、G41、S42、L44、K46、P48、K50、L51、N52、D53、A55、D56、R58、R59、S60、L61、Q64、G65、N66、F67、P68、L69、I70、I71、K72、K73、L74、K75、I76、E77、D80、T81、V86、E87、D88、Q89、E91、V93、Q94、L95、L96、V97、F98、G99、T101、A102、N103、S104、D105、H107、L108、Q110、S113、L114、L116、T117、L118、S120、P121、P122、G123、S124、S125、V128、Q129、C130、R131、S132、P133、R134、G135、N137、I138、Q139、G140、G141、K142、T143、L144、S145、V146、S147、L149、E150、L151、Q152、D153、G155、T156、W157、T158、T160、V16

1、L162、Q163、N164、Q165、K166、K167、V168、E169、F170、K171、I172、D173、I174、V175、V176またはA178に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、タンパク質。

[項目3]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、V4、G6、K7、D10、T11、V12、T15、T17、A18、S19、Q20、K21、K22、S23、I24、Q25、H27、N30、N32、I34、K35、N39、G41、S42、L44、K46、P48、K50、L51、N52、D53、A55、D56、R58、R59、S60、L61、Q64、G65、N66、P68、L69、I70、K72、K73、L74、K75、I76、E77、D80、T81、E87、D88、Q89、E91、Q94、L96、G99、T101、A102、N103、S104、D105、H107、L108、Q110、S113、T117、S120、P122、G123、S124、S125、V128、Q129、C130、R131、S132、R134、G135、N137、I138、Q139、G140、G141、K142、T143、L144、S145、V146、S147、E150、L151、Q152、D153、T156、W157、T158、T160、V161、L162、Q163、N164、Q165、K166、K167、V168、E169、F170、K171、I172、D173、I174、V175またはA178に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1または2記載のタンパク質。

10

[項目4]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、K7、D10、T11、T15、T17、A18、S19、Q20、K21、K22、S23、I24、Q25、H27、N30、N32、I34、N39、G41、S42、L44、K46、P48、N52、D53、A55、R59、L61、Q64、G65、N66、P68、L69、I70、K72、K73、L74、K75、I76、D80、E87、D88、Q89、Q94、L96、A102、N103、S104、Q110、S113、T117、S120、S124、Q129、R131、R134、N137、Q139、G140、G141、K142、T143、L144、S145、V146、S147、E150、L151、Q152、T156、W157、T158、T160、V161、L162、N164、Q165、K166、K167、V168、K171、D173、I174またはV175に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～3のいずれか1項記載のタンパク質。

20

30

[項目5]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK2、D10、T15、T17、S19、Q20、K21、K22、S23、I24、Q25、N30、N32、I34、N39、P48、N52、D53、A55、R59、G65、N66、P68、L69、D80、E87、D88、Q89、Q94、Q110、T117、S120、S124、Q129、R134、G140、K142、L144、S147、L151、T156、W157、T160、V161、L162、N164、K166またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～4のいずれか1項記載のタンパク質。

40

[項目6]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、T15、T17、Q20、I34、N52、D53、A55、R59、G65、P68、E87、D88、T117、S120、R134、G140、S147、W157、T160、N164またはK166に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～5のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目7]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK2、D10、T15、T17、S19、Q20、K21、K22、S23、I24、Q25、N3

50

0、N32、I34、N39、P48、N52、A55、R59、N66、P68、L69、D80、D88、Q89、Q94、Q110、S124、Q129、R134、G140、K142、L144、S147、L151、T156、T160、V161、L162、N164、K166またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～6のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目8]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のL5、G6、V12、L14、A18、I24、I36、L37、Q40、L44、L51、A55、G65、F67、P68、L69、V93、G99、I71、L74、V86、V93、L95、L96、V97、F98、A102、L108、L114、L116、L118、P121、V128、P133、I138、G141、L144、V146、L149、G155、V161、V168、F170、I172、I174またはV176に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～7のいずれか1項記載のタンパク質。

10

[項目9]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のG6、A55、L116、V128、V146、V168またはV176に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～8のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目10]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のL116、V128、V146、V168またはV176に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～9のいずれか1項記載のタンパク質。

20

[項目11]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、K7、K21、K22、K35、K46、K50、R58、R59、K72、K75、R131、R134、K142、K166、K167またはK171に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～10のいずれか1項記載のタンパク質。[項目12]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のV4、T11、T15、T17、S19、Q20、S23、Q25、H27、N30、N32、I34、S42、P48、N52、S60、L61、Q64、N66、I70、I76、T81、Q89、Q94、T101、N103、S104、H107、Q110、S113、T117、S120、P122、G123、S124、S125、Q129、G135、N137、Q139、G140、T143、S145、S147、L151、Q152、T156、T158、T160、L162、Q163、N164、Q165、V175またはA178に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～11のいずれか1項記載のタンパク質。

30

[項目13]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK2、G6、K8、T15、T17、K21、S23、A55、I70、K72、K75、Q94、L96、Q110、L116、V128、R134、K142、V146、N164、K166、K167、V168またはV176に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～12のいずれか1項記載のタンパク質。

40

[項目14]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のG6、S23、A55、K72、K75、Q94、L96、Q110、L116、V128、R134、V146、N164、K167、V168またはV176に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目13記載のタンパク質。

[項目15]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のG6、S2

50

3、A55、K72、K75、Q94、L96、Q110、V128、R134、V146、N164、K167またはV168に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目14記載のタンパク質。

[項目16]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK72、K75、Q94、Q110、L116、V128、R134、V146、N164、K167、V168またはV176に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目15記載のタンパク質。

[項目17]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のS23、A55、R134、N164またはK167に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目16記載のタンパク質。

10

[項目18]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のG6、S23、A55、V128、V146またはV168に対応する位置における少なくとも1つの置換を含む、項目1～17のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目19]

CD4 D1D2ムテインがCD4 D1ドメインにおける少なくとも1つの置換およびCD4 D2ドメインにおける少なくとも1つの置換を含む、項目1～18のいずれか1項記載のタンパク質。

20

[項目20]

CD4 D1D2ムテインが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の置換を含む、項目1～19のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目21]

CD4 D1D2ムテインが野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）に対して少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である、項目1～20のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目22]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）における表面露出側鎖を有するアミノ酸位置における10、9、8、7、6、5、4、3、2個または1個より少ない置換を含む、項目1～21のいずれか1項記載のタンパク質。

30

[項目23]

CD4 D1D2ムテインが、以下の位置：

- (1) A55およびK72；
- (2) A55およびK75；
- (3) A55およびQ94；
- (4) A55およびQ110；
- (5) A55およびL116；
- (6) A55およびV128；
- (7) A55およびR134；
- (8) A55およびV146；
- (9) A55およびN164；
- (10) A55およびK167；
- (11) A55およびV168；
- (12) S23およびK72；
- (13) S23およびK75；
- (14) S23およびQ94；
- (15) S23およびQ110；
- (16) S23およびL116；

40

50

<u>(17) S 2 3 および V 1 2 8 ;</u>	
<u>(18) S 2 3 および R 1 3 4 ;</u>	
<u>(19) S 2 3 および V 1 4 6 ;</u>	
<u>(20) S 2 3 および N 1 6 4 ;</u>	
<u>(21) S 2 3 および K 1 6 7 ;</u>	
<u>(22) S 2 3 および V 1 6 8 ;</u>	
<u>(23) G 6 および K 7 2 ;</u>	
<u>(24) G 6 および K 7 5 ;</u>	
<u>(25) G 6 および Q 9 4 ;</u>	
<u>(26) G 6 および Q 1 1 0 ;</u>	10
<u>(27) G 6 および L 1 1 6 ;</u>	
<u>(28) G 6 および V 1 2 8 ;</u>	
<u>(29) G 6 および R 1 3 4 ;</u>	
<u>(30) G 6 および V 1 4 6 ;</u>	
<u>(31) G 6 および N 1 6 4 ;</u>	
<u>(32) G 6 および K 1 6 7 ;</u>	
<u>(33) G 6 および V 1 6 8 ;</u>	
<u>(34) K 7 2 および K 7 5 ;</u>	
<u>(35) K 7 2 および Q 9 4 ;</u>	
<u>(36) K 7 2 および Q 1 1 0 ;</u>	20
<u>(37) K 7 2 および L 1 1 6 ;</u>	
<u>(38) K 7 2 および V 1 2 8 ;</u>	
<u>(39) K 7 2 および R 1 3 4 ;</u>	
<u>(40) K 7 2 および V 1 4 6 ;</u>	
<u>(41) K 7 2 および N 1 6 4 ;</u>	
<u>(42) K 7 2 および K 1 6 7 ;</u>	
<u>(43) K 7 2 および V 1 6 8 ;</u>	
<u>(44) K 7 5 および Q 9 4 ;</u>	
<u>(45) K 7 5 および Q 1 1 0 ;</u>	
<u>(46) K 7 5 および L 1 1 6 ;</u>	30
<u>(47) K 7 5 および V 1 2 8 ;</u>	
<u>(48) K 7 5 および R 1 3 4 ;</u>	
<u>(49) K 7 5 および V 1 4 6 ;</u>	
<u>(50) K 7 5 および N 1 6 4 ;</u>	
<u>(51) K 7 5 および K 1 6 7 ;</u>	
<u>(52) K 7 5 および V 1 6 8 ;</u>	
<u>(53) Q 9 4 および Q 1 1 0 ;</u>	
<u>(54) Q 9 4 および L 1 1 6 ;</u>	
<u>(55) Q 9 4 および V 1 2 8 ;</u>	
<u>(56) Q 9 4 および R 1 3 4 ;</u>	40
<u>(57) Q 9 4 および V 1 4 6 ;</u>	
<u>(58) Q 9 4 および N 1 6 4 ;</u>	
<u>(59) Q 9 4 および K 1 6 7 ;</u>	
<u>(60) Q 9 4 および V 1 6 8 ;</u>	
<u>(61) Q 1 1 0 および L 1 1 6 ;</u>	
<u>(62) Q 1 1 0 および V 1 2 8 ;</u>	
<u>(63) Q 1 1 0 および R 1 3 4 ;</u>	
<u>(64) Q 1 1 0 および V 1 4 6 ;</u>	
<u>(65) Q 1 1 0 および N 1 6 4 ;</u>	
<u>(66) Q 1 1 0 および K 1 6 7 ;</u>	50

(67) Q110 および V168 ;
(68) L116 および V128 ;
(69) L116 および R134 ;
(70) L116 および V146 ;
(71) L116 および N164 ;
(72) L116 および K167 ;
(73) L116 および V168 ;
(74) V128 および R134 ;
(75) V128 および V146 ;
(76) V128 および N164 ;
(77) V128 および K167 ;
(78) V128 および V168 ;
(79) V146 および N164 ;
(80) V146 および K167 ;
(81) V146 および V168 ; または
(82) N164 および K167

10

における置換を含む、項目1～22のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目24]

CD4 D1D2 ムテインが、以下の位置：

20

(1) S23、A55 および K72 ;
(2) S23、A55 および K75 ;
(3) S23、A55 および Q94 ;
(4) S23、A55 および Q110 ;
(5) S23、A55 および L116 ;
(6) S23、A55 および V128 ;
(7) S23、A55 および R134 ;
(8) S23、A55 および V146 ;
(9) S23、A55 および N164 ;
(10) S23、A55 および K167 ;
(11) S23、A55 および V168 ;
(12) G6、S23 および K72 ;
(13) G6、S23 および K75 ;
(14) G6、S23 および Q94 ;
(15) G6、S23 および Q110 ;
(16) G6、S23 および L116 ;
(17) G6、S23 および V128 ;
(18) G6、S23 および R134 ;
(19) G6、S23 および V146 ;
(20) G6、S23 および N164 ;
(21) G6、S23 および K167 ;
(22) G6、S23 および V168 ;
(23) G6、A55 および K72 ;
(24) G6、A55 および K75 ;
(25) G6、A55 および Q94 ;
(26) G6、A55 および Q110 ;
(27) G6、A55 および L116 ;
(28) G6、A55 および V128 ;
(29) G6、A55 および R134 ;
(30) G6、A55 および V146 ;
(31) G6、A55 および N164 ;

30

40

50

- (32) G 6、A 5 5 および K 1 6 7 ;
- (33) G 6、A 5 5 および V 1 6 8 ;
- (34) G 6、S 2 3、A 5 5 および K 7 2 ;
- (35) G 6、S 2 3、A 5 5 および K 7 5 ;
- (36) G 6、S 2 3、A 5 5 および Q 9 4 ;
- (37) G 6、S 2 3、A 5 5 および Q 1 1 0 ;
- (38) G 6、S 2 3、A 5 5 および L 1 1 6 ;
- (39) G 6、S 2 3、A 5 5 および V 1 2 8 ;
- (40) G 6、S 2 3、A 5 5 および R 1 3 4 ;
- (41) G 6、S 2 3、A 5 5 および V 1 4 6 ;
- (42) G 6、S 2 3、A 5 5 および N 1 6 4 ;
- (43) G 6、S 2 3、A 5 5 および K 1 6 7 ; または
- (44) G 6、S 2 3、A 5 5 および V 1 6 8

における置換を含む、項目 1 ～ 2 3 のいずれか 1 項記載のタンパク質。

[項目 2 5]

- C D 4 D 1 D 2 ムテインが、以下の位置：
- (1) R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
 - (2) K 7 2、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
 - (3) K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
 - (4) Q 9 4、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
 - (5) Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
 - (6) Q 9 4、Q 1 1 0 および R 1 3 4 ;
 - (7) Q 9 4、Q 1 1 0 および N 1 6 4 ;
 - (8) Q 9 4、Q 1 1 0 および K 1 6 7 ;
 - (9) Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
 - (10) K 7 2、K 7 5 および R 1 3 4 ;
 - (11) K 7 2、K 7 5 および N 1 6 4 ;
 - (12) K 7 2、K 7 5 および K 1 6 7 ;
 - (13) K 7 2、K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
 - (14) V 1 2 8、V 1 6 8 および R 1 3 4 ;
 - (15) V 1 2 8、V 1 6 8 および N 1 6 4 ;
 - (16) V 1 2 8、V 1 6 8 および K 1 6 7 ;
 - (17) V 1 2 8、V 1 6 8 および V 1 4 6 ;
 - (18) V 1 2 8、V 1 6 8 および L 1 1 6 ;
 - (19) V 1 2 8、V 1 6 8 および K 7 2 ;
 - (20) V 1 2 8、V 1 6 8 および K 7 5 ;
 - (21) V 1 2 8、V 1 6 8 および Q 9 4 ;
 - (22) V 1 2 8、V 1 6 8 および Q 1 1 0 ;
 - (23) V 1 4 6、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
 - (24) V 1 4 6、R 1 3 4 および N 1 6 4 ;
 - (25) R 1 3 4、K 1 4 2、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
 - (26) I 7 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
 - (27) K 7 2、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
 - (28) Q 9 4、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
 - (29) Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
 - (30) Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
 - (31) Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
 - (32) K 7 2、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
 - (33) K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
 - (34) K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;

10

20

30

40

50

(35) V128、V168、R134およびK72；
(36) V128、V168、R134およびK75；
(37) V128、V168、R134およびQ94；
(38) V128、V168、R134およびQ110；
(39) V128、V168、R134およびL116；
(40) V128、V168、R134およびV146；
(41) V128、V168、R134およびN164；
(42) V128、V168、R134およびK167；
(43) V128、V168、V146およびK72；
(44) V128、V168、V146およびK75；
(45) V128、V168、V146およびQ94；
(46) V128、V168、V146およびQ110；
(47) V128、V168、V146およびN164；または
(48) V128、V168、V146およびK167

における置換を含む、項目1～24のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目26]

CD4 D1D2ムテインが、以下の位置：

(1) G6、A55、V128およびV168；
(2) G6、A55、V146およびV168；
(3) G6、A55、V128およびV146；
(4) G6、A55、V128、V146およびV168；
(5) G6、S23、A55、V128およびV168；
(6) G6、S23、A55、V128、V146およびV168；
(7) G6、S23、A55、V128、R134、V146およびV168；
(8) A55、V128、V168およびK72；
(9) A55、V128、V168およびK75；
(10) A55、V128、V168およびQ94；
(11) A55、V128、V168およびQ110；
(12) A55、V128、V168およびL116；
(13) A55、V128、V168およびR134；
(14) A55、V128、V168およびV146；
(15) A55、V128、V168およびK167；
(16) S23、V128、V168およびK72；
(17) S23、V128、V168およびK75；
(18) S23、V128、V168およびQ94；
(19) S23、V128、V168およびQ110；
(20) S23、V128、V168およびL116；
(21) S23、V128、V168およびR134；
(22) S23、V128、V168およびV146；
(23) S23、V128、V168およびK167；
(24) S23、A55、R134およびK167；
(25) S23、A55、R134、N164およびK167；
(26) S23、A55、K72、R134およびK167；
(27) S23、A55、K75、R134およびK167；
(28) S23、A55、Q94、R134およびK167；
(29) S23、A55、L96、R134およびK167；
(30) S23、A55、Q110、R134およびK167；
(31) S23、K72、K75、R134およびK167；
(32) S23、K72、K75、R134、N164およびK167；
(33) S23、A55、K72、K75、R134およびK167；

- (34) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(35) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(36) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(37) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(38) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(39) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、L 9 6、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(40) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4およびK 1 6 7；
(41) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4およびK 1 6 7；
(42) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、V 1 4 6およびK 1 6 7；
(43) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、K 1 6 7、V 1 6 8；
(44) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、K 1 6 7、V 1 6 8；
(45) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、V 1 4 6、K 1 6 7、V 1 6 8；
(46) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、N 1 6 4、K 1 6 7、V 1 6 8；
(47) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、V 1 4 6、N 1 6 4、K 1 6 7、V 1 6 8；
(48) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4およびK 1 6 7；
(49) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、V 1 4 6およびK 1 6 7；
(50) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、K 1 6 7、V 1 6 8；
(51) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、K 1 6 7、V 1 6 8；
(52) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、V 1 4 6、K 1 6 7、V 1 6 8；
(53) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、N 1 6 4、K 1 6 7、V 1 6 8；
(54) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、V 1 2 8、R 1 3 4、V 1 4 6、N 1 6 4、K 1 6 7、V 1 6 8；
(55) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、V 1 2 8およびV 1 6 8；
(56) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 5、V 1 2 8およびV 1 6 8；
(57) G 6、S 2 3、A 5 5、Q 9 4、V 1 2 8およびV 1 6 8；
(58) G 6、S 2 3、A 5 5、Q 1 1 0、V 1 2 8およびV 1 6 8；
(59) G 6、S 2 3、A 5 5、V 1 2 8、N 1 6 4およびV 1 6 8；
(60) G 6、S 2 3、A 5 5、V 1 2 8、K 1 6 7およびV 1 6 8；
(61) A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(62) L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6およびR 1 3 4；
(63) L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6およびN 1 6 4；

10

20

30

40

50

(64) L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6およびK 1 6 7；
(65) S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(66) G 6、S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(67) S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(68) L 5、S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；または
(69) L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7における
置換を含む、項目1～25のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目27]

CD 4 D 1 D 2 ムテインが、以下の位置：
(1) A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(2) S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(3) L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；
(4) A 5 5、V 1 2 8およびV 1 6 8；
(5) S 2 3、A 5 5、V 1 2 8およびV 1 6 8；
(6) G 6、S 2 3、A 5 5、V 1 2 8およびV 1 6 8；
(7) G 6、S 2 3、A 5 5、V 1 2 8、V 1 4 6およびV 1 6 8；
(8) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4およびK 1 6 7；
(9) G 6、S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4およびK
1 6 7；
(10) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、L 9 6、Q 1 1 0、R 1 3 4およ
びK 1 6 7；
(11) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4お
よびK 1 6 7；
(12) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、R 1 3 4およびK 1 6 7；または
(13) S 2 3、A 5 5、K 7 2、K 7 5、V 1 2 8、R 1 3 4、K 1 6 7およびV 1
6 8
における置換を含む、項目1～26のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目28]

CD 4 D 1 D 2 ムテインが、以下の位置：
(1) R 1 3 4およびK 1 6 7；
(2) R 1 3 4およびN 1 6 4；
(3) N 1 6 4およびK 1 6 7；
(4) A 5 5およびR 1 3 4；
(5) A 5 5およびN 1 6 4；
(6) A 5 5およびK 1 6 7；
(7) S 2 3およびR 1 3 4；
(8) S 2 3およびN 1 6 4；
(9) S 2 3およびK 1 6 7；
(10) K 7 2およびK 7 5；
(11) K 7 5およびR 1 3 4；
(12) K 7 5およびN 1 6 4；
(13) K 7 5およびK 1 6 7；
(14) K 7 5およびQ 9 4；
(15) K 7 5およびQ 1 1 0；
(16) S 2 3およびK 7 5；
(17) A 5 5およびK 7 5；
(18) Q 9 4およびQ 1 1 0；
(19) S 2 3およびA 5 5；
(20) L 5およびS 2 3；
(21) K 2およびN 1 6 4；

- (22) K 2 および K 1 6 7 ;
- (23) K 7 および K 8 ;
- (24) K 7 および A 5 5 ;
- (25) K 8 および N 1 6 4 ;
- (26) K 8 および K 1 6 7 ;
- (27) K 8 および A 5 5 ;
- (28) T 1 7 および N 1 6 4 ;
- (29) T 1 7 および K 1 6 7 ;
- (30) I 7 0 および N 1 6 4 ;
- (31) I 7 0 および K 1 6 7 ;
- (32) A 5 5 および I 7 0 ;
- (33) A 5 5 および K 7 2 ;
- (34) K 7 2 および N 1 6 4 ;
- (35) K 7 2 および K 1 6 7 ;
- (36) Q 9 4 および N 1 6 4 ;
- (37) Q 9 4 および K 1 6 7 ;
- (38) Q 1 1 0 および N 1 6 4 ;
- (39) Q 1 1 0 および K 1 6 7 ;
- (40) K 1 4 2 および K 1 6 7 ;
- (41) R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (42) A 5 5、R 1 3 4 および N 1 6 4 ;
- (43) A 5 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
- (44) A 5 5、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (45) A 5 5、K 7 および K 8 ;
- (46) S 2 3、R 1 3 4 および N 1 6 4 ;
- (47) S 2 3、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
- (48) S 2 3、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (49) S 2 3、A 5 5 および R 1 3 4 ;
- (50) S 2 3、A 5 5 および N 1 6 4 ;
- (51) S 2 3、A 5 5 および K 1 6 7 ;
- (52) K 7 5、R 1 3 4 および N 1 6 4 ;
- (53) K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
- (54) K 7 5、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (55) K 7 5、Q 9 4 および Q 1 1 0 ;
- (56) A 5 5、K 7 5 および R 1 3 4 ;
- (57) L 5、A 5 5 および L 9 6 ;
- (58) A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (59) A 5 5、K 7 5、R 1 3 4 および K 1 6 7 ;
- (60) L 5、S 2 3、A 5 5 および L 9 6 ;
- (61) R 1 3 4、K 1 4 2、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (62) K 7、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (63) K 8、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (64) K 7 2、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (65) K 7 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (66) T 1 7、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (67) I 7 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (68) Q 9 4、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (69) Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;
- (70) Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4 および N 1 6 4 ;
- (71) S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4 および K 1 6 7 ;

10

20

30

40

50

(72) Q94、Q110、R134、N164およびK167；
(73) Q94、Q110、R134、K142およびK167；
(74) Q94、Q110、K142、N164およびK167；
(75) K7、K8、R134、N164およびK167；
(76) S23、A55、L96、R134、N164およびK167；
(77) K75、Q94、Q110、R134、N164およびK167；または
(78) K72、K75、Q94、Q110、R134、N164およびK167
 における置換を含む、項目1～27のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目29]

CD4 D1D2ムテインが、以下の位置：

- (1) R134およびK167；
- (2) R134およびN164；
- (3) N164およびK167；
- (4) Q94およびQ110；
- (5) K2およびN164；
- (6) K2およびK167；
- (7) K7およびK8；
- (8) K8およびN164；
- (9) K8およびK167；
- (10) T17およびN164；
- (11) T17およびK167；
- (12) I70およびN164；
- (13) I70およびK167；
- (14) K72およびN164；
- (15) K72およびK167；
- (16) K75およびR134；
- (17) K75およびN164；
- (18) K75およびK167；
- (19) K75およびQ94；
- (20) K75およびQ110；
- (21) Q94およびN164；
- (22) Q94およびK167；
- (23) Q110およびN164；
- (24) Q110およびK167；
- (25) K142およびK167；
- (26) R134、N164およびK167；
- (27) K75、Q94およびQ110；
- (28) K7、R134、N164およびK167；
- (29) K8、R134、N164およびK167；
- (30) T17、R134、N164およびK167；
- (31) R134、K142、N164およびK167；
- (32) I70、R134、N164およびK167；
- (33) K72、R134、N164およびK167；
- (34) Q94、R134、N164およびK167；
- (35) Q110、R134、N164およびK167；
- (36) Q94、Q110、R134およびN164；
- (37) Q94、Q110、R134、N164およびK167；
- (38) Q94、Q110、R134、K142およびK167；
- (39) Q94、Q110、K142、N164およびK167；
- (40) K75、Q94、Q110、R134、N164およびK167；

10

20

30

40

50

(41) K 7 2、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；または

(42) K 7、K 8、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7

における置換を含む、項目1～28のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目30]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが、以下の位置：

(1) R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；

(2) A 5 5、R 1 3 4およびN 1 6 4；

(3) A 5 5、R 1 3 4およびK 1 6 7；

(4) A 5 5、N 1 6 4およびK 1 6 7；

(5) L 5、A 5 5およびL 9 6；

(6) A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；

(7) L 5、S 2 3、A 5 5およびL 9 6；

(8) S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；

(9) S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；

(10) L 5、S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；または

(11) L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7

における置換を含む、項目1～29のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目31]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが、以下の位置：

(1) L 5、A 5 5およびL 9 6；

(2) A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；

(3) S 2 3、A 5 5、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7；または

(4) L 5、S 2 3、A 5 5、L 9 6、R 1 3 4、N 1 6 4およびK 1 6 7

における置換を含む、項目1～30のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目32]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが、

(a) i. 非荷電アミノ酸による野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1)における塩基性アミノ酸の置換、

i i. 酸性アミノ酸による野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1)における塩基性アミノ酸の置換、もしくは

i i i. 酸性アミノ酸による野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1)における非荷電アミノ酸の置換、および／または

(b) 置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸による野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1)におけるグリシンもしくは疎水性アミノ酸の置換のうち少なくとも1つの置換を含む、項目1～31のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目33]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが、非ヒト霊長類C D 4 D 1 D 2における対応位置のアミノ酸による、野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1)におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む、項目1～32のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目34]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが、類人猿、旧世界ザルまたは新世界ザルC D 4 D 1 D 2における対応位置のアミノ酸による、野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1)におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む、項目33記載のタンパク質。

[項目35]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが、類人猿または旧世界ザルC D 4 D 1 D 2における対応位置のアミノ酸による、野生型ヒトC D 4 D 1 D 2 (配列番号1)におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む、項目34記載のタンパク質。

[項目36]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが、類人猿C D 4 D 1 D 2における対応位置のアミノ酸によ

10

20

30

40

50

る、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む、項目35記載のタンパク質。

[項目37]

CD4 D1D2ムテインが、旧世界ザルCD4 D1D2における対応位置のアミノ酸による、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるアミノ酸の、少なくとも1つの置換を含む、項目36記載のタンパク質。

[項目38]

CD4 D1D2ムテインが、

（1）K1の、Nによる置換（K1N）；

（2）K2の、Eによる置換（K2E）、Nによる置換（K2N）またはTによる置換（K2T）；

（3）L5の、Yによる置換（L5Y）、Iによる置換（L5I）、Eによる置換（L5E）、Wによる置換（L5W）、Vによる置換（L5V）、Fによる置換（L5F）またはTによる置換（L5T）；

（4）G6の、Aによる置換（G6A）；

（5）K7の、Eによる置換（K7E）；

（6）K8の、Eによる置換（K8E）；

（7）T15の、Nによる置換（T15N）またはEによる置換（T15E）；

（8）T17の、Nによる置換（T17N）またはEによる置換（T17E）；

（9）S23の、Nによる置換（S23N）、Tによる置換（S23T）、Kによる置換（S23K）、Yによる置換（S23Y）またはAによる置換（S23A）；

（10）A55の、Vによる置換（A55V）、Iによる置換（A55I）、Pによる置換（A55P）、Lによる置換（A55L）、Mによる置換（A55M）、Fによる置換（A55F）、Yによる置換（A55Y）、Wによる置換（A55W）またはTによる置換（A55T）；

（11）I70の、Eによる置換（I70E）、Lによる置換（I70L）またはVによる置換（I70V）；

（12）K72の、Sによる置換（K72S）；

（13）K75の、Eによる置換（K75E）またはQによる置換（K75Q）；

（14）Q94の、Eによる置換（Q94E）；

（15）L96の、Vによる置換（L96V）、Qによる置換（L96Q）、Tによる置換（L96T）、Iによる置換（L96I）またはYによる置換（L96Y）；

（16）Q110の、Eによる置換（Q110E）またはHによる置換（Q110H）；

（17）L116の、Fによる置換（L116F）またはWによる置換（L116W）；

（18）V128の、Iによる置換（V128I）またはLによる置換（V128L）；

（19）R134の、Gによる置換（R134G）またはTによる置換（R134T）；

（20）K142の、Rによる置換（K142R）、Gによる置換（K142G）またはSによる置換（K142S）；

（21）V146の、Iによる置換（V146I）、Lによる置換（V146L）、Fによる置換（V146F）またはWによる置換（V146W）；

（22）N164の、Dによる置換（N164D）、Hによる置換（N164H）、Rによる置換（N164R）またはEによる置換（N164E）；

（23）K167の、Tによる置換（K167T）、Rによる置換（K167R）またはLによる置換（K167L）；

（24）V168の、Iによる置換（V168I）またはLによる置換（V168L）；および

（25）V176の、Iによる置換（V176I）

の少なくとも1つを含む、項目1～37のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目39]

CD4 D1D2ムテインがK2E、G6A、K7E、K8E、T17N、T17E、S

10

20

30

40

50

2 3 N、S 2 3 T、A 5 5 V、A 5 5 I、I 7 0 E、K 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、L 1 1 6 F、V 1 2 8 L、R 1 3 4 G、K 1 4 2 R、V 1 4 6 I、V 1 4 6 F、N 1 6 4 D、K 1 6 7 T、V 1 6 8 L および V 1 7 6 I 置換の少なくとも 1 つを含む、項目 3 8 記載のタンパク質。

[項目 4 0]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが G 6 A、S 2 3 N、A 5 5 V、K 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、V 1 2 8 L、R 1 3 4 G、V 1 4 6 I、N 1 6 4 D、K 1 6 7 T および V 1 6 8 L 置換の少なくとも 1 つを含む、項目 3 9 記載のタンパク質。

[項目 4 1]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが K 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、V 1 2 8 L、R 1 3 4 G、V 1 4 6 I、N 1 6 4 D、K 1 6 7 T および V 1 6 8 L 置換の少なくとも 1 つを含む、項目 4 0 記載のタンパク質。

10

[項目 4 2]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが K 7 2 S、K 7 5 E、K 7 5 Q、Q 9 4 E、Q 1 1 0 E、R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T 置換の少なくとも 1 つを含む、項目 4 1 記載のタンパク質。

[項目 4 3]

C D 4 D 1 D 2 ムテインが L 1 1 6 F、V 1 2 8 L、V 1 4 6 I および V 1 6 8 L 置換の少なくとも 1 つを含む、項目 4 2 記載のタンパク質。

[項目 4 4]

20

C D 4 D 1 D 2 ムテインが、以下の置換：

- (1) A 5 5 V および K 7 2 S ；
- (2) A 5 5 V および K 7 5 E ；
- (3) A 5 5 V および K 7 5 Q ；
- (4) A 5 5 V および Q 9 4 E ；
- (5) A 5 5 V および Q 1 1 0 E ；
- (6) A 5 5 V および L 1 1 6 F ；
- (7) A 5 5 V および V 1 2 8 L ；
- (8) A 5 5 V および R 1 3 4 G ；
- (9) A 5 5 V および V 1 4 6 I ；
- (10) A 5 5 V および N 1 6 4 D ；
- (11) A 5 5 V および K 1 6 7 T ；
- (12) A 5 5 V および V 1 6 8 L ；
- (13) S 2 3 N および K 7 2 S ；
- (14) S 2 3 N および K 7 5 E ；
- (15) S 2 3 N および K 7 5 Q ；
- (16) S 2 3 N および Q 9 4 E ；
- (17) S 2 3 N および Q 1 1 0 E ；
- (18) S 2 3 N および L 1 1 6 F ；
- (19) S 2 3 N および V 1 2 8 I ；
- (20) S 2 3 N および R 1 3 4 G ；
- (21) S 2 3 N および V 1 4 6 I ；
- (22) S 2 3 N および N 1 6 4 D ；
- (23) S 2 3 N および K 1 6 7 T ；
- (24) S 2 3 N および V 1 6 8 L ；
- (25) G 6 A および K 7 2 S ；
- (26) G 6 A および K 7 5 E ；
- (27) G 6 A および K 7 5 Q ；
- (28) G 6 A および Q 9 4 E ；
- (29) G 6 A および Q 1 1 0 E ；

30

40

50

(30) G 6 A および L 1 1 6 F ;
(31) G 6 A および V 1 2 8 L ;
(32) G 6 A および R 1 3 4 G ;
(33) G 6 A および V 1 4 6 I ;
(34) G 6 A および N 1 6 4 D ;
(35) G 6 A および K 1 6 7 T ;
(36) G 6 A および V 1 6 8 L ;
(37) K 7 2 S および K 7 5 E ;
(38) K 7 2 S および K 7 5 Q ;
(39) K 7 2 S および Q 9 4 E ;
(40) K 7 2 S および Q 1 1 0 E ;
(41) K 7 2 S および L 1 1 6 F ;
(42) K 7 2 S および V 1 2 8 L ;
(43) K 7 2 S および R 1 3 4 G ;
(44) K 7 2 S および V 1 4 6 I ;
(45) K 7 2 S および N 1 6 4 D ;
(46) K 7 2 S および K 1 6 7 T ;
(47) K 7 2 S および V 1 6 8 L ;
(48) K 7 5 E および Q 9 4 E ;
(49) K 7 5 E および Q 1 1 0 E ;
(50) K 7 5 E および L 1 1 6 F ;
(51) K 7 5 E および V 1 2 8 L ;
(52) K 7 5 E および R 1 3 4 G ;
(53) K 7 5 E および V 1 4 6 I ;
(54) K 7 5 E および N 1 6 4 D ;
(55) K 7 5 E および K 1 6 7 T ;
(56) K 7 5 E および V 1 6 8 L ;
(57) K 7 5 Q および Q 9 4 E ;
(58) K 7 5 Q および Q 1 1 0 E ;
(59) K 7 5 Q および L 1 1 6 F ;
(60) K 7 5 Q および V 1 2 8 L ;
(61) K 7 5 Q および R 1 3 4 G ;
(62) K 7 5 Q および V 1 4 6 I ;
(63) K 7 5 Q および N 1 6 4 D ;
(64) K 7 5 Q および K 1 6 7 T ;
(65) K 7 5 Q および V 1 6 8 L ;
(66) Q 9 4 E および Q 1 1 0 E ;
(67) Q 9 4 E および L 1 1 6 F ;
(68) Q 9 4 E および V 1 2 8 L ;
(69) Q 9 4 E および R 1 3 4 G ;
(70) Q 9 4 E および V 1 4 6 I ;
(71) Q 9 4 E および N 1 6 4 D ;
(72) Q 9 4 E および K 1 6 7 T ;
(73) Q 9 4 E および V 1 6 8 L ;
(74) Q 1 1 0 E および L 1 1 6 F ;
(75) Q 1 1 0 E および V 1 2 8 L ;
(76) Q 1 1 0 E および R 1 3 4 G ;
(77) Q 1 1 0 E および V 1 4 6 I ;
(78) Q 1 1 0 E および N 1 6 4 D ;
(79) Q 1 1 0 E および K 1 6 7 T ;

10

20

30

40

50

(80) Q110EおよびV168L;
(81) L116FおよびV128L;
(82) L116FおよびR134G;
(83) L116FおよびV146I;
(84) L116FおよびN164D;
(85) L116FおよびK167T;
(86) L116FおよびV168L;
(87) V128LおよびR134G;
(88) V128LおよびV146I;
(89) V128LおよびN164D;
(90) V128LおよびK167T;
(91) V128LおよびV168L;
(92) V146IおよびN164D;
(93) V146IおよびK167T;
(94) V146IおよびV168L;または
(95) N164DおよびK167T

を含む、項目1～43のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目45]

CD4 D1D2ムテインがA55V置換を含む、項目1～44のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目46]

CD4 D1D2ムテインがS23N置換を含む、項目1～45のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目47]

CD4 D1D2ムテインがL5Y、A55VおよびL96V置換を含む、項目1～46のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目48]

CD4 D1D2ムテインがA55V、R134G、N164DおよびK167T置換を含む、項目1～47のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目49]

CD4 D1D2ムテインがS23N、A55V、R134G、N164DおよびK167T置換を含む、項目1～48のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目50]

CD4 D1D2ムテインがL5Y、A55V、L96V、R134G、N164DおよびK167T置換を含む、項目1～49のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目51]

CD4 D1D2ムテインがL5Y、S23N、A55V、L96V、R134G、N164DおよびK167T置換を含む、項目1～50のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目52]

CD4 D1D2ムテインがQ40A置換を含む、項目1～51のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目53]

CD4 D1D2ムテインが配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42または配列番号44を含む、項目1～52のいずれか1項記載のタンパク質

[項目54]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のN32、K35、L44、K46またはR59に対応する位置に置換を含まない、項目1～53のい

10

20

30

40

50

いずれか1項記載のタンパク質。

[項目55]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK1、K2、K50、D56、R58、R59、K72、E77、E91、R131、D153、K167、E169またはK171に対応する位置に置換を含まない、項目1～54のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目56]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のF98に対応する位置に置換を含まない、項目1～55のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目57]

CD4 D1D2ムテインがバリンによるF98の置換（F98V）を含まない、項目1～56のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目58]

CD4 D1D2ムテインが、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のI76に対応する位置に置換を含まない、項目1～57のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目59]

CD4 D1D2ムテインがプロリンによるI76の置換（I76P）を含まない、項目1～58のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目60]

CD4 D1D2ムテインが、動的光散乱（DLS）により測定された場合に該タンパク質の凝集温度を増加させる少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、項目1～59のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目61]

該タンパク質が、動的光散乱（DLS）により測定された場合に少なくとも60℃の凝集温度を有する、項目1～60のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目62]

該タンパク質が、動的光散乱（DLS）により測定された場合に、野生型ヒトCD4 D1D2を含む対応タンパク質の凝集温度より少なくとも7℃高い凝集温度を有する、項目1～61のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目63]

CD4 D1D2ムテインが、CD4⁺CCR5⁺細胞系のHIV感染に対する該タンパク質のIC50を減少させる少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、項目1～62のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目64]

該タンパク質が少なくとも12時間、24時間、1日、1.5日、2日、2.5日、3日、3.5日、4日、4.5日、5日、5.5日、6日、6.5日、7日、7.5日、8日、8.5日、9日、9.5日または10日の血漿半減期を有する、項目1～63のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目65]

該タンパク質が少なくとも12時間の血漿半減期を有する、項目1～64のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目66]

該タンパク質が少なくとも3日の血漿半減期を有する、項目1～65のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目67]

CD4 D1D2ムテインが、色素インターカレーションアッセイにより測定された場合に該タンパク質の融解温度を増加させる少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、項目1～66のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目68]

CD4 D1D2ムテインが、発現されるCD4 D1D2ムテインの量を増加させる少

10

20

30

40

50

なくとも1つのアミノ酸置換を含む、項目1～67のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目69]

霊長類レンチウイルスエンベロープ糖タンパク質結合部分を更に含む、項目1～68のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目70]

該結合部分が少なくとも1つのスルホチロシンを含む、項目69記載のタンパク質。[項目71]

該結合部分が配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号7のアミノ酸配列を含む、項目69または70記載のタンパク質。

[項目72]

免疫グロブリンFcドメインを更に含む、項目1～71のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目73]

FcドメインがヒトIgG1またはIgG2 Fcドメインである、項目72記載のタンパク質。

[項目74]

FcドメインがヒトIgG1 Fcドメインである、項目73記載のタンパク質。

[項目75]

FcドメインがC220に置換または欠失を含む、項目72～74のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目76]

FcドメインがM252Y、S254T、T256E、M428L、H433K、N434SおよびN434F置換の少なくとも1つを含む、項目72～75のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目77]

FcドメインがM252Y、S254TおよびT256E置換を含む、項目76記載のタンパク質。

[項目78]

FcドメインがM428LおよびN434S置換を含む、項目76記載のタンパク質。

[項目79]

該タンパク質が、天然に存在する野生型非ヒト霊長類タンパク質と同一ではない、前記請求項のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目80]

該タンパク質がCD4ドメイン3(D3)および／またはドメイン4(D4)領域を含まない、前記請求項のいずれか1項記載のタンパク質。

[項目81]

項目1～80のいずれか1項記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

[項目82]

項目81記載の核酸を含む発現ベクター。

[項目83]

発現ベクターがウイルスベクターである、項目82記載の発現ベクター。

[項目84]

ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、項目83記載の発現ベクター。

[項目85]

項目82～84のいずれか1項記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

[項目86]

項目1～80のいずれか1項記載のタンパク質または項目82～84のいずれか1項記載の発現ベクターを含む医薬組成物。

10

20

30

40

50

[項目 8 7]

項目 1 ～ 8 0 のいずれか 1 項記載のタンパク質、項目 8 2 ～ 8 4 のいずれか 1 項記載の発現ベクターまたは項目 8 6 記載の医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む、H I V 感染の治療を要する対象における H I V 感染の治療方法。

[項目 8 8]

対象がヒトである、項目 8 7 記載の方法。

【 0 1 5 1 】

図面の説明

本発明は、以下の図面を参照して、より完全に理解されうる。

【図面の簡単な説明】【 0 1 5 2 】

【図 1】図 1 は、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 または野生型アカゲザル C D 4 D 1 D 2 を含有する e C D 4 - I g タンパク質に関する熱スキャンアッセイの結果を示す。野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 を含有する e C D 4 - I g G 1 または野生型アカゲザル C D 4 D 1 D 2 を含有する e C D 4 - I g G 1 に関する温度の関数としての粒子半径を示すグラフを図 1 A に示す。野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 を含有する e C D 4 - I g G 2 またはアカゲザル C D 4 D 1 D 2 を含有する e C D 4 - I g G 2 に関する温度の関数としての半径を示すグラフを図 1 B に示す。凝集を動的光散乱 (D L S) により測定した。この場合、ナノメートル (nm) 単位で示されている粒子半径の増加はタンパク質凝集を示す。野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 に基づく e C D 4 - I g タンパク質に関する 5 0 % 凝集温度は 5 1 °C (I g G 1) および 5 3 °C (I g G 2) であった。野生型アカゲザル C D 4 D 1 D 2 に基づく e C D 4 - I g に関する凝集温度は 6 2 °C (I g G 1) および 6 7 °C (I g G 2) であった。

【図 2】図 2 は C C R 5 模倣スルホペプチド「m i m 2 .」の存在下または非存在下の C D 4 - I g タンパク質に関する凝集温度を示すグラフである。試験した各タンパク質は、ヒト I g G 1 F c に融合した野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 を含有し、該スルホペプチドの存在下または非存在下の場合を除いて同一であった。

【図 3】図 3 は、霊長類 C D 4 D 1 D 2 アミノ酸配列の関連性を示す系統樹である。ヒト C D 4 D 1 D 2 配列は他の類人猿のものと共にグループ化される。原猿類、新世界ザルおよび旧世界ザルの C D 4 D 1 D 2 配列のそれぞれは、それらの進化的関係に合致して、異なるグループを形成する。

【図 4 - 1】図 4 は霊長類 C D 4 D 1 D 2 アミノ酸配列 (配列番号 1 および 4 8 ~ 9 0) の配列アラインメントである。類人猿 (それぞれ配列番号 1 および 4 8 ~ 5 4) 、旧世界ザル (それぞれ配列番号 5 5 ~ 7 6) 、新世界ザル (それぞれ配列番号 7 7 ~ 8 6) および原猿類 (それぞれ配列番号 8 7 ~ 9 0) の C D 4 D 1 D 2 のアミノ酸配列をアラインメント (整列) させた。ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) と同一でない位置が太字で示されている。番号付けはヒト C D 4 D 1 D 2 に対応している。したがって、原猿類における F 4 3 に先行する 2 アミノ酸インデルはここでは欠失として扱われ、番号付けはこのインデルを省いている。C D 4 プレタンパク質上に存在するシグナルペプチドは番号付けにおいては示されておらず、また、含まれていない。X は、現在利用可能なデータが存在しない位置を示す。アミノ酸 1 ~ 5 8 (図 4 A) 、5 9 ~ 1 1 8 (図 4 B) および 1 1 9 ~ 1 7 8 (図 4 C) のアラインメントが示されている。C D 4 ドメイン 1 (D 1) はアミノ酸 1 ~ 9 8 に対応し、C D 4 ドメイン 2 (D 2) はアミノ酸 9 9 ~ 1 7 8 に対応する。

【図 4 - 2】図 4 は霊長類 C D 4 D 1 D 2 アミノ酸配列 (配列番号 1 および 4 8 ~ 9 0) の配列アラインメントである。類人猿 (それぞれ配列番号 1 および 4 8 ~ 5 4) 、旧世界ザル (それぞれ配列番号 5 5 ~ 7 6) 、新世界ザル (それぞれ配列番号 7 7 ~ 8 6) および原猿類 (それぞれ配列番号 8 7 ~ 9 0) の C D 4 D 1 D 2 のアミノ酸配列をアラインメント (整列) させた。ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) と同一でない位置が太字で示されている。番号付けはヒト C D 4 D 1 D 2 に対応している。したがって、原猿類における F 4 3 に先行する 2 アミノ酸インデルはここでは欠失として扱われ、番号付けはこ

10

20

30

40

50

のインデルを省いている。CD4 プレタンパク質上に存在するシグナルペプチドは番号付けにおいては示されておらず、また、含まれていない。Xは、現在利用可能なデータが存在しない位置を示す。アミノ酸1～58 (図4A)、59～118 (図4B) および119～178 (図4C) のアラインメントが示されている。CD4 ドメイン1 (D1) はアミノ酸1～98に対応し、CD4 ドメイン2 (D2) はアミノ酸99～178に対応する。

【図4-3】図4は霊長類CD4 D1D2アミノ酸配列 (配列番号1および48～90) の配列アラインメントである。類人猿 (それぞれ配列番号1および48～54)、旧世界ザル (それぞれ配列番号55～76)、新世界ザル (それぞれ配列番号77～86) および原猿類 (それぞれ配列番号87～90) のCD4 D1D2のアミノ酸配列をアラインメント (整列) させた。ヒトCD4 D1D2 (配列番号1) と同一でない位置が太字で示されている。番号付けはヒトCD4 D1D2に対応している。したがって、原猿類におけるF43に先行する2アミノ酸インデルはここでは欠失として扱われ、番号付けはこのインデルを省いている。CD4 プレタンパク質上に存在するシグナルペプチドは番号付けにおいては示されておらず、また、含まれていない。Xは、現在利用可能なデータが存在しない位置を示す。アミノ酸1～58 (図4A)、59～118 (図4B) および119～178 (図4C) のアラインメントが示されている。CD4 ドメイン1 (D1) はアミノ酸1～98に対応し、CD4 ドメイン2 (D2) はアミノ酸99～178に対応する。

【図5】図5は、CD4 ドメイン2の疎水性コアを安定化させる特定の突然変異のコンピュータ生成視覚的表示である。CD4の内部をより良好に可視化するために、タンパク質データバンク (PDB) 構造の仮想断層撮影断面表示および編集を可能にするツールを開発した。このコンピュータツールを使用して、CD4 D1およびD2の疎水性コア内の、より大きな疎水性アミノ酸による、グリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸の置換を分析した。この図は2つの空間充填突然変異を示し、これらは、置換されるものより大きな体積の疎水性アミノ酸により、埋もれた疎水性アミノ酸を置換する。ここに示されているのは、128位においてモデル化された野生型V128 (図5A) または置換V128L (図5B) のいずれかを有するヒトCD4結晶構造3CD4の2D断面である。L100、L144、V161およびF170により囲まれた疎水性ポケットをV128L置換が充填することに注目されたい。ここには、同じCD4結晶構造の2D断面も示されており、L5、K7、V161およびF170により囲まれたV168を包囲する空間 (図5C)、ならびにこの疎水性ポケットの大部分を充填する置換V168L (図5D) が示されている。炭素原子は灰色で示されており、酸素原子は白色で示されており、窒素原子は黒色で示されている。

【図6-1】図6は、ヒトCD4 D1D2とNHP CD4 D1D2との間で異なる1以上の位置における置換を有するeCD4-Ig変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。DLS熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下のeCD4-Igの凝集温度を測定した。「バックグラウンド」は、置換が試験された突然変異バックグラウンド (つまり、1以上の追加的置換が存在するeCD4-Ig変異体において置換が評価されたのかどうか) を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、eCD4-Ig変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基 (「野生型」) を有していたのかを示す。eCD4-Igタンパク質 (IgG1またはIgG2) におけるFcドメインのアイソタイプが示されている。黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う黒色線はIgG1を示し、灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う灰色線はIgG2を示す。

【図6-2】図6は、ヒトCD4 D1D2とNHP CD4 D1D2との間で異なる1以上の位置における置換を有するeCD4-Ig変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。DLS熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下のeCD4-Igの凝集温度を測定した。「バックグラウンド」は、置換が試験された突然変異バックグラウンド (つまり、1以上の追加的置換が存在するeCD4

10

20

30

40

50

－I g 変異体において置換が評価されたのかどうか)を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、e C D 4－I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基(「野生型」)を有していたのかを示す。e C D 4－I g タンパク質(I g G 1またはI g G 2)におけるF cドメインのアイソタイプが示されている。黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う黒色線はI g G 1を示し、灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う灰色線はI g G 2を示す。

【図6－3】図6は、ヒトC D 4 D 1 D 2とN H P C D 4 D 1 D 2との間で異なる1以上の位置における置換を有するe C D 4－I g 変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。D L S熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下のe C D 4－I gの凝集温度を測定した。「バックグラウンド」は、置換が試験された突然変異バックグラウンド(つまり、1以上の追加的置換が存在するe C D 4－I g 変異体において置換が評価されたのかどうか)を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、e C D 4－I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基(「野生型」)を有していたのかを示す。e C D 4－I g タンパク質(I g G 1またはI g G 2)におけるF cドメインのアイソタイプが示されている。黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う黒色線はI g G 1を示し、灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う灰色線はI g G 2を示す。

【図6－4】図6は、ヒトC D 4 D 1 D 2とN H P C D 4 D 1 D 2との間で異なる1以上の位置における置換を有するe C D 4－I g 変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。D L S熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下のe C D 4－I gの凝集温度を測定した。「バックグラウンド」は、置換が試験された突然変異バックグラウンド(つまり、1以上の追加的置換が存在するe C D 4－I g 変異体において置換が評価されたのかどうか)を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、e C D 4－I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基(「野生型」)を有していたのかを示す。e C D 4－I g タンパク質(I g G 1またはI g G 2)におけるF cドメインのアイソタイプが示されている。黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う黒色線はI g G 1を示し、灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う灰色線はI g G 2を示す。

【図6－5】図6は、ヒトC D 4 D 1 D 2とN H P C D 4 D 1 D 2との間で異なる1以上の位置における置換を有するe C D 4－I g 変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。D L S熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下のe C D 4－I gの凝集温度を測定した。「バックグラウンド」は、置換が試験された突然変異バックグラウンド(つまり、1以上の追加的置換が存在するe C D 4－I g 変異体において置換が評価されたのかどうか)を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、e C D 4－I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基(「野生型」)を有していたのかを示す。e C D 4－I g タンパク質(I g G 1またはI g G 2)におけるF cドメインのアイソタイプが示されている。黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う黒色線はI g G 1を示し、灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う灰色線はI g G 2を示す。

【図6－6】図6は、ヒトC D 4 D 1 D 2とN H P C D 4 D 1 D 2との間で異なる1以上の位置における置換を有するe C D 4－I g 変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。D L S熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下お

10

20

30

40

50

および非存在下の e C D 4 - I g の凝集温度を測定した。「バックグラウンド」は、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1 以上の追加的置換が存在する e C D 4 - I g 変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフの x 軸は、e C D 4 - I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。e C D 4 - I g タンパク質（I g G 1 または I g G 2）における F c ドメインのアイソタイプが示されている。黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う黒色線は I g G 1 を示し、灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う灰色線は I g G 2 を示す。

10

【図 6 - 7】図 6 は、ヒト C D 4 D 1 D 2 と N H P C D 4 D 1 D 2 との間で異なる 1 以上の位置における置換を有する e C D 4 - I g 変異体の 5 0 % 凝集温度を示す一連のグラフである。D L S 熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g の凝集温度を測定した。「バックグラウンド」は、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1 以上の追加的置換が存在する e C D 4 - I g 変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフの x 軸は、e C D 4 - I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。e C D 4 - I g タンパク質（I g G 1 または I g G 2）における F c ドメインのアイソタイプが示されている。黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う黒色線は I g G 1 を示し、灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号を伴う灰色線は I g G 2 を示す。

20

【図 7 - 1】図 7 は、示されている置換組合せを有する e C D 4 - I g 変異体の 5 0 % 凝集温度を示す一連のグラフである。D L S 熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g の凝集温度を測定した。バックグラウンドは、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1 以上の追加的置換が存在する e C D 4 - I g 変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフの x 軸は、e C D 4 - I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。e C D 4 - I g タンパク質（I g G 1 または I g G 2）における F c ドメインのアイソタイプが示されている。黒色線および黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号は I g G 1 を示し、灰色線および灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号は I g G 2 を示す。

30

【図 7 - 2】図 7 は、示されている置換組合せを有する e C D 4 - I g 変異体の 5 0 % 凝集温度を示す一連のグラフである。D L S 熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g の凝集温度を測定した。バックグラウンドは、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1 以上の追加的置換が存在する e C D 4 - I g 変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフの x 軸は、e C D 4 - I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。e C D 4 - I g タンパク質（I g G 1 または I g G 2）における F c ドメインのアイソタイプが示されている。黒色線および黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号は I g G 1 を示し、灰色線および灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号は I g G 2 を示す。

40

【図 7 - 3】図 7 は、示されている置換組合せを有する e C D 4 - I g 変異体の 5 0 % 凝集温度を示す一連のグラフである。D L S 熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g の凝集温度を測定した。バックグラ

50

ウンドは、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1以上の追加的置換が存在するeCD4-Ig変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、eCD4-Ig変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。eCD4-Igタンパク質（IgG1またはIgG2）におけるFcドメインのアイソタイプが示されている。黒色線および黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号はIgG1を示し、灰色線および灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号はIgG2を示す。

【図7-4】図7は、示されている置換組合せを有するeCD4-Ig変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。DLS熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下のeCD4-Igの凝集温度を測定した。バックグラウンドは、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1以上の追加的置換が存在するeCD4-Ig変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、eCD4-Ig変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。eCD4-Igタンパク質（IgG1またはIgG2）におけるFcドメインのアイソタイプが示されている。黒色線および黒色の空白のまたは塗りつぶされた記号はIgG1を示し、灰色線および灰色の空白のまたは塗りつぶされた記号はIgG2を示す。

【図8-1】図8は、2個を超える置換の表示組合せを有するeCD4-Ig変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。DLS熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下のeCD4-Igの凝集温度を測定した。バックグラウンドは、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1以上の追加的置換が存在するeCD4-Ig変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、eCD4-Ig変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。eCD4-Igタンパク質（IgG1またはIgG2）におけるFcドメインのアイソタイプが示されている。

【図8-2】図8は、2個を超える置換の表示組合せを有するeCD4-Ig変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。DLS熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下のeCD4-Igの凝集温度を測定した。バックグラウンドは、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1以上の追加的置換が存在するeCD4-Ig変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、eCD4-Ig変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。eCD4-Igタンパク質（IgG1またはIgG2）におけるFcドメインのアイソタイプが示されている。

【図9】図9は、示されている置換を有するeCD4-Ig変異体の50%凝集温度を示す一連のグラフである。DLS熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下のeCD4-Igの凝集温度を測定した。バックグラウンドは、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1以上の追加的置換が存在するeCD4-Ig変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフのx軸は、eCD4-Ig変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。

【図10-1】図10は、示されている置換組合せを有するeCD4-Ig変異体の50

%凝集温度を示す一連のグラフである。D L S 熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g の凝集温度を測定した。バックグラウンドは、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1 以上の追加的置換が存在する e C D 4 - I g 変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフの x 軸は、e C D 4 - I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。

【図 1 0 - 2】図 1 0 は、示されている置換組合せを有する e C D 4 - I g 変異体の 5 0 %凝集温度を示す一連のグラフである。D L S 熱スキャンアッセイを用いて、示されているアミノ酸置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g の凝集温度を測定した。バックグラウンドは、置換が試験された突然変異バックグラウンド（つまり、1 以上の追加的置換が存在する e C D 4 - I g 変異体において置換が評価されたのかどうか）を示す。該置換の幾つかは複数の突然変異バックグラウンドにおいて評価された。複数の置換は、各置換がバックスラッシュで区切られた一覧として示されている。各グラフの x 軸は、e C D 4 - I g 変異体が、置換位置に、示されている置換を有していたのか、または野生型アミノ酸残基（「野生型」）を有していたのかを示す。

【図 1 1】図 1 1 は、示されている置換またはそれらの組合せを有する e C D 4 - I g 変異体に関する D L S 熱スキャンアッセイに関する一次データを示す折れ線グラフである。y 軸は、該アッセイが x 軸（5 0 ~ 7 5 °C が示されている）に沿って温度をスキャンした場合の、D L S により検出された物質の平均半径を示す。

【図 1 2】図 1 2 は、示されている置換組合せを使用して D L S 熱スキャンアッセイにより測定された場合の e C D 4 - I g 変異体の 5 0 % の凝集温度を示す棒グラフである。凝集温度は最高から最低の順に示されている。野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号 1）を含有する対照タンパク質は黒色で示されており、置換を有する変異体は灰色で示されている。データは、ヒンジにおける C 2 2 0 S 置換、I g G 1 F c ドメイン、およびスルホペプチドとしての m i m 2 または m i m 6 のいずれかを有する e C D 4 - I g 変異体に関して示されている。

【図 1 3】図 1 3 は、S Y P R O オレンジ色素インターカレーションアッセイの結果を示す棒グラフである。該アッセイによって測定された e C D 4 - I g 変異体の 5 0 % 融解温度が示されている。融解温度は最高から最低の順に示されている。野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号 1）を含有する対照タンパク質は黒色で示されており、置換を有する変異体は灰色で示されている。データは、ヒンジにおける C 2 2 0 S 置換、I g G 1 F c ドメイン、およびスルホペプチドとしての m i m 2 または m i m 6 のいずれかを有する e C D 4 - I g 変異体に関して示されている。

【図 1 4】図 1 4 は、アプライド・バイオシステムズ・タンパク質熱シフト（A p p l i e d B i o s y s t e m s P r o t e i n T h e r m a l S h i f t）色素インターカレーションアッセイの結果を示す棒グラフである。アッセイにより測定された e C D 4 - I g 変異体の 5 0 % 融解温度が示されている。融解温度は最高から最低の順に示されている。野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号 1）を含有する対照タンパク質は黒色で示されており、置換を有する変異体は灰色で示されている。「C h i m p」は、チンパンジー C D 4 由来の C D 4 D 1 D 2 配列を有する、それ以外は同一である e C D 4 - I g タンパク質を示す。データは、ヒンジにおける C 2 2 0 S 置換、I g G 1 F c ドメイン、およびスルホペプチドとしての m i m 2 または m i m 6 のいずれかを有する e C D 4 - I g 変異体に関して示されている。

【図 1 5】図 1 5 は、アミノ酸置換の組合せを含有する C D 4 ムテインに関する色素インターカレーション熱スキャンアッセイの結果を示す一連の棒グラフである。S Y P R O オレンジ（O r a n g e）色素インターカレーションアッセイにおける m i m 6 スルホペプチドを含有する e C D 4 - I g タンパク質の 5 0 % 融解温度が図 1 5 A ~ C に示されている。アプライド・バイオシステムズ・タンパク質熱シフト（A p p l i e d B i o s y

10

20

30

40

50

stems Protein Thermal Shift) アッセイにおけるスルホペプチドを欠くCD4-Igタンパク質に関する50%融解温度が図15Dに示されている。ここに示されている全ての変異体はヒンジにC220S置換を有する。

【図16】図16は、種々のeCD4-Igタンパク質に関するタンパク質発現収量を示す棒グラフである。この図に示されている変異体の全てには、mim6スルホペプチド、ヒンジにおけるC220S置換およびIgG1Fcが含まれる。野生型ヒトCD4D1D2(配列番号1)を含有するeCD4-Igタンパク質は黒色で示されており、アミノ酸置換を含有する変異体の全ては灰色で示されている。

【図17-1】図17は、種々のeCD4-Igタンパク質に関する発現収量を示す一連の棒グラフである。図17A~Hの各パネルは別々のタンパク質発現収量実験を表す。2つの対照が黒色で示されている。これらの2つの対照は、野生型ヒトCD4D1D2(配列番号1)を含有するeCD4-Igタンパク質、および置換G6A/S23N/A55V/V128L/V168Lを含有するeCD4-Igである。全ての他の変異体は灰色で示されている。示されている変異体の全てには、ヒンジにおけるC220S置換、およびIgG1Fcが含まれる。図17A~Gにおける変異体は全て、mim6スルホペプチドを含有する全てのeCD4-Igタンパク質であり、一方、図17Hにおける変異体は、スルホペプチドを欠く全てのCD4-Igタンパク質である。

【図17-2】図17は、種々のeCD4-Igタンパク質に関する発現収量を示す一連の棒グラフである。図17A~Hの各パネルは別々のタンパク質発現収量実験を表す。2つの対照が黒色で示されている。これらの2つの対照は、野生型ヒトCD4D1D2(配列番号1)を含有するeCD4-Igタンパク質、および置換G6A/S23N/A55V/V128L/V168Lを含有するeCD4-Igである。全ての他の変異体は灰色で示されている。示されている変異体の全てには、ヒンジにおけるC220S置換、およびIgG1Fcが含まれる。図17A~Gにおける変異体は全て、mim6スルホペプチドを含有する全てのeCD4-Igタンパク質であり、一方、図17Hにおける変異体は、スルホペプチドを欠く全てのCD4-Igタンパク質である。

【図18】図18は、野生型CD4-Ig、またはコンホメーション安定性を改善する置換を有する示されているCD4-IgまたはeCD4-Ig変異体のヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける薬物動態を示す一連の折れ線グラフである。図18A~Cに示されているデータは並行して集められたものであり、直接的に比較可能であり、明瞭化のために3つのパネルに分けられているに過ぎない。図18Aは、野生型ヒトCD4D1D2配列、またはR134/N164/K167もしくはK72/K75/Q94/Q110/R134/N164/K167位に突然変異を含有するCD4D1D2配列を含有するCD4-Ig変異体(スルホペプチドを含まない)の薬物動態を示す。野生型CD4-Igの半減期は2.4日であり、一方、R134G/N164D/K167TCD4-Igの半減期は4.2日であり、K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167TCD4-Igの半減期は8.6日であった。図18Bは、R134/N164/K167位に置換を含有するCD4-Ig(スルホペプチドを含まない)およびeCD4-Ig(スルホペプチドを含む)タンパク質の薬物動態を示す。図18Cは、K72/K75/Q94/Q110/R134/N164/K167位に置換を有するCD4-Ig(スルホペプチドを含まない)およびeCD4-Ig(スルホペプチドを含む)タンパク質ならびにQ94/Q110/R134/N164/K167位に置換を有するeCD4-Igタンパク質の薬物動態を示す。

【図19】図19は、コンホメーション安定性もしくはFcRn結合を改善する示されている置換または野生型ヒトCD4D1D2(配列番号1)を含有するeCD4-IgのヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける薬物動態を示す折れ線グラフである。広範囲中和性モノクローナル抗体10-1074をヒトFcRnトランスジェニックマウスの2つの群における対照として使用した。これら2つの対照群のそれぞれは別々の折れ線で示されている。野生型ヒトCD4D1D2対照に加えて、この薬物動態実験において評価されたeCD4-Ig変異体にはアミノ酸置換の以下の組合せが含まれていた：K7

10

20

30

40

50

2 S / K 7 5 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T、K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T、S 2 3 N / K 7 2 S / K 7 5 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T、および S 2 3 N / A 5 5 V / K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / L 9 6 V / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T。また、C D 4 D 1 D 2 における置換 S 2 3 N / A 5 5 V / K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / L 9 6 V / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T を有する e C D 4 - I g 変異体は、S 2 5 4 T、および T 2 5 6 E (「Y T E」)、または M 4 2 8 L および N 4 3 4 S (「L S」) を含有する I g G 1 F c のコンテキストにおいて評価された。

【図 20】図 20 は、置換 G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L を含有する e C D 4 - I g の変異体を評価する野生型 B A L B / c J マウスにおける薬物動態実験を示す。G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L を含有する e C D 4 - I g 変異体の薬物動態を、S 2 3 N / A 5 5 V / K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / L 9 6 V / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T を含有する対照と比較した (図 20 A)。表面電荷置換 R 1 3 4 G、N 1 6 4 D および K 1 6 7 T を、個別に、および組合せて、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L バックグラウンド内に導入した。したがって、この薬物動態実験で試験された追加的変異体は G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / R 1 3 4 G / V 1 6 8 L、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / K 1 7 6 T / V 1 6 8 L、および G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T / V 1 6 8 L であった。第 1 日および第 5 日のタンパク質濃度から計算された半減期を比較した (図 20 B)。半減期における唯一の有意差 ($P = 0.03$; 両側パラメトリック t 検定) は、S 2 3 N / A 5 5 V / K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / L 9 6 V / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T を含有する e C D 4 - I g 変異体と、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / R 1 3 4 G / V 1 6 8 L を含有する e C D 4 - I g 変異体との間のものであった。

【図 21】図 21 は、コンホメーション安定性を改善する置換を有する e C D 4 - I g 変異体および野生型 C D 4 - I g の、ラットにおける薬物動態を示す折れ線グラフである。野生型ヒト C D 4 - I g、R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T e C D 4 - I g G 1、および R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T e C D 4 - I g G 2 を 10 mg / kg でラットに皮下投与した。野生型ヒト C D 4 - I g の半減期は 11 時間と計算され、一方、R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T e C D 4 - I g G 1 および e C D 4 - I g G 2 の半減期は、それぞれ、48 時間および 42 時間と計算された。

【図 22】図 22 は A 5 5 V 置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g 変異体によるウイルス中和を示す。A 5 5 V 置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g 変異体によるウイルス中和を、感染に際してホタルルシフェラーゼを発現する C D 4⁺ C C R 5⁺ T Z M - b l 細胞において測定した。野生型ヒト A 5 5 残基または A 5 5 V 置換のいずれかを有する R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T e C D 4 - I g 変異体を系列 5 倍希釈にわたって力価測定した。A 5 5 V 置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g 変異体が B G 5 0 5 (図 22 A)、P V O . 4 (図 22 B) および 9 0 1 4 (図 22 C) 偽ウイルスによる感染を中和する能力を比較した。e C D 4 - I g の非存在下で発現されたルシフェラーゼの量に対するウイルス感染率が相対光単位 (% R L U) として示されている。破線は 50 % ウイルス感染を示す。

【図 23】図 23 は、S 2 3 N 置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g 変異体によるウイルス中和を示す。S 2 3 N 置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g 変異体によるウイルス中和を、感染に際してホタルルシフェラーゼを発現する C D 4⁺ C C R 5⁺ T Z M - b l 細胞において測定した。野生型ヒト S 2 3 残基または S 2 3 N 置換のいずれかを有する L 5 Y / A 5 5 V / I 7 6 P / L 9 6 V / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T e C D 4 - I g 変異体を系列 5 倍希釈にわたって力価測定した。S 2 3 N 置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g 変異体が B G 5 0 5 (図 23 A) および P V O . 4 (図 23 B) 偽ウイルスによる感染を中和する能力を比較した。e C D 4 - I g の非存在下で発現されたルシフェラーゼの量に対するウイルス感染率が相対光単位 (% R L U) とし

10

20

30

40

50

て示されている。破線は50%ウイルス感染を示す。

【図24】図24は、示されているeCD4-Ig変異体によるウイルス中和を示す散布図である。398F1、BG505、246F3、Tro.11、X2278、9014、PVO.4、T257-10、CE0217、ZM651、CNE8、CNE55、BJOX2000、CH119、X1634および89.6を含む試験ウイルスのパネルに対してウイルス中和アッセイを行った。標的細胞は、感染に際してホタルルシフェラーゼを発現するCD4⁺CCR5⁺TZM-bl細胞であった。eCD4-Igの非存在下で発現されたルシフェラーゼの量に対するウイルス感染率が相対光単位(%RLU)として示されている。破線は50%ウイルス感染を示す。R134G/N164D/K167Tバックグラウンドのコンテキストにおいては、置換S23N/A55V/L96Vの存在は、HIV感染の50%を抑制するのに必要なeCD4-Igの濃度の有意な減少をもたらした(P<0.0001、ウィルコクソン(Wilcoxon)マッチドペア検定)。

10

【図25】図25は、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸によってグリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸が置換されているeCD4-Ig変異体によるウイルス中和を示す。試験されたeCD4-Ig変異体には、野生型ヒトCD4-D1D2(配列番号1)対照(灰色)、A55V、G6A/A55V、G6A/S23N/A55V/V128L/V168L、G6A/S23T/A55V/V128L/V168L、およびG6A/S23N/Q40A/A55V/V128L/V168Lが含まれていた。試験ウイルスは、伝染性/始祖(founder)(t/f)ウイルスPRB931-06のエンベロープ糖タンパク質から生成される偽ウイルスである。標的細胞は、感染に際してホタルルシフェラーゼを発現するCD4⁺CCR5⁺TZM-bl細胞であった。eCD4-Igの非存在下で発現されたルシフェラーゼの量に対するウイルス感染率が相対光単位(%RLU)として示されている。破線は50%ウイルス感染を示す。

20

【図26】図26は、eCD4-Ig変異体の、アカゲザル(リーサス・マカク)における薬物動態を示す一連の折れ線グラフである。マカクにおいて評価されたeCD4-Ig変異体の全ては置換R134G/N164D/K167Tを有していた。示されている場合には、eCD4-Ig変異体は免疫グロブリンFcドメイン内に「LS」置換(M428LおよびN434S)を有していた。各アカゲザルにおける各eCD4-Ig変異体の半減期がアカゲザルの番号の隣に示されている(例えば、動物番号r13007、半減期=2.8日)。30mg/kgのR134G/N164D/K167T eCD4-IgG1(図26A)、30mg/kgのR134G/N164D/K167T eCD4-IgG2(図26B)、30mg/kgのR134G/N164D/K167T eCD4-IgG1 LS(図26C)、30mg/kgのR134G/N164D/K167T eCD4-IgG2 LS(図26D)、10mg/kgのR134G/N164D/K167T eCD4-IgG1 LS(図26E)、10mg/kgのR134G/N164D/K167T eCD4-IgG2 LS(図26F)、および1mg/kgのR134G/N164D/K167T eCD4-IgG1 LS(図26G)の静脈内注入を3頭のアカゲザルの群に行った。半減期は抗薬物抗体の潜在的出現の前の最初の10日間のデータから計算された。黒色の記号は、IgG1の投与を受けた動物における血漿eCD4-Ig濃度を示し、灰色の記号は、IgG2の投与を受けた動物における血漿eCD4-Ig濃度を示す。

30

40

【図27】図27は、eCD4-Ig変異体による、アカゲザルにおけるウイルス複製の抑制を示す折れ線グラフである。SHIV-AD8に感染したアカゲザルに30mg/kgのR134G/N164D/K167T eCD4-IgのIgG1またはIgG2形態を投与した。その後の種々の時点で、血漿ウイルス量を測定した(mL当たりのウイルスRNAコピー)。黒色の記号は、IgG1の投与を受けた動物におけるウイルス量を示し、灰色の記号は、IgG2の投与を受けた動物におけるウイルス量を示す。

【0153】

実施例

以下の実施例は単なる例示に過ぎず、本発明の範囲または内容を何ら限定するものでは

50

ない。

【0154】

実施例1 - 非ヒト霊長類 eCD4-Ig はヒト eCD4-Ig より高い安定性を示す

CD4-Ig は CD4 のドメイン 1 および 2 (CD4 D1D2) と抗体 Fc ドメインとの融合体である。eCD4-Ig は、CD4 D1D2 と、抗体 Fc ドメインと、HIV および SIV 共受容体のチロシン硫酸化領域に類似したチロシン硫酸化ペプチド (スルホペプチド) との融合体である (Gardner, M. R. ら (2015) NATURE, 519 (7541): 87-91)。この実施例は、ヒト CD4 D1D2 または非ヒト霊長類 (NHP) CD4 D1D2 を含む eCD4-Ig 変異体の凝集温度の測定を記載する。

10

【0155】

タンパク質のコンホメーション安定性 (アンフォールディングに対するタンパク質の抵抗性) はタンパク質治療用物質における重要な特性である。部分的アンフォールディングは、治療用タンパク質がインビボで他の分子に非特異的に付着することを可能にし、そして今度はこれが該治療用タンパク質の半減期を減少させうる。

【0156】

コンホメーション安定性は動的光散乱 (DLS) により測定可能であり、DLS は、溶液中の粒子サイズを測定するための方法であり、そして該粒子サイズは、異なる条件下での粒子サイズを測定するために使用されうる (Nobmann, U. ら (2007) BIOTECHNOL. GENET. ENG. REV., 24: 117-28)。ブラウン運動による粒子の運動は、大きな粒子の場合よりも小さな粒子の場合のほうが速い。DLS は、粒子の運動を検出することにより粒子サイズを計算しうる。可溶性タンパク質分子は、同じタンパク質の凝集体より小さいため、DLS により検出される粒子サイズの増加はタンパク質凝集を示す。熱スキャン DLS アッセイは、タンパク質サンプルの温度をゆっくり上昇させながら、凝集体の形成を検出する。このアッセイにおいては、より高いコンホメーション安定性を有するタンパク質は比較的高い温度で凝集し始め、一方、より低いコンホメーション安定性を有するタンパク質は比較的低い温度で凝集し始める。

20

【0157】

典型的には、組換えタンパク質治療用物質の場合、60℃以上の凝集温度が望ましい。図1Aに示されているとおり、IgG1 Fc ドメインと野生型ヒト CD4 D1D2 とを有する eCD4-Ig 変異体は 51℃ の凝集温度を有していた。図1Bに示されているとおり、IgG2 Fc ドメインと野生型ヒト CD4 D1D2 とを有する eCD4-Ig 変異体は 53℃ の凝集温度を有していた。図1Aに示されているとおり、IgG1 Fc ドメインと野生型アカゲザル CD4 D1D2 とを有する eCD4-Ig 変異体は 62℃ の凝集温度を有し、これは、ヒト CD4 D1D2 を有する対応 eCD4-Ig 変異体のものより 9℃ 高い。図1Bに示されているとおり、IgG2 Fc ドメインと野生型アカゲザル CD4 D1D2 とを有する eCD4-Ig 変異体は 67℃ の凝集温度を有し、これは、ヒト CD4 D1D2 を有する対応 eCD4-Ig 変異体のものより 14℃ 高い。

30

【0158】

したがって、野生型アカゲザル CD4 D1D2 に基づく eCD4-Ig は、野生型ヒト CD4 D1D2 に基づく eCD4-Ig と比較して改善されたコンホメーション安定性を示す。

40

【0159】

野生型ヒト CD4 D1D2 をそれぞれが含む CD4-Ig (スルホペプチドを含有しない) および eCD4-Ig (「mim2」 (配列番号 3) スルホペプチドを含有する) の凝集温度も測定した。図2に示されているとおり、CD4-Ig は 80.4℃ の凝集温度を有し、一方、eCD4-Ig は 51℃ の凝集温度を有していた。したがって、追加的結合部分 (例えば、スルホペプチド) の存在は CD4-Ig のコンホメーション安定性を著しく低下させうる。

【0160】

50

実施例2 - DLSアッセイを用いるヒトCD4 D1D2の安定性を改善するアミノ酸置換の特定

この実施例は、ヒトCD4 D1D2、例えばCD4-IgおよびeCD4-Igを含むタンパク質の凝集温度を増加させるアミノ酸置換の特定を記載する。

【0161】

コンホメーション安定性の改善をヒトeCD4-Igにもたらすアミノ酸置換を特定するために、ヒトCD4 D1D2を、種々の非ヒト霊長類（NHP）種に由来するCD4 D1D2と比較した。ヒトCD4 D1D2アミノ酸配列を、以下のものを含む種々の類人猿、サルおよび原猿種のCD4 D1D2アミノ酸配列とアライメントさせた：チンパンジー（chimpanzee）、ボノボ（bonobo）、ゴリラ（gorilla）、ボルネオオランウータン（Bornean orangutan）、ホオジロテナガザル（white-cheeked gibbon）、アジルテナガザル（agile gibbon）、フクロテナガザル（siamang）、コロブスザル（Colobus monkey）、アビシニアコロブス（Colobus guereza）、アンゴラコロブス（Angolan colobus）、アフリカミドリザル（African green monkey）、ベルベットモンキー（vervet monkey）、サバエウスモンキー（Sabaeus monkey）、タンタルスモンキー（Tantalus monkey）、アカオナガザル（red guenon）、スーティーマンガベイ（sooty mangabey）、マンドリル（mandrill）、クロキンシコウ（black snub-nose monkey）、キンシコウ（golden snub-nose monkey）、リーフモンキー（leaf monkey）、ブタオザル（pig-tailed macaque）、アカゲザル（rhesus macaque）、カニクイザル（cynomolgus macaque）、ニホンザル（Japanese macaque）、ウォルフグエノン（Wolf's guenon）、タラポイン（Talapoin）、ホオジロマンガベイ（gray-cheeked mangabey）、オリーブバブーン（olive baboon）、ドウイロティティ（coppery titi）、マーモセット（marmoset）、コモンリスザル（common squirrel monkey）、ボリビアリスザル（Bolivian squirrel monkey）、ホエザル（howler monkey）、ボリビアアカホエザル（Bolivian red howler monkey）、ノドジロオマキザル（Panamanian white-throated capuchin）、ナンシーヨザル（Nancy Ma's owl monkey）、アザラヨザル（Azara's owl monkey）、メガネザル（tarsier）、マレーヒヨケザル（Sunda flying lemur）、ハイイロネズミキツネザル（gray mouse lemur）およびコクレルシファカ（Coquerel's sifaka）（図3および4）。これらのNHP種のうち、ヒトのCD4 D1D2配列は他の類人猿のものに最も類似しており、旧世界ザルのものに2番目に類似しており、新世界ザルのものに3番目に類似しており、原猿類のものには最も類似していない（図3）。アカゲザルCD4 D1D2とヒトCD4 D1D2とは88%同一であることが判明し、T17、S23、I24、N39、N52、R59、N66、P68、L69、D88、Q89、Q94、Q110、Q129、R134、K142、L144、S147、L151、L162、N164およびK167位において差異が見られた。チンパンジーCD4 D1D2とヒトCD4 D1D2とは98%同一であることが判明し、I34、A55、P68およびE87位に差異が見られた。

【0162】

ある置換がCD4ドメイン1（D1）およびドメイン2（D2）の疎水性コアを安定化させるかどうかを判定するために、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるグリシンまたは疎水性アミノ酸を、置換されるアミノ酸より大きな体積（例えば、側鎖体積）を有する疎水性アミノ酸で置換した。疎水性アミノ酸は、ある場合には、埋もれた疎水性アミノ酸であった。この実験においては、アミノ酸A、V、P、L、I、M、F、Y

およびWは疎水性アミノ酸とみなされ、グリシンおよび疎水性アミノ酸の相対体積は以下のとおりであるとみなされた： $G < A < V < P < L = I < M < F < Y < W$ 。例えば、G 6、I 2 4、L 4 4、L 5 1、A 5 5、L 6 9、G 9 9、A 1 0 2、V 1 2 8、G 1 4 1、V 1 4 6、V 1 6 1およびV 1 6 8位はそれぞれ、NHP CD 4 D 1 D 2においては、ヒトCD 4 D 1 D 2の場合より大きな体積の疎水性アミノ酸であると認められる（図4）。理論によって拘束されることを望むものではないが、グリシンまたは疎水性アミノ酸が、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸で置換される、該タンパク質の疎水性コア内の或るアミノ酸置換は、コンホメーション安定性を増強すると仮定された。したがって、CD 4 D 1 D 2のコンホメーション安定性は、タンパク質の疎水性コアを安定化させる方法により改善されうる。潜在的な置換を分析するために、タンパク質の疎水性コア内の空間を視覚化するためのコンピュータソフトウェアプログラムを開発した。該プログラムはタンパク質データバンク（PDB）構造の仮想断層撮影断面表示および編集を可能にした。例えば、L 1 0 0、L 1 4 4、V 1 6 1およびF 1 7 0によって囲まれておりV 1 2 8を包囲する疎水性ポケット内の空になった空間に注目されたい（図5 A）。置換V 1 2 8 Lのモデリングはこの疎水性ポケットのほとんどを充填する（図5 B）。同様に、L 5、V 1 6 1、F 1 7 0およびK 7によって囲まれておりV 1 6 8を包囲する疎水性ポケットに注目されたい（図5 C）。この疎水性ポケットは置換V 1 6 8 Lにより充填される（図5 D）。ここに示されているV 1 2 8およびV 1 6 8のモデリングに加えて、このツールは、例えばG 6、A 5 5およびV 1 4 6における置換のモデリングを可能にした。したがって、ヒトCD 4 D 1 D 2の構造を分析して空間を特定し、そしてこれらの空間の充填によりCD 4 D 1およびD 2の疎水性コアを安定化しうる置換を特定した。

【0163】

これらの比較に基づき、NHP eCD 4-I gの優れた凝集温度をヒトeCD 4-I gにもたらす突然変異を特定するために、突然変異誘発分析を行った。実施例1に記載されているとおりにDLS熱スキャンアッセイを用いて、置換を評価した。置換を、個別に、および／またはCD 4 D 1 D 2内の他の位置における突然変異と組合せて（すなわち、異なる突然変異バックグラウンドにおいて）評価した。特に示されていない限り、試験したeCD 4-I g変異体はスルホペプチドmim1（配列番号2）、mim2（配列番号3）、mim4（配列番号4）、mim5（配列番号5）またはmim6（配列番号6）を含んでいた。特に示されていない限り、試験したeCD 4-I g変異体は、C 2 2 0 S置換の存在下または非存在下の、含まれているI g G 1またはI g G 2 Fcドメインを含んでいた。

【0164】

ヒトCD 4 D 1 D 2（配列番号1）におけるK 1は、類人猿であるゴリラにおいてはNである（図4 A）。野生型ヒトCD 4 D 1 D 2バックグラウンド（配列番号1）に基づくeCD 4-I gへのK 1 Nの導入は、熱安定性に関する動的光散乱（DLS）アッセイでの測定では、eCD 4-I gの凝集温度を2.3℃増加させた（図6 A）。

【0165】

ヒトCD 4 D 1 D 2（配列番号1）におけるK 2は、コロブス、スーティーマンガベイおよびマンドリルを含む幾つかの旧世界ザルにおいてはNであり、新世界ザルにおいてはTであり、原猿類においてはEである（図4 A）。野生型のヒトCD 4 D 1 D 2バックグラウンドにおいては、K 2 T、K 2 NおよびK 2 EはeCD 4-I gの凝集温度をそれぞれ3℃、3.7℃および4.6℃増加させた（図6 B～D）。R 1 3 4 G/N 1 6 4 D/K 1 6 7 TバックグラウンドにおけるK 2 E置換は凝集温度を3.9℃増加させた（図6 D）。これらの結果は、ヒトCD 4 D 1 D 2（配列番号1）のK 2位における置換、例えばEによる置換（K 2 E）が、CD 4 D 1 D 2を含むタンパク質、例えばeCD 4-I gの凝集温度を増加させることを示唆している。

【0166】

ヒトCD 4 D 1 D 2（配列番号1）におけるG 6は、原猿類であるメガネザルにおい

てはAである（図4A）。野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドへのG6Aの導入はeCD4-Igの凝集温度を4.6℃増加させた。A55Vバックグラウンドにおいては、G6Aの導入はeCD4-Igの凝集温度を0.8℃増加させた（図6E）。

【0167】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるK7は、ナンシーヨザル、アザラヨザルおよびスピックスヨザルを含む幾つかの新世界ザルにおいてはEである（図4A）。それはまた、幾つかの他の新世界ザルおよび原猿類においてはRでありうる。K7E置換はコンホメーション安定性を中程度に改善した（図6F）。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK7位における置換、例えばEによる置換（K7E）が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。

10

【0168】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK8における置換もK7に対するその接近性ゆえに評価した。ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるEによるK8の置換はコンホメーション安定性を劇的に改善した（図6G）。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK8位における置換、例えばEによる置換（K8E）が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。

【0169】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるT15はゴリラ（類人猿）においてはNであり、スーティーマンガベイ（旧世界ザル）においてはAであり、原猿類および或る新世界ザルにおいてはPであり、残りの新世界ザルにおいてはSである。T15NはN結合型グリコシル化のためのN-X-Tコンセンサスマチーフを生成させる（図4A）。ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるT15Nの導入はeCD4-Igの凝集温度を7.9℃増加させた（図6H）。

20

【0170】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるT17は、アカゲザルを含むほとんどの旧世界ザルにおいてNである。Nの存在はN結合型グリコシル化のためのN-X-Tコンセンサスマチーフを生成させる（図4A）。ヒトeCD4-IgにおけるT17N置換の導入はeCD4-Igの凝集温度を増加させた（図6I）。また、ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるT17は新世界ザルの全てにおいてEであり、T17E置換はコンホメーション安定性における中程度の改善をもたらした（図6J）。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のT17位における置換、例えばNによる置換（T17N）またはEによる置換（T17E）が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。

30

【0171】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるK21は、旧世界ザルであるサバエウスモンキーおよびタンタルスモンキーにおいてはNである（図4A）。野生型ヒトCD4 D1D2バックグラウンドを有するeCD4-IgへのK21Nの導入はその凝集温度を11℃増加させた（図6K）。

40

【0172】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるK22は、アフリカミドリザル、ベルベットモンキー、サバエウスモンキー、タンタルスモンキーおよびアカオナガザルを含む幾つかの旧世界ザルにおいてはTである（図4A）。野生型のヒトCD4 D1D2バックグラウンドを有するeCD4-IgへのK21Tの導入はその凝集温度を6.3℃増加させた（図6L）。

【0173】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるS23は、アカゲザルを含む種々の旧世界ザルおよび新世界ザルにおいてはNであり、或る他の旧世界ザルおよび新世界ザルにお

50

いてはTであり、原猿類においてはS、YまたはAである(図4A)。S23Nは、野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)に基づくeCD4-Ig分子、および置換G6A/A55V/V128L/V168Lを含有するヒトCD4 D1D2に基づくeCD4-Ig分子において、凝集温度をそれぞれ10.1℃および4.8℃増加させた(図6M)。S6Tは、G6A/A55V/V128L/V168Lを含有するバックグラウンドにおいて凝集温度を2.3℃増加させた(図6N)。

【0174】

ヒトCD4 D1D2(配列番号1)におけるG38は、原猿類であるマレーヒョケザルにおいてはである。野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)バックグラウンドにおけるG38Aの変化はeCD4-Igの凝集温度を9℃減少させた。

【0175】

ヒトCD4 D1D2(配列番号1)におけるL51は、ある原猿類においてはMである(図4A)。L51からIへの変化は野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)およびG6A/A55VバックグラウンドにおいてeCD4-Igの凝集温度をそれぞれ1.8℃および2.2℃増加させた(図6P)。

【0176】

ヒトCD4 D1D2(配列番号1)におけるA55はチンパンジーならびにボノボおよび原猿類においてはVである(図4A)。この位置は、新世界ザルの全て、ならびにアフリカミドリザル、ベルベットモンキー、サバエウスモンキー、タンタルスモンキーおよびマンドリルを含む幾つかの旧世界ザルにおいてはIである。旧世界ザルであるアカオナガザルは、この位置にスレオニンを有する唯一の異端的存在である。野生型ヒトCD4 D1D2バックグラウンドにおけるヒトeCD4-IgにおけるA55からVへの突然変異(A55V)はその凝集温度を5.7℃増加させ、R134G/N164D/K1K67T突然変異バックグラウンドにおけるヒトeCD4-IgにおけるA55からVへの突然変異(A55V)は凝集温度を4.9℃増加させた(図6Q)。しかし、G6Aのコンテキストにおいては、eCD4-Igの凝集温度は不変であった。野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)を有するeCD4-IgのコンテキストにおけるA55からIへの突然変異はその凝集温度を7.1℃増加させた(図6R)。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2(配列番号1)のA55位における置換、例えばVによる置換(A55V)またはIによる置換(A55I)が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。

【0177】

A55は、埋もれた疎水性アミノ酸である。理論によって拘束されることを望むものではないが、この位置における嵩高い疎水性アミノ酸の存在はCD4 D1の疎水性コアの安定性を改善し、それにより、その全体的なコンホメーション安定性を改善すると考えられる。結果として、CD4 D1D2における埋もれたグリシン残基または埋もれた疎水性残基を、置換されるアミノ酸より大きな体積を有する疎水性アミノ酸で置換すると、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度が増加する。例えば、以下の位置に、CD4 D2D2における埋もれたグリシン残基または埋もれた疎水性残基が存在し、これらは、より大きな体積の疎水性アミノ酸により置換されうる：野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)のL5、G6、V12、L14、A18、I24、I36、L37、L44、L51、A55、G65、F67、P68、L69、V93、G99、I71、L74、V86、V93、L95、L96、V97、F98、A102、L108、L114、L116、L118、P121、V128、P133、I138、G141、L144、V146、L149、G155、V161、V168、F170、I172、I174またはV176。また、野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)のG6、I24、L44、L51、A55、L69、G99、A102、V128、G141、V146、V161およびV168を含むこれらの位置の幾つかはNHPにおいては異なっている。

【0178】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるI70は新世界ザルおよび原猿類においては他のアミノ酸で置換されている（図4B）。アミノ酸置換I70Eの導入は、R134G/N164D/K167T eCD4-Igバックグラウンドにおいて、コンホメーション安定性が2℃改善した（図6S）。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のI70位における置換、例えばEによる置換（I70E）が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。
【0179】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるK72は新世界ザルおよび原猿類においては他のアミノ酸で置換されている（図4B）。アミノ酸置換K72Sの導入は野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドおよびR134G/N164D/K167T eCD4-Igバックグラウンドにおけるコンホメーション安定性をそれぞれ1.3℃および3℃改善した（図6T）。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のK72位における置換、例えばSによる置換（K72S）が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。
【0180】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるK75はNHPにおいては他のアミノ酸で置換されている（原猿類におけるEおよび種々の新世界ザルにおけるQを含む）（図4B）。K75Eは、野生型ヒトCD4 D1D2バックグラウンド（配列番号1）を有するeCD4-Igの凝集温度を4.1℃増加させた（図6U）。同様に、K75Qは、野生型ヒトCD4 D1D2バックグラウンド（配列番号1）を有するeCD4-Igの凝集温度を3℃増加させた（図6V）。

【0181】

ヒトCD4 D1D2におけるV86を野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドまたはG6A/A55VバックグラウンドのコンテキストにおいてLで置換することはeCD4-Igの凝集温度に実質的に影響を及ぼさなかった（図6W）。

【0182】

ヒトCD4 D1D2におけるV93を野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドのコンテキストにおいてIで置換することはeCD4-Igの凝集温度を僅かに0.2℃増加させたが、G6A/A55Vバックグラウンドにおいては凝集温度を9.25℃低下させた（図6X）。

【0183】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるQ94は類人猿およびヒトにおいてはQのみであり、旧世界霊長類、新世界霊長類および原猿類においてはEである（図4B）。Q94EはR134GバックグラウンドにおけるeCD4-Igの凝集温度を僅かに低下させた（図6U）。

【0184】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるV97をG6A/A55VバックグラウンドのコンテキストにおいてIで置換することはeCD4-Igの凝集温度を僅かに低下させた（図6Z）。

【0185】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるA102は、新世界ザルであるリスザルにおいてはVである（図4B）。A102Vは、野生型ヒトCD4 D1D2バックグラウンド（配列番号1）を有するeCD4-Igの凝集温度を1.1℃増加させた（図6A）。

【0186】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるQ110は、アカゲザルを含む或る旧世界霊長類においてはEであり、ある原猿類においてはHである（図4B）。Q110EはQ94E/R134G/N164D/K167TバックグラウンドにおけるeCD4-Igの凝集温度を変化させなかった（図6BB）。

【0187】

10

20

30

40

50

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のL116位は霊長類間で見かけ上は変わらないが、L116、C130、V146、W157およびC159により囲まれた疎水性ポケットに隣接しているため、興味深かった。ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるL116をG6A/S23N/A55V/V128L/V168LバックグラウンドのコンテキストにおいてF（置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸）で置換することはeCD4-Igの凝集温度を7.2℃増加させた（図6CC）。しかし、G6A/S23N/A55V/V128L/V146I/V168Lバックグラウンドにおいては、L116Fは凝集温度の0.4℃の低下をもたらした。同様に、L116をW（置換されるアミノ酸より大きな体積の別の疎水性アミノ酸）で置換することはG6A/S23N/A55V/V128L/V168LバックグラウンドにおいてはeCD4-Igの凝集温度を1.4℃増加させたが、G6A/S23N/A55V/V128L/V146I/V168Lバックグラウンドにおいては凝集温度を6℃低下させた（図6DD）。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のL116位における置換、例えばFまたはWによる置換（L116FまたはL116W）が、V146Iとの組合せの場合を除き、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。

【0188】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるV128は、原猿類であるメガネザルにおいてはLである（図4C）。V128をI（置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸）で置換することは野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドにおけるeCD4-Igの凝集温度を1.6℃増加させた（図6EE）。タンパク質構造を視覚化し編集するために開発されたコンピュータツールを使用して、置換V128Lをモデル化した（図5）。V128L（置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸による置換）は、L100、L144、V161およびF170により囲まれた疎水性ポケットを、野生型V128より大きな度合で充填する。V128Lは、野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度を2.7℃増加させた（図6FF）。これらの結果は、V128位における置換、特に、Vより大きな体積の疎水性アミノ酸による置換が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igのコンホメーション安定性および凝集温度を増加させることを示唆している。

【0189】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるR134はボルネオオランウータン（類人猿）においてはTであるが、マカク（旧世界ザル）、メガネザル（原猿類）、マレーヒョケザル（原猿類）およびハイイロネズミキツネザル（原猿類）においてはGである（図4C）。野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドを有するeCD4-IgにR134G置換を含めることは凝集温度を4.1℃増加させた（図6GG）。また、種々の突然変異バックグラウンド（例えば、K167TまたはQ94E/Q110E/K142R/N164D）にR134G置換を含めることはヒトeCD4-Igのコンホメーション安定性を著しく改善した（図6GG）。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のR134位における置換、例えばGによる置換（R134G）が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。

【0190】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるG140はボルネオオランウータン（類人猿）においてはAであり、幾つかの旧世界ザルにおいてはVまたはRである。野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドにおいてG140をAにより置換することはeCD4-Igの凝集温度を7.8℃増加させた（図6HH）。

【0191】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるK42は、アカゲザルを含む種々の旧世界ザルおよび新世界ザルにおいてはRであり、原猿類においてはGまたはSでありうる（

10

20

30

40

50

図4C)。種々のバックグラウンドコンテキストにおいて、K142RはeCD4-Igの凝集温度を増加させなかった(図6II)。

【0192】

ヒトCD4 D1D2(配列番号1)におけるV146は種々の新世界ザルおよび原猿類においてはLまたはMである(図4C)。また、V146は、L116、C130、V146、W157およびC159により囲まれたCD4 D2の構造における疎水性ポケットに隣接している。G6A/S23N/A55V/V128L/V146LバックグラウンドにおいてV146をL(置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸)により置換することはeCD4-Igの凝集温度を2.2℃増加させた(図6JJ)。しかし、V146をI(置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸)により置換することは、G6A/S23N/A55V/V128L/V146Lバックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度を7.6℃増加させた(図6KK)。同様に、V146をFまたはW(それぞれは、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸である)により置換することは、G6A/S23N/A55V/V128L/V146Lのバックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度をそれぞれ3.6℃および4.1℃増加させた(図6LLおよびMM)。いずれかの特定の理論により拘束されるものではないが、これらの結果は、V146を、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸により置換すること(例えば、V146I、V146F、V146L、V146W、V146MおよびV146P)により、L146、C130、V146、W157およびC159により囲まれたCD4 D2の構造における疎水性ポケットを充填することが、DLSのような熱安定性アッセイで測定された場合のタンパク質安定性を増強しうることを示唆している。

【0193】

ヒトCD4 D1D2(配列番号1)におけるN164は、チンパンジー、ボノボおよびゴリラ以外の類人猿ならびに旧世界ザルおよび原猿類においてはDである(図4C)。このDはおそらく祖先由来であり、一方、ある類人猿に存在するNおよび新世界ザルに存在するHはおそらく誘導されたものである。N164D置換の存在下および非存在下のヒトeCD4-Igの凝集温度を、他の幾つかの置換(R134G、R134G/K167T、およびQ94E/Q110E/R134G/K142R/K167T)と組合せて測定した(図6NN)。これらの突然変異バックグラウンドのそれぞれにおいて、N164Dはコンホメーション安定性の改善をeCD4-Igにもたらした。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2(配列番号1)のN164位における置換、例えばDによる置換(N164D)が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。

【0194】

ヒトCD4 D1D2(配列番号1)におけるK167はコロブス以外の旧世界ザルの全て、および原猿類の全てにおいてはTである。コロブスにおいては、この位置はRであり、新世界ザルにおいては、それはLである。ヒトeCD4-IgにおけるK167を例えばT(K167T)に突然変異させることはコンホメーション安定性を改善した(図6OO)。コンホメーション安定性におけるこの改善は3つの異なる突然変異バックグラウンド(R134G、Q94E/Q110E/R134G/K142R/N164D、およびQ94E/Q110E/R134G/N164D)において観察された。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2(配列番号1)のK167位における置換、例えばTによる置換(K167T)が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。

【0195】

ヒトCD4 D1D2(配列番号1)におけるV168は、新世界霊長類であるヨザルおよび原猿類においてはLである(図4C)。タンパク質構造を視覚化し編集するために開発されたコンピュータツールを使用して、置換V128Lをモデル化した。V168をL(置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸)により置換することは野生型

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドにおけるeCD4-Igの凝集温度を0.8℃増加させた（図6PP）。したがって、V168位における置換、特に、Vより大きな体積の疎水性アミノ酸による置換は、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igのコンホメーション安定性および凝集温度を増加させる。

【0196】

ヒトCD4 D1D2（配列番号1）におけるV176をIにより置換した。野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドにおいては、V176IはeCD4-Igの凝集温度を9.2℃増加させた。

【0197】

置換の以下の組合せが、試験されたバックグラウンドにおいて凝集温度を増加させた：K2E/N164D（図7A）；K2E/K167T（図7B）；K7E/K8E（図7C）；K8E/N164D（図7D）；K8E/K167T（図7E）；T17N/N164D（図7F）；T17N/K167T（図7G）；T17E/N164D（図7H）；T17E/K167T（図7I）；I70E/N164D（図7J）；I70E/K167T（図7K）；K72S/N164D（図7L）；K72S/K167T（図7M）；Q94E/Q110E（図7N）；Q94E/N164D（図7P）；Q94E/K167T（図7Q）；Q110E/N164D（図7S）；Q110E/K167T（図7T）；R134G/N164D（図7V）；R134G/K167T（図7W）；K142R/N164D（図7X）；K142E/K167T（図7Y）；N164D/K167T（図7Z）；およびK166N/K167T（図7AA）。置換の以下の組合せは、試験されたバックグラウンドにおいて凝集温度が低下させた：Q94/R134（図7O）、Q110/R134（図7R）、R134/K142（図7U）、およびK142/N164（図7X）。驚くべきことに、Q94EおよびQ110Eは個々には凝集温度を増加させなかったにもかかわらず、Q94/Q110の組合せの置換は凝集温度を概ね増加させた（図7N）。

【0198】

また、3つ、4つまたは5つの位置の置換の組合せの存在下および非存在下のタンパク質に関しても凝集温度を比較した。置換位置の組合せには以下のものを含んでいた：R134/N164/K167（図7A）、R134/K142/N164/K167（図7B）、T17/R134/N164/K167（図7C）、Q94/R134/N164/K167（図7D）、Q94/Q110/R134/N164/K167（図7E）、Q110/R134/N164/K167（図7F）、Q94/Q110/R134/K142/K167（図7G）、Q94/Q110/R134/N164（図7H）、Q94/Q110/K142/K167（図7I）、およびK75/Q94/Q110（図7J）。これらの置換組合せの全てはコンホメーション安定性を有意に改善した。

【0199】

R134/N164/K167の3つの位置における置換は、それ以外の点では野生型ヒトCD4 D1D2（配列番号1）バックグラウンドである場合に、eCD4-Igの凝集温度を53℃から63℃へ10℃増加させた（図8A）。具体的には、このeCD4-Ig変異体はアミノ酸置換R134G/K164D/K167Tを含有していた。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2（配列番号1）のR134、K164およびK167位における置換、例えばR134G、K164DおよびK167T置換が、CD4 D1D2を含むタンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度を増加させることを示唆している。これらの結果は、ヒトCD4 D1D2と比較した場合のNHPCD4 D1D2の優れたコンホメーション安定性が最小数の置換によって再現されうることをも示している。R134G/K164D/K167Tを含有するeCD4-Ig変異体のコンホメーション安定性の改善に基づいて、この突然変異バックグラウンドにおいて、多数の他の置換を評価した。

【0200】

ヒトCD4 D1D2のコンホメーション安定性を改善したアミノ酸置換およびそれら

10

20

30

40

50

の組合せは、しばしば、正電荷の正味の損失をもたらした。例えば、K 7 2 S、R 1 3 4 GおよびK 1 6 7 Tのそれぞれは正荷電塩基性アミノ酸を非荷電アミノ酸によって置換している。T 1 7 E、I 7 0 E、Q 9 4 E、Q 1 1 0 EおよびN 1 6 4 Dのそれぞれは非荷電アミノ酸を負荷電酸性アミノ酸によって置換している。同様に、K 2 E、K 7 E、K 8 EおよびK 7 5 Eのそれぞれは正荷電塩基性アミノ酸を負荷電酸性アミノ酸によって置換している。これらの結果は、正電荷の正味の損失または負電荷の獲得につながる置換が、C D 4 D 1 D 2を含むタンパク質、例えばe C D 4-I gの凝集温度を増加させることを示唆している。

【0201】

更に、コンホメーション安定性を改善するアミノ酸置換の多くは塩橋を破壊しないことが観察された。ヒトC D 4の既存X線結晶構造を分析することにより、潜在的塩橋に関与する位置を特定した。潜在的塩橋は以下のものであった（各塩橋がハイフンにより示されている）：K 1-E 9 1、K 2-E 9 1、K 7-D 1 0、K 8-E 1 1 9、K 2 9-K 8 5、K 5 0-E 7 7、R 5 4-D 7 8、R 5 8-E 1 3、R 5 9-D 5 6、K 7 2-D 5 6、K 8 9-E 8 5、R 1 3 1-E 1 6 9、K 1 3 6-D 1 5 3、K 1 6 7-E 1 6 9、およびK 1 7 1-E 1 6 9。ヒトC D 4 D 1 D 2とNHP C D 4 D 1 D 2とにおいて異なる位置のうち、潜在的塩橋に関与する位置はK 1、K 2、K 5 0、D 5 6、R 5 8、R 5 9、K 7 2、E 7 7、E 9 1、R 1 3 1、D 1 5 3、K 1 6 7、E 1 6 9およびK 1 7 1であった。コンホメーション安定性の改善は、T 1 7、A 5 5、I 7 0、K 7 5、Q 9 4、Q 1 1 0、R 1 3 4およびN 1 6 4位に置換を含有するC D 4由来ポリペプチドにおいて観察された。それらの位置はいずれも塩橋に関与していない。これらの結果は、C D 4 D 1 D 2を含むタンパク質、例えばe C D 4-I gのコンホメーション安定性を改善する置換は塩橋に関与していないことが多いことを示唆している。

【0202】

L 5、I 7 6、L 9 6およびF 9 8位の置換を含有するe C D 4-I gの突然変異形態のコンテキストにおいて、A 5 5 Vを含む置換の組合せを更に調べた（図9）。A 5 5 Vをこれらの他の置換の4つ全て（L 5 Y、I 7 6 P、L 9 6 VおよびF 9 8 V）と共に置換することはe C D 4-I gのコンホメーション安定性を低下させることが判明した（図9 A）。F 9 8 Vは、個別に評価された場合には、コンホメーション安定性の相当な低下を招いた（図9 B）。理論により拘束されることを望むものではないが、F 9 8 V置換はドメイン1とドメイン2との境界を不安定化させた可能性がある。ドメイン1とドメイン2との境界に同様に位置する置換I 7 6 Pを野生型に復帰させたところ、I 7 6 PはC D 4 D 1 D 2のコンテキストにおけるコンホメーション安定性に対して中程度に有害であることが判明した（図9 C）。驚くべきことに、S 2 3 N/L 9 6 V置換のペアの存在はコンホメーション安定性を有意に改善した（図9 D）。したがって、A 5 5 VおよびS 2 3 NはC D 4 D 1 D 2のコンテキストにおけるコンホメーション安定性を改善したが、I 7 6 PおよびF 9 8 Vはコンホメーション安定性に有害であった。

【0203】

グリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸を、置換されるアミノ酸より大きな体積を有する異なる疎水性アミノ酸により置換する置換を組合せ、得られたe C D 4-I gのタンパク質の凝集温度を測定した（図10）。例えば、G 6 AとA 5 5 Vとの組合せは、野生型ヒトC D 4 D 1 D 2（配列番号1）バックグラウンドを有するe C D 4-I gの凝集温度を4.5℃増加させた（図10 A）。V 1 2 8 LとV 1 2 8 Lとの組合せは、G 6 A/A 5 5 Vバックグラウンドを有するe C D 4-I gの凝集温度を2.9℃増加させた（図10 B）。G 6 A、A 5 5 V、V 1 2 8 LおよびV 1 6 8 Lの組合せは、野生型ヒトC D 4 D 1 D 2（配列番号1）バックグラウンドを有するe C D 4-I gの凝集温度を7.4℃増加させた（図10 C）。G 6 A、S 2 3 N、V 1 2 8 L、V 1 4 6 IおよびV 1 6 8 Lの組合せは、A 5 5 Vバックグラウンドを有するe C D 4-I gの凝集温度を15.7℃増加させた（図10 D）。G 6 A、S 2 3 N、A 5 5 V、V 1 2 8 L、V 1 4 6 IおよびV 1 6 8 Lの組合せは、野生型ヒトC D 4 D 1 D 2（配列番号1）バックグラウン

ドを有するeCD4-Igの凝集温度を19.4℃増加させた(図10E)。S23NとV146Iとの組合せは、G6A/A55V/V128L/V168Lバックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度を7.4℃増加させた(図10F)。S23N、V128LおよびV168Lの組合せは、G6A/A55Vバックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度を7.3℃増加させた(図10G)。S23N、A55V、V128L、V146IおよびV168Lの組合せは、G6Aバックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度を14.8℃増加させた(図10H)。S23N、V128L、V146IおよびV128Lの組合せは、G6A/A55Vバックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度を14.9℃増加させた(図10I)。G6A、S23N、A55V、L116F、V128LおよびV168Lの組合せは、野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)バックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度を19℃増加させた(図10J)。G6A、S23N、A55V、V128L、V146FおよびV168Lの組合せは、野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)バックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度を15.4℃増加させた(図10K)。G6A、S23N、A55V、V128L、V146WおよびV168Lの組合せは、野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)バックグラウンドを有するeCD4-Igの凝集温度を15.9℃増加させた(図10L)。したがって、グリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸を、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸により置換する置換の組合せは、CD4 D1D2含有タンパク質、例えばeCD4-Igの凝集温度の相当な増加をもたらした。

【0204】

グリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸を、置換されるアミノ酸より大きな体積のアミノ酸により置換することによってもたらされる凝集温度の増加を更に例示するために、DLSアッセイからの一次熱スキャンデータを或る例に関して示す(図11)。これらの例においては、G6A、A55V、G6A/A55V、V128L/V168L、S23NおよびV146Iの追加がeCD4-Igの熱安定性を漸進的に改善した。

【0205】

この実施例に記載されているDLS熱スキャンアッセイにより測定されたeCD4-Igタンパク質の凝集温度が最高温度から最低温度までの降順で示されている(図12)。

【0206】

この実施例に記載されているCD4-IgおよびeCD4-Igタンパク質変異体の熱スキャンアッセイ結果を表5に要約する。全てのIgG1Fcドメインは、*で表示されているものを除き、ヒンジ領域にC220S置換を含んでいた(標準的なIgG1番号付け)。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5

ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換	スルホペ プチド	凝集温度 (°C)	
		IgG1	IgG2
無し (野生型)	無し	80.4*	
無し (野生型)	mim2	51*	
無し (野生型)	mim2	53	53
無し (野生型)	mim6	53	
K1N	mim6	55.3	
K2T	mim6	55	
K2N	mim6	56.7	
K2E	mim6	57.6	
G6A	mim6	57.6	
T15N	mim6	60.9	
T17N	mim6	57.7	
K21N	mim6	64	
S23N	mim6	63.1	
G38A	mim6	44	
L51I	mim6	54.8	
A55V	mim2	56.7*	
A55V	mim6	56.7	
K72S	mim6	54.3	
K75E	mim6	57.1	
K75Q	mim6	56	
V86L	mim6	52.5	
V93I	mim6	53.2	
A102V	mim6	54.1	
V128I	mim6	54.6	
V128L	mim6	55.7	
R134G	mim2	57.1	
G140A	mim6	60.8	
K167T	mim2	56	

10

20

30

40

50

V168L	mim6	53.8	
V176I	mim6	62.2	
G6A/A55V	mim6	57.5	
R134G/K142R	mim2	52	
R134G/N164D	mim2	56	
R134G/K167T	mim2	58.9	57
R134G/K167T	mim4	50	56
Q94E/R134E	mim2	52	
Q110E/R134G	mim2	52	
K166N/K167T	mim6	56.4	
G6A/A55V/L51I	mim6	59.7	
G6A/A55V/V86L	mim6	57.8	
G6A/A55V/V93I	mim6	48.25	
G6A/A55V/L96V	mim6	59.2	
G6A/A55V/V97I	mim6	56	
R134G/N164D/K167T	mim2	63	61
R134G/N164D/K167T	mim4	61	57
R134G/N164D/K167T	mim5	60	62
R134G/N164D/K167T	無し	82.7	
R134G/N164D/K167T	mim6	60	61
T17N/R134G/N164D/K167T	mim2	66	60
A55V/R134G/N164D/K167T	mim6	64.9	
R134G/K142R/N164D/K167T	mim2	62	60
Q94E/R134G/N164D/K167T	mim2	63	61
Q110E/R134G/N164D/K167T	mim2	63	61
Q94E/Q110E/K142R/N164D	mim2	55	
Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T	mim2	63	65
Q94E/Q110E/R134G/K142R/K167T	mim2	62	
Q94E/Q110E/R134G/K142R/N164D	mim2	61	
Q94E/Q110E/K142R/N164D/K167T	mim2	63	
Q94E/Q110E/R134G/K142R/N164D/K167T	mim2	63	61.5
K2E/R134G/N164D/K167T	mim6	63.9	
K7E/K8E/R134G/N164D/K167T	mim6	68	
K8E/R134G/N164D/K167T	mim6	67	

10

20

30

40

50

T17E/R134G/N164D/K167T	mim6	61.8	
K21T/R134G/N164D/K167T	mim6	63	
I70E/R134G/N164D/K167T	mim6	62	
K72S/R134G/N164D/K167T	mim6	63	
K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T	無し	87.1	
K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T	mim6	66	
L5Y/S23N/A55V/I76P/L96V/F98V/R134G/N16D/K167T	mim6	61	
L5Y/S23N/A55V/I76P/L96V/R134G/N16D/K167T	mim6	68	
S23N/A55V/I76P/L96V/R134G/N16D/K167T	mim6	68	
S23N/A55V/L96V/R134G/N16D/K167T	mim6	68.5	
G6A/A55V/V128L/V168L	mim6	60.4	
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	mim6	64.8	
G6A/S23T/A55V/V128L/V168L	mim6	62.3	
G6A/S23N/A55V/V128L/V146I/V168L	mim6	72.4	
G6A/S23N/A55V/V128L/V146L/V168L	mim6	66	
G6A/S23N/A55V/V128L/V146F/V168L	mim6	68.4	
G6A/S23N/A55V/V128L/V146W/V168L	mim6	68.9	
G6A/S23N/A55V/L116F/V128L/V168L	mim6	72	
G6A/S23N/A55V/L116W/V128L/V168L	mim6	66.2	
G6A/S23N/A55V/L116F/V128L/V146I/V168L	mim6	70.9	
G6A/S23N/A55V/L116W/V128L/V146I/V168L	mim6	66.4	
G6A/S23N/A55V/L100I/V128L/V146I/V168L	mim6	68.4	
G6A/S23N/A55V/V128L/C130V/C159A/V168L	mim6	60.5	
G6A/S23N/A55V/V128L/C130V/V146F/C159A/V168L	mim6	58.8	

【 0 2 0 7 】

実施例 3 — 色素インターカレーションアッセイを用いた、ヒト CD4 D1D2 の安定性を改善するアミノ酸置換の特定

この実施例は、コンホメーション安定性を増強する CD4 ムテイン（例えば、CD4-Ig および eCD4-Ig）における置換およびその組合せを特定するための、色素インターカレーションに基づく別のタイプの熱スキャンアッセイの使用を記載する。DLS アッセイと同様に、温度が徐々に上昇するにつれて、コンホメーションの不安定性がアンフォールドタンパク質内への色素のインターカレーションを可能にする。インターカレーションした色素は蛍光を発し、それらの光はタンパク質のアンフォールディングまたは「融

解」の度合の定量的測定値として検出される。したがって、データは50%溶融温度として示される。2つの補完的なタイプの色素インターカレーションアッセイを用いた。1つはSYPROオレンジ(Orange)インターカレーションに基づくものであり、もう1つはアプライド・バイオシステムズ・タンパク質熱シフトアッセイ(Applied Biosystems Protein Thermal Shift Assay)の独自色素成分に基づくものであった。

【0208】

まず、SYPROオレンジ色素インターカレーションアッセイを用いて、コンホメーション安定性を増強するeCD4-Ig内の置換およびその組合せを特定した。このSYPROオレンジ色素インターカレーションアッセイからの融解温度が示されている(図13)。これらの結果は表6にも示されている。ここに示されているeCD4-Igタンパク質の全てはmim6スルホペプチド、ヒンジ領域内のC220S置換およびIgG1Fcを含んでいた。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6

ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換	スルホベ プチド	融解温度 (°C)
S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/L96V/Q110E/R134 G/N164D/K167T	mim6	66.6
G6A/A55V/V128L/V168L	mim6	65.3
S23N/K72S/K75E/R134G/N164D/K167T	mim6	64.5
G6A/A55V	mim6	62.7
G6A/A55V/V93I	mim6	62.0
G6A/A55V/V86L	mim6	61.7
G6A/A55V/L96V	mim6	61.6
G6A/A55V/L51I	mim6	60.6
R134G/N164D/K167T	mim6	60.1
A55V	mim6	58.7
C130A/C159V	mim6	58.5
G140A	mim6	57.9
G6A	mim6	57.6
A55I	mim6	56.1
T15N	mim6	56.0
V168L	mim6	55.3
S23N	mim6	55.3
K167T	mim6	55.2
V128L	mim6	54.7
G6A/A55V/V97I	mim6	54.5
K75Q	mim6	54.0
V168I	mim6	54.0
K166N	mim6	52.7
R131T	mim6	51.9
C130W/C159V	mim6	51.9

10

20

30

40

50

T17N	mim6	51.8
K75E	mim6	51.7
K2T	mim6	51.6
V175S	mim6	50.7
K2N	mim6	50.5
K171N	mim6	50.3
野生型	mim6	50.2
K2E	mim6	50.2
A102V	mim6	49.9
K21N	mim6	49.7
V86L	mim6	48.0
C130V/C159V	mim6	47.8
L151S	mim6	47.7
V86I	mim6	47.4
V93I	mim6	47.3
K72S	mim6	47.3
A55T	mim6	47.1
K1N	mim6	46.9
L51I	mim6	46.5
V176I	mim6	46.5
V128I	mim6	45.9
V161I	mim6	45.9
G38A	mim6	44.9
K22T	mim6	44.6
V161L	mim6	34.2
K166E	mim6	29.5
K7E	mim6	28.6

【 0 2 0 9 】

幾つかの追加的な S Y P R O オレンジ色素インターカレーションアッセイを行って、タンパク質のコンホメーション安定性を増強する能力に関して関心が持たれた e C D 4 - I g 内の置換の組合せを比較した。置換 R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T および K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T を含有する e C D 4 - I g タンパク質を、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) または野生型アカゲザル C D 4 D 1 D 2 を含有するものと比較した (図 1 5 A)。このアッセイを今度は I g G 2 F c のコンテキストにおける R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T で繰り返した (図 1 5 B)。次に、置換 R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T、K 7 2 S / K 7

5 E / Q 9 4 E / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T、および S 2 3 N / A 5 5 V / K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / L 9 6 V / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T を含有する e C D 4 - I g タンパク質を、広域中和性抗体 1 0 - 1 0 7 4、および野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号 1）または野生型アカゲザル C D 4 D 1 D 2 を含有する対照 e C D 4 - I g タンパク質と比較した（図 1 5 C）。図 1 5 A ~ C に示されている e C D 4 - I g タンパク質は全て、m i m 6 スルホペプチド、およびヒンジ領域内の C 2 2 0 S 置換を含んでいた。

【0210】

コンホメーション安定性が最も高い C D 4 ムテインのうちの 2 つを、アプライド・バイオシステムズ・タンパク質熱シフトアッセイ（Applied Biosystems Protein Thermal Shift Assay）を用いて、熱安定性に関して比較した。この実験においては、該 C D 4 ムテインは、スルホペプチドを欠く C D 4 - I g タンパク質であった。比較された置換の組合せは G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L（平均融解温度 6 8 . 5 °C）および S 2 3 N / A 5 5 V / K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / L 9 6 V / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T V 1 6 8 L（平均融解温度 6 6 . 1 °C）であった（図 1 5 D）。これらのタンパク質は共に、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号 1）を有する C D 4 - I g（平均融解温度 5 3 . 3 °C）よりも実質的に安定であった。G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L の安定化は、グリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸を、S 2 3 N / A 5 5 V / K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / L 9 6 V / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T V 1 6 8 L より大きな度合でより大きな体積の疎水性アミノ酸によって置換することに基づいているが、タンパク質安定化のためのこれらのアプローチは相補的である。更に、図 1 5 D は、いずれの置換組合せも、スルホペプチドの存在または非存在には無関係に、C D 4 ムテインを実質的に安定化させることを示している。これらの各タンパク質のそれぞれはヒンジ領域内に C 2 2 0 S 置換を含んでいた。

【0211】

このように、この実施例においては、異なる色素インターカレーションアッセイを用いて測定した場合にタンパク質安定性を増強するヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号 1）内の多数の置換および置換組合せを特定した。

【0212】

実施例 4 - ヒト C D 4 D 1 D 2 の発現を改善するアミノ酸置換の特定

この実施例は、C D 4 ムテイン、例えば C D 4 - I g および e C D 4 - I g のの発現を増強するヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号 1）における置換およびその組合せの特定を記載する。高いタンパク質収量は少なくとも 3 つの点で望ましい特性である。第 1 に、プロデューサー細胞からの分泌の前に適切にフォールディングし凝集しない翻訳タンパク質の割合はタンパク質収量に反映される。したがって、タンパク質収量の測定は、適切なタンパク質フォールディングおよび安定性を測定するための代替的アプローチである。実際、タンパク質発現を増強する置換を特定するため、タンパク質安定性アッセイ（例えば、D L S）が用いられる。第 2 に、組換えタンパク質治療物質の収量が多ければ多いほど、同じ量のタンパク質を製造するために必要な資源が少なくなり、製造コストが低くなる。第 3 に、C D 4 ムテインがいずれかの遺伝子治療ベクター媒介性送達系（例えば、A A V）により送達される場合、より高いタンパク質収量は、血漿中に存在する C D 4 ムテインの濃度を増加させる、または血漿中の C D 4 ムテインの同じ濃度を得るのに必要なベクターの量を減少させると予想される。高いタンパク質収量は望ましい特性であるため、タンパク質収量に対する種々の置換および置換組合せの効果を評価した。

【0213】

個々の置換および置換組合せを含有する種々の C D 4 ムテインを E x p i 2 9 3 細胞において発現させ、累積タンパク質収量を、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2（配列番号 1）を有する e C D 4 - I g と比較した（図 1 6）。この分析は、どの置換がタンパク質収量を一般的に増加させるのかを示した。これらの収量実験で発現されたタンパク質の量を表 7

に示す。
【表 7】

表 7

ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換	スルホベ プチド	収量 (mg/L)
S23N	mim6	89.4
T15N	mim6	82.4
K167T	mim6	81.8
G6A	mim6	80.1
G6A/A55V/V97I	mim6	76.8
K21N	mim6	76.0
G6A/A55V	mim6	74.0
K166N/K167T	mim6	72.5
K166N	mim6	72.1
G6A/A55V/L51I	mim6	70.0
T17N	mim6	66.5
K75Q	mim6	66.3
V168L	mim6	65.6
R134G/N164D/K167T	mim6	63.4
K21N/K22T	mim6	62.2
K2T	mim6	61.9
S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/L96V/Q110E/R134G/N164D/K167T	mim6	61.2
K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T	mim6	60.4
R131T	mim6	59.8
G6A/A55V/LV86L	mim6	59.8
A55V	mim6	59.4
G6A/A55V/V128L/V168L	mim6	58.2

10

20

30

40

50

S23N/K72S/K75E/R134G/N164D/K167T	mim6	54.2
K2E	mim6	54.1
A55I	mim6	53.4
G6A/A55V/V93I	mim6	51.2
V128L	mim6	51.0
G6A/A55V/L96V	mim6	47.2
K2N	mim6	44.7
K75E	mim6	42.9
V86L	mim6	38.8
A55T	mim6	34.6
V86I	mim6	34.2
K171N	mim6	34.0
野生型	mim6	33.6
K72S	mim6	29.5
V175S	mim6	28.6
A102V	mim6	28.4
L51I	mim6	26.6
C130W/C159V	mim6	23.2
V93I	mim6	22.8
K1N	mim6	18.7
L151S	mim6	13.8
V128I	mim6	13.6
K166E	mim6	11.8
G38A	mim6	11.8
K22T	mim6	11.4
V176I	mim6	11.4
V161I	mim6	10.8
G140A	mim6	8.8
G99A	mim6	5.2

V161L	mim6	3.6
C130A/C159V	mim6	1.4
C130V/C159V	mim6	1.2
K7E	mim6	0.7

グリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸を、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸により置換することの、タンパク質発現に対する効果を検討するために、幾つかの対照実験を設計した。S 2 3 位の部位における突然変異の、タンパク質の安定性および収量に対する相当な影響ゆえに、S 2 3 位における突然変異も含有させた。置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸によるグリシンおよび埋もれた疎水性アミノ酸の置換として S 2 3 N および G 6 A / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L の組合せを含有する e C D 4 - I g タンパク質および C D 4 - I g タンパク質に関する前記の改善に基づき、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L および野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) の両方をこれらのタンパク質発現実験の対照として含めた (図 1 7)。

各パネル (図 1 7 A ~ G) は、並行して発現された対照タンパク質を使用した別々のタンパク質発現実験を表す。以下の観察が認められた：最大から最小への順に (すなわち、ここでは、> は「より大きい」を意味する)、e C D 4 - I g タンパク質の発現は G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L > G 6 A / A 5 5 V > A 5 5 V > 野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 であった (図 1 7 A)。

L 1 1 6 W および L 1 1 6 F は共に、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L を含有する e C D 4 - I g の発現を改善した (図 1 7 B)。

S 2 3 N 以外の S 2 3 位における置換、例えば S 2 3 T もタンパク質発現を増強した (図 1 7 B および D)。

C 1 3 0 V / C 1 5 9 A による C 1 3 0 - C 1 5 9 ジスルフィドの置換はタンパク質発現を改善した (図 1 7 C ~ D)。

V 1 4 6 をより大きな体積の疎水性アミノ酸で置換すること (例えば、V 1 4 6 I、V 1 4 6 L、V 1 4 6 F および V 1 4 6 W) はタンパク質発現を一般的に増強した (図 1 7 E ~ G)。

同様に、L 1 1 6 をより大きな体積の疎水性アミノ酸で置換すること (例えば、L 1 1 6 F および L 1 1 6 W) はタンパク質発現を一般的に増強した (図 1 7 B、D および G)。

しかし、L 1 1 6 および V 1 4 6 の両方における、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸による置換の組合せは、タンパク質発現をそれ以上は増強しない傾向にあった (図 1 7 G)。

したがって、タンパク質発現を最大化する [例えば、しばしば、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) 配列に基づく発現タンパク質より 3 ~ 4 倍多く発現させる] 置換の組合せには、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 4 6 I / V 1 6 8 L、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 4 6 F / V 1 6 8 L、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 4 6 L / V 1 6 8 L、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 4 6 W / V 1 6 8 L、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / L 1 1 6 F / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / L 1 1 6 W / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / C 1 3 0 V / C 1 5 9 A / V 1 6 8 L、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / L 1 1 0 I / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L、および G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L / V 1 7 6 I が含まれた。また、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L は、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) バックグラウンドのコンテキストにおいては十分には発現されなかったムテインの発現をレスキューするらしいことが認められた [例えば、G 1 4 0 A および V 1 7 6 I (図 1 6) と (図 1 7 E および F) との比較]。

図 1 7 に示されているタンパク質発現収量は表 8 ~ 1 5 に示されている。また、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1)、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L、および S 2 3 N / A 5 5 V / K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / L 9 6 V / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T を有するスルホペプチドを欠く C D 4 - I g 変異体に関して、タンパク質発現を比較した (図 1 7 H)。

図 1 7 H からのタンパク質発現収量は表 1 5 に示されている。この実験は、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L が、野生型または S 2 3 N / A 5 5 V / K 7 2 S / K 7 5 E / Q 9 4 E / L 9 6 V / Q 1 1 0 E / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T C D 4 D 1 D 2 のいずれかを含有する、他の点では同一である C D 4 - I g タンパク質より効率的に発現されること、および G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L による発現の増強が該スルホペプチドに無関係であることを示した。

これらの結果は、ヒト C D 4 D 1 D 2 の特に G 6、A 5 5、L 1 1 6、V 1 2 8、V 1 4 6、V 1 6 8 および V 1 7 6 位において、グリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸を

10

20

30

40

50

、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸により置換することが、タンパク質発現を増強しうることを示している。注目すべきことに、G 6 A、A 5 5、L 1 1 6、V 1 2 8、V 1 4 6、V 1 6 8 および V 1 7 6 の側鎖は表面に露出していない。したがって、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L は、表面露出側鎖 (S 2 3) を有する位置にはただ 1 つの置換を有する。

【表 8】

表 8

<u>ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換</u>	<u>スルホペ</u>	<u>収量</u>
	<u>プチド</u>	<u>(mg/L)</u>
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	mim6	36.1
G6A/A55V	mim6	27.3
R134G	mim6	19.6
N164D	mim6	19.0
A55V	mim6	16.8
野生型	mim6	10.0

表 9

<u>ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換</u>	<u>スルホペプ</u>	<u>収量</u>
	<u>チド</u>	<u>(mg/L)</u>
G6A/S23N/A55V/L116W/V128L/V168L	mim6	67.2
G6A/S23N/A55V/F98W/V128L/V168L	mim6	64.5
G6A/S23N/A55V/L116F/V128L/V168L	mim6	63.3
G6A/S23T/A55V/V128L/V168L	mim6	36.2
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	mim6	33.5
G6A/S23N/A55V/L114F/V128L/V168L	mim6	29.5
G6A/S23N/A55V/L114I/V128L/V168L	mim6	20.4
野生型	mim6	15.2

10

20

30

40

50

表 10

<u>ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換</u>	<u>スルホペプ</u> <u>チド</u>	<u>収量</u> <u>(mg/L)</u>
G6A/S23N/A55V/V128L/C130V/V146F/C159A/V168L	mim6	99.7
G6A/S23N/A55V/L100I/V128L/C130V/V146F/C159A/V168L	mim6	91.1
チンパンジーCD4	mim6	69.9
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	mim6	64.0
G6A/S23N/A55V/V128L/C130A/V146F/C159I/V168L	mim6	52.8
G6A/S23N/A55V/V128L/C130G/V146F/C159I/V168L	mim6	44.1
野生型	mim6	25.4
G6A/S23N/A55V/L116C/V128L/C130A/V146F/V168L	mim6	1.9
G6A/S23N/A55V/L116C/V128L/C130A/V168L	mim6	1.0

10

20

表 11

<u>ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換</u>	<u>スルホペ</u> <u>プチド</u>	<u>収量</u> <u>(mg/L)</u>
G6A/S23N/A55V/V128L/V146I/V168L	mim6	60.5
G6A/S23N/A55V/L116F/V128L/V168L	mim6	54.3
G6A/S23N/A55V/V128L/C130W/C159A/V168L	mim6	52.2
G6A/S23T/A55V/V128L/V168L	mim6	47.7
G6A/S23N/A55V/V128L/C130V/C159A/V168L	mim6	45.0
G6A/S23N/A55V/V128L/C130A/C159A/V168L	mim6	41.2
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	mim6	22.0
野生型	mim6	15.9

30

40

50

表 12

<u>ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換</u>	<u>スルホペ</u> <u>プチド</u>	<u>収量</u> <u>(mg/L)</u>
G6A/S23N/A55V/V128L/V146I/V168L/V176I	mim6	34.7
G6A/S23N/A55V/L100I/V128L/V146I/V168L	mim6	34.6
G6A/S23N/A55V/L100I/V128L/V146F/V168L	mim6	31.9
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	mim6	31.7
G6A/S23N/A55V/L100I/V128L/V146I/V168L/V176I	mim6	28.4
G6A/S23N/A55V/L114W/L116A/V128L/V168L	mim6	27.7
G6A/S23N/A55V/L100I/V128L/V168L/V176I	mim6	27.7
G6A/S23N/A55V/L100I/V128L/V146F/V168L/V176I	mim6	27.1
G6A/S23N/A55V/V128L/V146F/V168L/V176I	mim6	25.5
野生型	mim6	12.3

表 13

<u>ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換</u>	<u>スルホペ</u> <u>プチド</u>	<u>収量</u> <u>(mg/L)</u>
G6A/S23N/A55V/V128L/V146I/V168L	mim6	18.8
G6A/S23N/A55V/V128L/G140A/V168L	mim6	17.1
G6A/S23N/A55V/V128L/V146L/V168L	mim6	17.0
G6A/S23N/A55V/V128L/V146W/V168L	mim6	16.9
G6A/S23N/A55V/L110I/V128L/V168L	mim6	16.9
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L/V176I	mim6	15.0
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	mim6	12.4
S23N	mim6	8.3
野生型	mim6	5.7

表 14

<u>ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換</u>	<u>スルホペプ</u>	<u>収量</u>
	<u>チド</u>	<u>(mg/L)</u>
G6A/S23N/A55V/V128L/V146I/V168L	mim6	48.4
G6A/S23N/A55V/L116F/V128L/V168L	mim6	40.9
G6A/S23N/A55V/V128L/V146F/V168L	mim6	38.4
G6A/S23N/A55V/L116W/V128L/V146I/V168L	mim6	38.4
G6A/S23N/A55V/L116F/V128L/V146I/V168L	mim6	34.9
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	mim6	31.3
野生型	mim6	11.6

表 15

<u>ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換</u>	<u>スルホペ</u>	<u>収量</u>
	<u>プチド</u>	<u>(mg/L)</u>
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	無し	186.1
S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/L96V/Q110E/R134G/N164D/K167T	無し	125.6
野生型	無し	95.0

【 0 2 1 5 】

実施例 5　－　ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおけるCD4　D1D2変異体の薬物動態

この実施例は、実施例 2～4 において確認された改善された安定性を有するCD4　D1D2変異体を含むタンパク質の、ヒトFcRnトランスジェニック免疫不全マウスにおける薬物動態を記載する。野生型ヒトCD4－IgまたはヒトCD4－IgもしくはeCD4－Igの変異体のインビボ薬物動態（pk）をヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける静脈内投与の後で測定した。

【 0 2 1 6 】

ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける第1の実験においては、野生型ヒトCD4－Igの半減期は2．4日であり、一方、R134／N164／K167またはK72／K75／Q94／Q110／R134／N164／K167位に置換を有するCD4－Igの変異体はそれぞれ4．2日または8．6日の半減期を有していた（図18A）。したがって、CD4　D1D2タンパク質の凝集温度を増加させる置換はインビボでの半減期を有意に増加させた。また、R134／N164／K167　eCD4－Igの半減期は5．5日と測定された（図18B）。更に、K72／K75／Q94／Q110／R134／N164／K167およびQ94／Q110／R134／N164／K167位に置換を有するeCD4－Igの半減期はそれぞれ9．0日および3．7日であった（図1

8 C)。これらの結果は、D L Sおよび色素インターカレーション熱スキャンアッセイにおけるe C D 4-I gのコンホメーション安定性を改善する置換が該タンパク質の薬物動態を改善することを示唆している。

【0217】

ヒトF c R nトランスジェニックマウスにおける第2の実験においては、突然変異の追加的な組合せを含有するe C D 4-I g変異体の薬物動態を比較した(図19)。この実験においては、長い半減期を有することが知られている対照広域中和性抗体10-1074を対照として使用した。10-1074(I g G 1 F cを含有する)は11.6日の半減期を有していた。野生型ヒトI g G 1 F cと以下のアミノ酸置換とを含有するe C D 4-I g変異体の半減期は、野生型ヒトC D 4 D 1 D 2(配列番号1)では3.5日、K 7 2 S/K 7 5 E/R 1 3 4 G/N 1 6 4 D/K 1 6 7 Tでは4.6日、K 7 2 S/K 7 5 E/Q 9 4 E/Q 1 1 0 E/R 1 3 4 G/N 1 6 4 D/K 1 6 7 Tでは6.1日、S 2 3 N/A 5 5 V/K 7 2 S/K 7 5 E/Q 9 4 E/Q 1 1 0 E/R 1 3 4 G/N 1 6 4 D/K 1 6 7 Tでは6.3日、およびS 2 3 N/A 5 5 V/K 7 2 S/K 7 5 E/R 1 3 4 G/N 1 6 4 D/K 1 6 7 Tでは6.9日であった(図19、表16)。したがって、e C D 4-I gの半減期は最大で2倍増加した。また、F cドメイン置換M 2 5 2 Y、S 2 5 4 TおよびT 2 5 6 E(「YTE」)、またはM 4 2 8 LおよびN 4 3 4 S(「LS」)を含有するe C D 4-I gタンパク質の半減期を、C D 4 D 1 D 2におけるS 2 3 N/A 5 5 V/K 7 2 S/K 7 5 E/Q 9 4 E/Q 1 1 0 E/R 1 3 4 G/N 1 6 4 D/K 1 6 7 T置換のコンテキストにおいて野生型ヒトI g G 1 F cを有する、他の点では同一である変異体の半減期と比較した。F cドメイン内にM 2 5 2 Y、S 2 5 4 TおよびT 2 5 6 E置換を含有するe C D 4-I g変異体はe C D 4-I gの半減期を実質的に変化させないようであった(M 2 5 2 Y、S 2 5 4 TおよびT 2 5 6 E置換を有さない場合は6.3日であったのに対して、置換を有する場合は6.0日であった)(表16)。しかし、F cドメインにおけるM 4 2 8 LおよびN 4 3 4 S置換はこのe C D 4-I g変異体の半減期をM 4 2 8 LおよびN 4 3 4 S置換の非存在下の6.3日から該置換の存在下の10.2日へと大幅に延長させた(62%の増加)(図19)。野生型ヒトC D 4 D 1 D 2(配列番号1)および野生型ヒトI g G 1 F cドメインを含有するe C D 4-I gタンパク質と比較して、C D 4 D 1 D 2におけるS 2 3 N/A 5 5 V/K 7 2 S/K 7 5 E/Q 9 4 E/Q 1 1 0 E/R 1 3 4 G/N 1 6 4 D/K 1 6 7 T置換およびF cドメインにおけるM 4 2 8 LおよびN 4 3 4 S置換はその半減期を3.5日から10.2日へとほぼ3倍増加させた。

10

20

30

40

50

【表 9】

表 16

<u>ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換</u>	<u>Fc ドメイン</u> <u>ン(全て</u> <u>IgG1)</u>	<u>平均</u> <u>半減期(日)</u>
野生型	野生型	3.5
K72S/K75E/R134G/N164D/K167T	野生型	4.6
K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T	野生型	6.1
S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T	野生型	6.3
S23N/A55V/K72S/K75E/R134G/N164D/K167T	野生型	6.9
S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T	YTE	6.0
S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T	LS	10.2

【0218】

実施例 6 — 野生型マウスにおける CD4 D1D2 変異体の薬物動態

この実施例は、野生型 BALB/cJ マウスにおける、CD4 D1D2 に置換を有する eCD4-Ig のタンパク質の薬物動態を記載する。

【0219】

この実験の第1の目的は、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸によってグリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸を置換することによって安定化される eCD4-Ig 変異体が、酸性度を増加させる置換の組合せによって大幅に安定化された eCD4-Ig 変異体に類似した半減期を示す eCD4-Ig を与えたかどうかを決定することであった。この実施例で試験した対照タンパク質は、以下の置換を有する CD4 D1D2 配列を有していた：S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T。表面の変化により大幅に安定化されたこの変異体の薬物動態を、置換 G6A/S23N/A55V/V128L/V168L を有する変異体の薬物動態と比較した（図20A）。S23N以外に、G6A/S23N/A55V/V128L/V168L は該タンパク質の疎水性コアに内部置換のみを含む。

【0220】

この実験の第2の目的は、(i) CD4 ムテインをより酸性にする置換と、(ii) 置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸によるグリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸の内部置換とを組合せることが CD4 ムテインの薬物動態に影響を及ぼすかどうかを決定することであった。この大きく内部安定化された変異体に表面荷電置換を加えることが薬物動態に及ぼす影響を評価するために、CD4 D1D2 内に以下の置換組合せを含有する eCD4-Ig 変異体をこの実験に含めた：G6A/S23N/A55V/V128L/R134G/V168L、G6A/S23N/A55V/V128L/K167T/V168L、および G6A/S23N/A55V/V128L/R134G/N164D/K167T/V168L（図20A）。第1日～第5日の期間の半減期を計算した。なぜなら、これらの eCD4-Ig タンパク質に対するマウス抗体応答はこれらの野生型（すなわち、非免疫不全）BALB/cJ マウスの全てではなく一部で第8日に観察されたからである。平均半減期を表17に示す。この実験は、グリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸を、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸により置換することによって大幅に安定化された変異体の全てが、該タンパク質を大部分はより酸性にする置換 S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N

164D/K167Tを含有する変異体と少なくとも同じ長さの半減期を示すことを示した(図20B)。これらの変異体の1つであるG6A/S23N/A55V/V128L/R134G/V168Lは、置換S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167Tを有する対照変異体よりも有意に長い半減期を示した(P=0.03、両側パラメトリックt検定)。更に、この例(例えば、G6A/S23N/A55V/V128L/R134G/V168LとG6A/S23N/A55V/V128L/V168Lとの比較)は、酸性アミノ酸による野生型ヒトCD4 D1D2(配列番号1)における塩基性アミノ酸の置換が、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸によるグリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸の置換と組合されて、CD4ムテイン、例えばeCD4-Igのインビボ半減期を増加させることを示している。要約すると、この例は、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸によるグリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸の置換を含有するCD4ムテイン、例えばeCD4-Igが、該タンパク質のインビボ半減期を、本明細書中に特徴づけられている他の置換組合せと少なくとも同じ程度に増加させることを示している。

【表10】

表 17

ヒト CD4 D1D2 (配列番号 1)における置換	平均半減期 (日)
S23N/A55V/K72S/K75E/Q94E/Q110E/R134G/N164D/K167T	5.1
G6A/S23N/A55V/V128L/V168L	6.8
G6A/S23N/A55V/V128L/R134G/V168L	8.4
G6A/S23N/A55V/V128L/K167T/V168L	5.8
G6A/S23N/A55V/V128L/R134G/N164D/K167T/V168L	6.3

【0221】

実施例7 - ラットにおけるCD4 D1D2変異体の薬物動態

この実施例は、実施例2において確認された改善された安定性を有するCD4 D1D2変異体を含むタンパク質の、ラットにおける薬物動態を記載する。置換R134G/N164D/K167Tを有するヒトeCD4-Ig変異体および野生型ヒトCD4-Igのインビボ薬物動態(pk)をラットにおける10mg/kgのタンパク質の皮下投与の後で測定した。

【0222】

野生型ヒトCD4-Igの半減期はラットにおいては11時間であり(図21)、これは公開文献(例えば、Chamow, S. M.ら(1994)BIOCONJUG. CHEM., 5(2):133-40)と一致している。しかし、突然変異R134G/N164D/K167Tを含有するeCD4-Igの変異体は、実質的に、より長い半減期、例えば、R134G/N164D/K167T eCD4-Ig G1では48時間およびR134G/N164D/K167T eCD4-Ig G2では42時間の半減期を有していた。これらの結果は、DLS熱スキャンアッセイにおいてeCD4-Igのコンホメーション安定性を改善する置換、例えばR134G/N164D/K167T置換が、該タンパク質の薬物動態をも改善することを示唆している。

【0223】

実施例 8 — C D 4 D 1 D 2 変異体によるウイルス中和

この実施例は、実施例 2～7 において確認された改善された安定性および薬物動態を有する C D 4 D 1 D 2 変異体を含むタンパク質によるウイルスの中和を記載する。

【0224】

A 5 5 V 置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g 変異体をウイルス中和に関して試験した。R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T 突然変異バックグラウンドにおいて、A 5 5 V 置換の効果を試験した。A 5 5 V 突然変異は、H I V の 3 つの異なる一次分離株である B G 5 0 5 (図 2 2 A)、P V O . 4 (図 2 2 B) および 9 0 1 4 (図 2 2 C) の感染を e C D 4 - I g が中和する効力を改善した。S 2 3 N 置換の存在下および非存在下の e C D 4 - I g 変異体もウイルス中和に関して試験した。L 5 Y / A 5 5 V / I 7 6 P / L 9 6 V / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T 突然変異バックグラウンドにおいて、S 2 3 N 置換の効果を試験した。S 2 3 N 置換の存在は、2 つの異なる H I V 株であるクレード A ウイルス B G 5 0 5 (図 2 3 A) およびクレード B ウイルス P V O . 4 (図 2 3 B) を e C D 4 - I g が中和する能力が改善した。総合すると、これらの結果は、ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) の S 2 3 および A 5 5 位における置換、例えば S 2 3 N および A 5 5 V 置換が、C D 4 D 1 D 2 を含むタンパク質、例えば e C D 4 - I g によるウイルス中和を増強することを示唆している。

【0225】

置換 S 2 3 N / A 5 5 V / L 9 6 V / R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T を含有する e C D 4 - I g 変異体 (68.5℃の凝集温度) が試験ウイルスのパネルを中和する能力を、置換 R 1 3 4 G / N 1 6 4 D / K 1 6 7 T を含有する変異体 (60℃の凝集温度) の場合と比較した。試験ウイルスは 3 9 8 F 1、B G 5 0 5、2 4 6 F 3、T r o . 1 1、X 2 2 7 8、9 0 1 4、P V O . 4、T 2 5 7 - 1 0、C E 0 2 1 7、Z M 6 5 1、C N E 8、C N E 5 5、B J O X 2 0 0 0、C H 1 1 9、X 1 6 3 4 および 8 9 . 6 であった。68.5℃の凝集温度を有する e C D 4 - I g 変異体は、60℃の凝集温度を有する e C D 4 - I g 変異体よりも有意に良好にウイルス感染を中和した ($P < 0.0001$ 、ウィルコクソン・マッチドペア検定) (図 2 4)。ウイルス感染の 50% を中和するのに必要な e C D 4 - I g の幾何平均濃度は、前記の 8.5℃高い凝集温度を有する変異体では約 1 桁低かった。

【0226】

また、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸によるグリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸の置換を含有する e C D 4 - I g に関しても、ウイルス中和を試験した (図 2 5)。このアッセイで使用した試験ウイルスは感染-創始 (t r a n s m i t t e d - f o u n d e r) (t / f) ウイルス P R B 9 3 1 - 0 6 であった。試験した e C D 4 - I g 変異体には、野生型ヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) 対照 (灰色)、A 5 5 V、G 6 A / A 5 5 V、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L、G 6 A / S 2 3 N / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L、および G 6 A / S 2 3 N / Q 4 0 A / A 5 5 V / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L が含まれた。この実験は、ウイルス中和が、A 5 5 V、G 6 A / A 5 5 V、および G 6 A / A 5 5 V / S 2 3 T / V 1 2 8 L / V 1 6 8 L を含有する変異体に関して、非常に類似していることを示した。しかし、S 2 3 T の代わりに S 2 3 N を含有させると、ウイルス中和が改善された。更に、Q 4 0 A によりもたらされる中和の増強は、S 2 3 N および A 5 5 V によりもたらされる中和の増強と重複しておらず、これらの 3 つの置換が組合された場合に最大の中和効力が観察された。したがって、置換されるアミノ酸より大きな体積の疎水性アミノ酸によるグリシンまたは埋もれた疎水性アミノ酸の置換はウイルス中和に悪影響を及ぼさない。

【0227】

これらの結果は、凝集温度を増加させるヒト C D 4 D 1 D 2 (配列番号 1) における置換が、C D 4 D 1 D 2 を含むタンパク質、例えば e C D 4 - I g によるウイルス中和をも増強することを示唆している。

【0228】

10

20

30

40

50

実施例 9 - アカゲザルにおける CD4 D1D2 変異体の薬物動態

この実施例は、実施例 2 において確認された改善された安定性を有する CD4 D1D2 変異体を含むタンパク質の、アカゲザルにおける薬物動態を記載する。

【0229】

IgG1 および IgG2 免疫グロブリン Fc 領域を使用して、R134G/N164D/K167T 置換を有する eCD4-Ig 変異体を構築した。IgG1 および IgG2 Fc 領域内で、モノクローナル抗体の半減期を延長させることが示されている置換 M428L および N434S (略称:「LS」) を含有する変異体を作製した。これらの変異体の薬物動態をアカゲザルにおいてインビボで評価した。ここで試験した変異体は以下の凝集温度を有していた。R134G/N164D/K167T eCD4-IgG1、60℃; R134G/N164D/K167T eCD4-IgG2、66℃; R134G/N164D/K167T LS eCD4-IgG1、68℃; および R134G/N164D/K167T eCD4-IgG2、66℃。

【0230】

30mg/kg の R134G/N164D/K167T eCD4-IgG1 (図 26 A)、30mg/kg の R134G/N164D/K167T eCD4-IgG2 (図 26 B)、30mg/kg の R134G/N164D/K167T LS eCD4-IgG1 (図 26 C)、および 30mg/kg の R134G/N164D/K167T LS eCD4-IgG2 (図 26 D) の静脈内注入を 3 頭のアカゲザルの群に行った。各 CD4 由来ポリペプチドは二相性薬物動態プロファイルを示す傾向にあり、その場合、2.7~6.2 日の半減期を示す第 1 相、およびポリペプチドの血漿中濃度が急速に低下する第 2 相が存在した。注目すべきことに、特に、R134G/N164D/K167T eCD4-Ig に関して観察された半減期は、CD4-Ig に関して報告されたものよりも有意に長かった。IgG1 または IgG2 Fc における LS 置換の存在は半減期を中程度に延長させるようであった。

【0231】

同じ eCD4-IgG1 タンパク質を 10mg/kg (図 26 E) または 1mg/kg (図 26 G) でアカゲザル (マカク) に投与したところ、それらを 30mg/kg で投与した場合 (図 26 C) に観察されたのと同じ薬物動態プロファイルが観察された。同様に、同じ eCD4-IgG2 タンパク質を 10mg/kg (図 26 F) でアカゲザル (マカク) に投与したところ、それらを 30mg/kg で投与した場合 (図 26 D) に観察されたのと同じ薬物動態プロファイルが観察された。

【0232】**実施例 10 - CD4 D1D2 変異体での感染アカゲザルの治療**

この実施例は、実施例 2 において確認された改善された安定性を有する CD4 D1D2 変異体を含むタンパク質での SHIV 感染アカゲザルの治療を記載する。

【0233】

SHIV-AD8 に感染したアカゲザルを、R134G/N164D/K167T eCD4-Ig の IgG1 または IgG2 形態の 30mg/kg の静脈内投与により治療した (図 27)。各タンパク質は血漿中ウイルス量を 1 桁以上抑制した。該動物の全てにおいて、ウイルス量は少なくとも 1 つの時点で検出限界まで抑制された。eCD4-Ig の IgG1 形態を投与した動物においては、より高いウイルス量からこれらの動物に開始した場合でも、ウイルス量はより遅く再増加した。これらの結果は、例えば R134G/N164D/K167T 置換を含む、本明細書に記載されている CD4 D1D2 変異体を含むタンパク質、例えば eCD4-Ig がウイルス複製を抑制し、それにより霊長類におけるウイルス感染を治療しうることを示唆している。

【0234】**文献による援用**

本明細書で言及されている特許および科学文書のそれぞれの全開示をあらゆる目的で本明細書に組み入れることとする。

【0235】

均等物

本発明は、その精神または本質的特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化されうる。したがって、前記の実施形態は、本明細書に記載されている本発明を限定するものではなく、あらゆる点において例示的であるとみなされるべきである。したがって、本発明の範囲は、前記説明ではなく添付の特許請求の範囲により示され、特許請求の範囲の均等の意味および範囲内に含まれる全ての変更が本発明に含まれると意図される。

【表11】

SEQUENCE LISTING

配列番号 1:

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTkgpsklNDRADSRRLW
DQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSdthllQGQSLTLTLSPPGS
SPSVQCRSPRGKNIQGKTLsvsQLELQDSGTWTCTVLQNQKKEFKIDIVVLA

配列番号 2: DYADYDGGYYYDMD

配列番号 3: DYYDYDGGYYYDMD

配列番号 4: DYYDYDGGYYYDDD

配列番号 5: DYYDYDGGYYYDND

配列番号 6: DYYDYDGGYYYDGD

配列番号 7: DYXDYDGGYYYDXD, (ここで、Xは任意のアミノ酸である)

配列番号 8:

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTkgpsklNDRADSRRLW
DQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEQKEEVQLLVFGLTANSdthllQGQSLTLTLSPPGSS
PSVQCRSPGGKNIQGKTLsvsQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

配列番号 9:

AAGAAGGTGGTgctGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGCCGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTgctGCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGCTGGTGGCC

配列番号 10:

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTkgpsklNDRVDSRRRLW
DQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSdthllQGQSLTLTLSPPGS
SPSVQCRSPRGKNIQGKTLsvsQLELQDSGTWTCTVLQNQKKEFKIDIVVLA

配列番号 11:

AAGAAGGTGGTgctGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA

10

20

30

40

50

GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCAGAGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGTCAGAACAGAGA
AGAAGGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTCTGGCC

配列番号 12:

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILGNQGSFLT KGPSKLNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIIKLNKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTTLTLESPPGS
SPSVQCRSPGGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

10

配列番号 13:

AAGAAGGTGGTCTGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGTCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTCTGGCC

配列番号 14:

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKNIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLT KGPSKLNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIIKLNKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTTLTLESPPGS
SPSVQCRSPGGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

20

配列番号 15:

AAGAAGGTGGTCTGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAACATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGTCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTCTGGCC

30

配列番号 16:

NEVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILGNQGSFLT KGPSKLNDRADSRRLW
DQGNFPLIIKLNKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTTLTLESPPGS
SPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA

配列番号 17:

AACGAGGTGGTCTGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA

40

GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGCCGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCAGAGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGAACCAGA
AGAAGGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTCTGGCC

配列番号 18:

KKVVLGEEGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRLW
DQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGS
SPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQNKQVEFKIDIVVLA

10

配列番号 19:

AAGAAGGTGGTCTGCTGGGCGAGGAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGCCGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCAGAGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGAACCAGA
AGAAGGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTCTGGCC

20

配列番号 20:

NEVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRVDSRRLW
DQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGS
SPSVQCRSPGGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

配列番号 21:

AACGAGGTGGTCTGCTGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTCTGGCC

30

配列番号 22:

KKVVLGEEGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRVDSRRLW
DQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGS
SPSVQCRSPGGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

配列番号 23:

40

AAGAAGGTGGTGCTGGGCGAGGAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTGTGTCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTGTGCGCC

配列番号 24:

10

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILGNQGS FLTKGPSKLNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVELLVFGLTANS DTHLLEGQSLTLTLESPPGS
SPSVQCRSPGGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

配列番号 25:

AAGAAGGTGGTGCTGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGGAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGGAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTGTGTCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTGTGCGCC

20

配列番号 26:

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILGNQGS FLTKGPSKLNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIISNLIKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGS
SPSVQCRSPGGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

配列番号 27:

AAGAAGGTGGTGCTGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAGCAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTGTGTCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTGTGCGCC

30

配列番号 28:

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILGNQGS FLTKGPSKLNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIIKNLEIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGS
SPSVQCRSPGGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

40

配列番号 29:

AAGAAGGTGGTGCTGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGGAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTGTGGCC

10

配列番号 30:

NEVVLGEEGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILGNQGS FLTKGPSKLNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGS
SPSVQCRSPGGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

配列番号 31:

AACGAGGTGGTGCTGGGCGAGGAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTGTGGCC

20

配列番号 32:

GNEVVLGEEGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILGNQGS FLTKGPSKLNDRVDSRRSL
WDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPG
SSPSVQCRSPGGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

30

配列番号 33:

AACGAGGTGGTGCTGGGCGAGGAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAGCATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCCCCCCGGCAGC
AGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGGACCAGA
AGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTGTGGCC

配列番号 34:

40

GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCT
GCCCCGCCCTCACTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGT
TCCTTGTAAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGCCATGTCTAGGGTCGTT
ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTC
AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG
AGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCC
CCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATG
GGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGT
TTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCAC
CCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTG
TAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGTCGTTTGTGTAACCGTCAGATCGCTCGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTC
CATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAAC
GAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATC
CGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAAGTCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCGTGT
ACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGAGCGCTCCACC
ATGAACAGAGGCGTGCCCTTCAGACACCTGCTGCTGGTGTGTCAGCTGGCCCTGCTGCCCCG
CGCCACCCAGGGCAAGAAGGTGGTGTGTTGGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAGCTGACCTGCA
CCGCCAGCCAGAAGAAGAGCATCCAGTTCCTGGAAGAAGAGCAACAGATCAAGATCCTG
GGCAACCAGGGCAGCTTCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGTGGACAGCAG
AAGAAGCCTGTGGGACCAGGGCAACTTCCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACA
GCGACACCTACATCTGCGAGGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGC
CTGACCGCCAACAGCGACACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCTGACCTGGAGAG
CCCCCCCCGAGCAGCCCCAGCGTGCAGTGCAGAAGCCCCGGCGGCAAGAACATCCAGGGCG
GCAAGACCTTGAGCGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGACAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTG
CTGCAGGACCAGAAGACCGTGGAGTTCAAGATCGACATCGTGGTGTGTCGGCCGAGCCCCAAGAG
CAGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCG
TGTTCTGTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACC
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGAG
TGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC
CAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCAGAGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGA
GCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC
GGCCAGCCCAGAGAACAATAAGACCAACCCCCCCCCGCTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCACTGCA
GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC
AAGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGACTACTACGACTACGACGGCGGCTACTACTACGACGGCGACTG
AGCGGCGGCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATA
TGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT
CCCGTATGGCTTTTCAATTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTTATGAGGAG
TTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCAC
TGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTA
TTGCCACGGCGGAACATCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTG
GGCACTGACAATTCCTGGTGTGTGCGGGGAAATCATCGTCCTTTTCTTGGCTGCTCGCCTG
TGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAG
CGGACCTTCTTCCCGCGGCTGCTGCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTTCGCTTTCGCTT
CCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGGCTTCCCGCTTGGGGGATCCAGACATGATAA
GATACATTGATGAGTTTGGACAAAACCACAATAAGATGAGTGAAGGAAATGCTTTATTTGT
GAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAA
CAACAATTGCATTCAATTTATGTTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTTCGGATC

10

20

30

40

50

CTCTAGAGTCGACCAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTA
CAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG
CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA
CGCGGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGC

配列番号 35:

ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCCTCCCAGC
AGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCACAAAAAGGGGATACAGTGGAAGTGACCTGTA
CAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGATAAAGATTCTG
GGAAATCAGGGCTCCTTCTTAAGTAAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGCTGACTCAAG
AAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTTCCCTGATCATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACT
CAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTGGA
TTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGCCTGACCCTGACCTTGGAGAG
CCCCCTGGTAGTAGCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAAGGGGTAAAAACATACAGGGGG
GGAAGACCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCACCTGGACATGCACTGTC
TTGCAGAACCAGAAGAAGGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTGGTGCTAGCT

10

配列番号 36:

KKVVLAKKGDVELTCTASQKKNIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTGP SKLNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIIKNLKI ESDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGS
SPSLQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQNKLEFKIDIVVLA

20

配列番号 37:

AAGAAGGTGGTGCTGGCCAAGAAGGGCGATACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAACATCCAGTTCCACTGGAAGAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCAAGCAAGCTGAACGATAGAGTGGATAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GATCAGGGCAACTTCCCACTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGATAGCGATACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGATCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTGCGCCTGACCGCCAACA
GCGATACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCACCAGGCAGC
AGCCCAAGCCTGCAGTGCAGAAGCCCAAGAGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGATAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGAACCAGA
AGAAGCTGGAGTTCAAGATCGATATCGTGGTGCTGGCC

30

配列番号 38:

KKVVLAKKGDVELTCTASQKKNIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTGP SKLNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIIKNLKI ESDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGS
SPSLQCRSPRGKNIQGGKTL SISQLELQDSGTWTCTVLQNKLEFKIDIVVLA

配列番号 39:

AAGAAGGTGGTGCTGGCCAAGAAGGGCGATACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAACATCCAGTTCCACTGGAAGAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCA

40

GCTTCCTGACCAAGGGCCCAAGCAAGCTGAACGATAGAGTGGATAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GATCAGGGCAACTTCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGATAGCGATACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGATCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGATACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCACCAGGCAGC
AGCCCAAGCCTGCAGTGCAGAAGCCCAAGAGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CATCAGCCAGCTGGAGCTGCAGGATAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGAACCAGA
AGAAGCTGGAGTTCAGATCGATATCGTGGTGTGGCC

配列番号 40:

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKNIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTkgpsklNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIIISNLEIEDSDTYICEVEDQKEEVELVVFGLTANS DTHLLEGQSLTLTLESPPGS
SPSVQCRSPGGKNIQGGKTLVSQLELQDSGTWTCTVLQDQKTVEFKIDIVVLA

10

配列番号 41:

AAGAAGGTGGTGTCTGGGCAAGAAGGGCGATACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAACATCCAGTTCCTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCAAGCAAGCTGAACGATAGAGTGGATAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GATCAGGGCAACTTCCCCTGATCATCAGCAACCTGGAGATCGAGGATAGCGATACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGATCAGAAGGAGGAGGTGGAGCTGGTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGATACCCACCTGCTGGAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCACCAGGCAGC
AGCCCAAGCGTGCAGTGCAGAAGCCAGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CGTGAGCCAGCTGGAGCTGCAGGATAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGGATCAGA
AGACCGTGGAGTTCAGATCGATATCGTGGTGTGGCC

20

配列番号 42:

KKVVLAKKGDTVELTCTASQKKNIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTkgpsklNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIIKLNKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGS
SPSLQCRSPGGKNIQGGKTLISQLELQDSGTWTCTVLQNQKKLEFKIDIVVLA

配列番号 43:

AAGAAGGTGGTGTCTGGCCAAGAAGGGCGATACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAACATCCAGTTCCTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCAAGCAAGCTGAACGATAGAGTGGATAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GATCAGGGCAACTTCCCCTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGATAGCGATACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGATCAGAAGGAGGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGATACCCACCTGCTGCAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCACCAGGCAGC
AGCCCAAGCCTGCAGTGCAGAAGCCAGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CATCAGCCAGCTGGAGCTGCAGGATAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTCTGCAGAACCAGA
AGAAGCTGGAGTTCAGATCGATATCGTGGTGTGGCC

30

配列番号 44:

40

50

KKVVLAKKGDVELTCTASQKKNIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLT KGPSKLNDRVDSRRSLW
DQGNFPLIISNLEIEDSDTYICEVEDQKEEVELLVFGLTANS DTHLLEGQSLTTLTLESPPGS
SPSLQCRSPGGKNIQGGKTLISISQLELQDSGTWTCTVLQDQKTLEFKIDIVVLA

配列番号 45:

AAGAAGGTGGTGCTGGCCAAGAAGGGCGATACCGTGGAGCTGACCTGCACCGCCAGCCAGAA
GAAGAACATCCAGTTCCACTGGAAGAACAGCAACCAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCA
GCTTCCTGACCAAGGGCCCAAGCAAGCTGAACGATAGAGTGGATAGCAGAAGAAGCCTGTGG
GATCAGGGCAACTTCCCCTGATCATCAGCAACCTGGAGATCGAGGATAGCGATACCTACAT
CTGCGAGGTGGAGGATCAGAAGGAGGAGGTGGAGCTGCTGGTGTTTCGGCCTGACCGCCAACA
GCGATACCCACCTGCTGGAGGGCCAGAGCCTGACCCTGACCCTGGAGAGCCCACCAGGCAGC
AGCCCAAGCCTGCAGTGCAGAAGCCCAGGCGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCTGAG
CATCAGCCAGCTGGAGCTGCAGGATAGCGGCACCTGGACCTGCACCGTGCTGCAGGATCAGA
AGACCCTGGAGTTCAAGATCGATATCGTGGTGCTGGCC

10

配列番号 46:

MNRGVFPRHLLLVQLALLPAATQG

20

配列番号 47:

ATGAACAGAGGCGTGCCCTTCAGACACCTGCTGCTGGTGCTGCAGCTGGCCCTGCTGCCCCG
CGCCACCCAGGGC

30

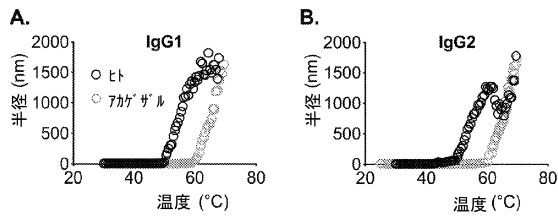
40

50

【図面】

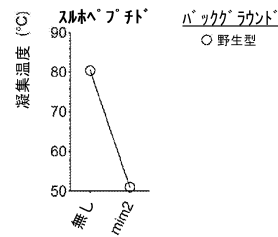
【図 1】

FIGURE 1



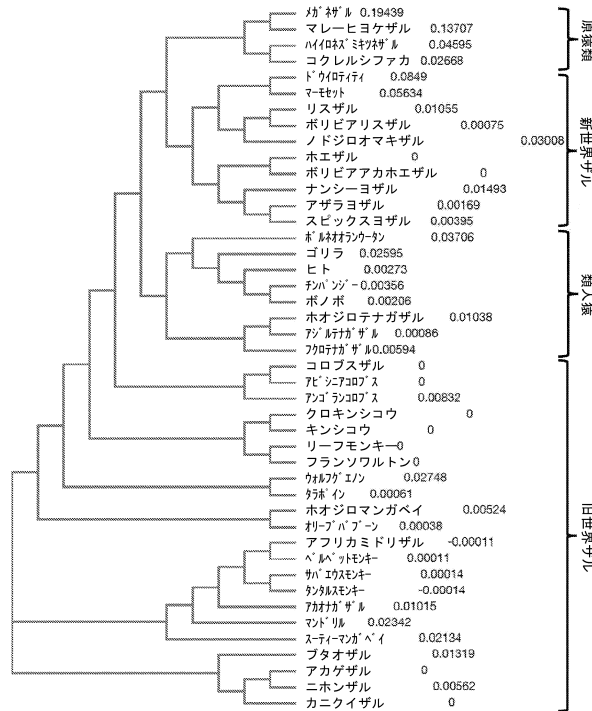
【図 2】

FIGURE 2



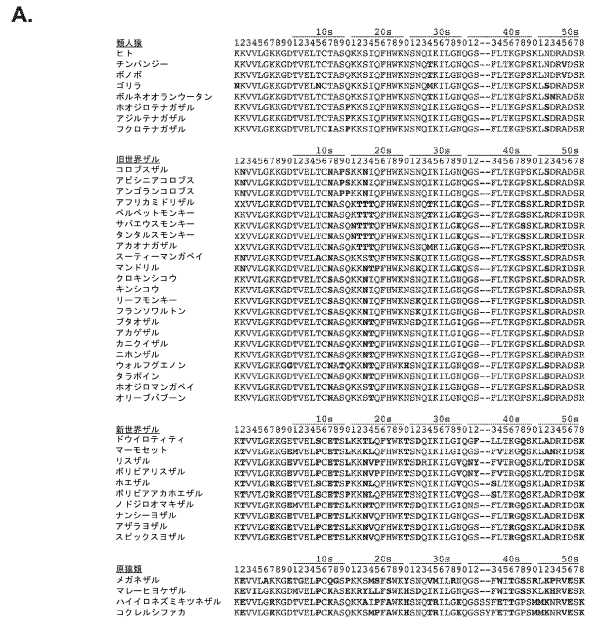
【図 3】

FIGURE 3



【図 4-1】

FIGURE 4



【図 4-2】

B.

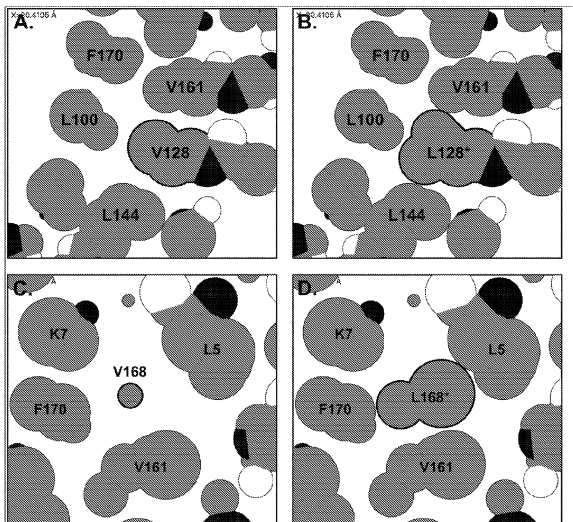
[illegible]

【図 4-3】

C.

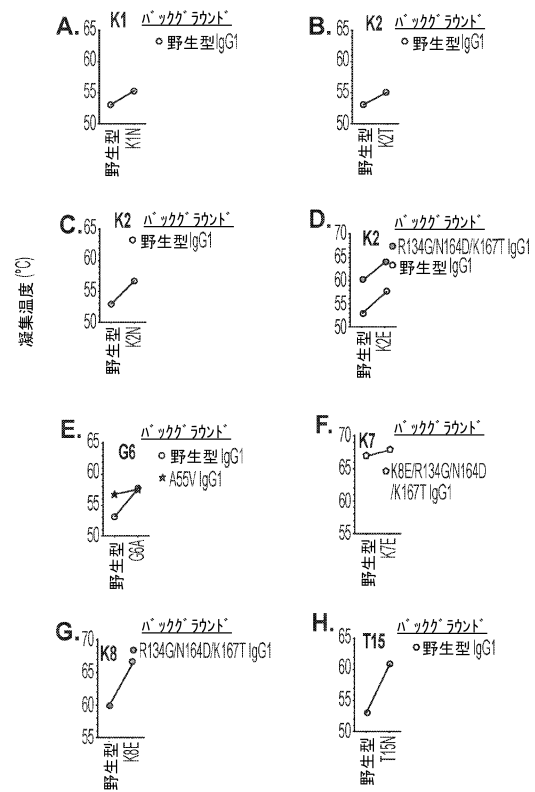
[illegible]

【図 5】

FIGURE 5

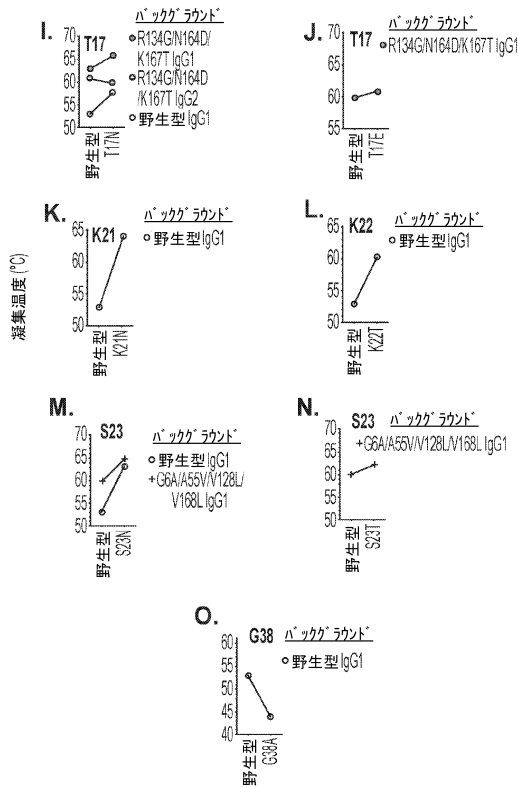
【図 6-1】

FIGURE 6



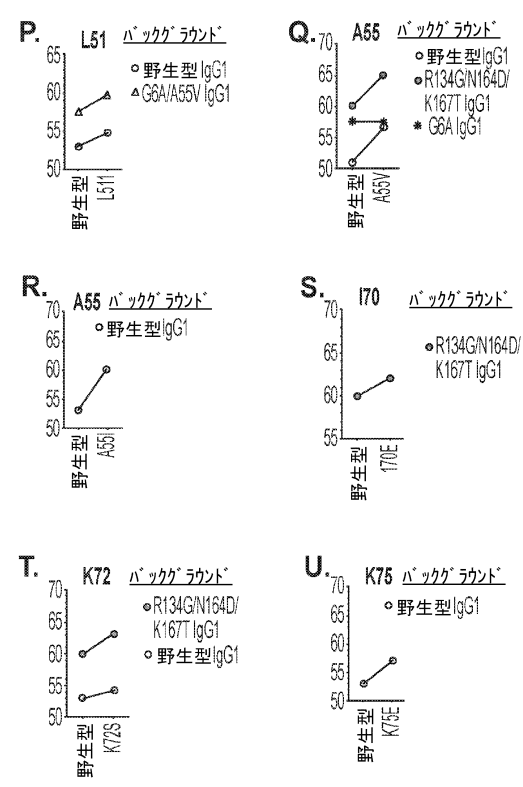
【図 6 - 2】

FIGURE 6, 続き



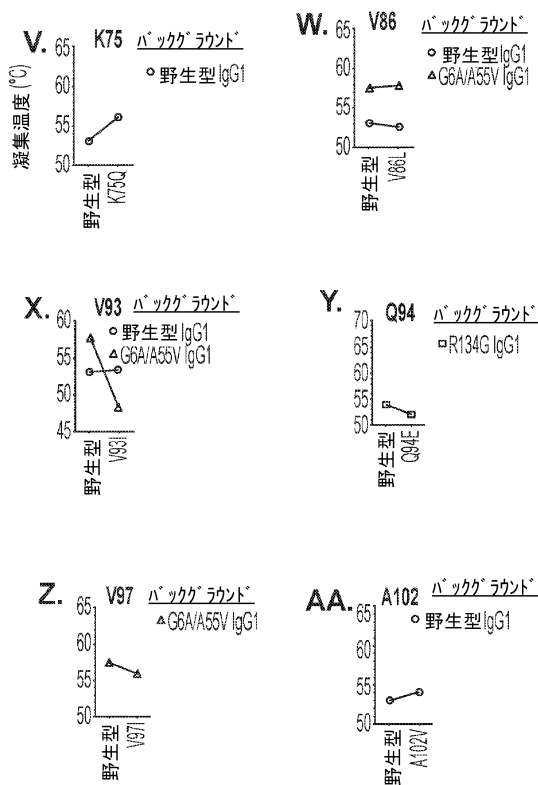
【図 6 - 3】

FIGURE 6, 続き



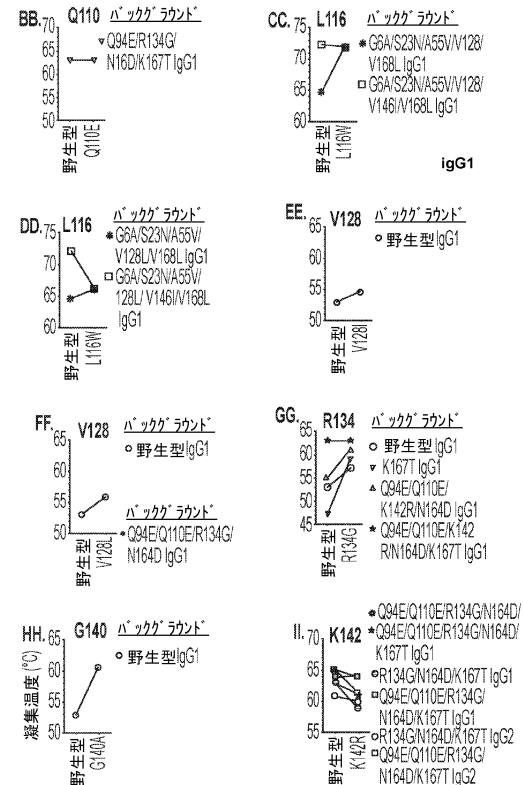
【図 6 - 4】

FIGURE 6, 続き



【図 6 - 5】

FIGURE 6, 続き



10

20

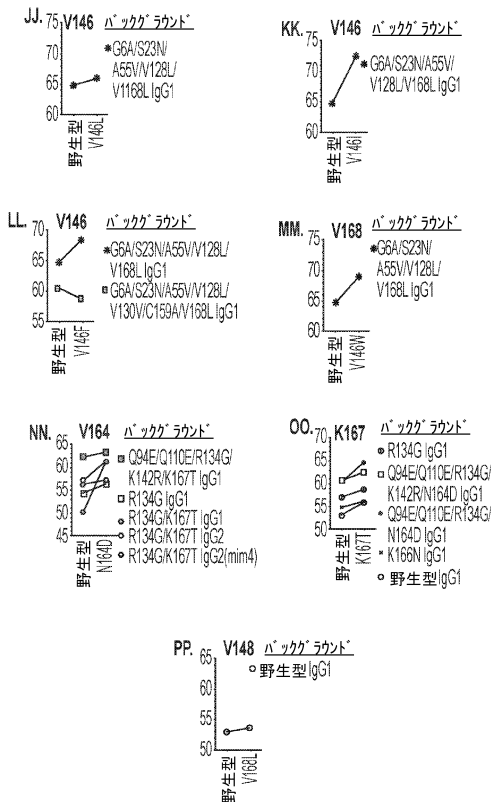
30

40

50

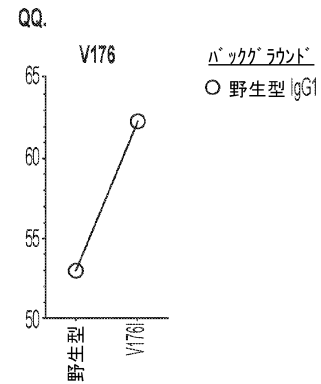
【図 6 - 6】

FIGURE 6, 続き



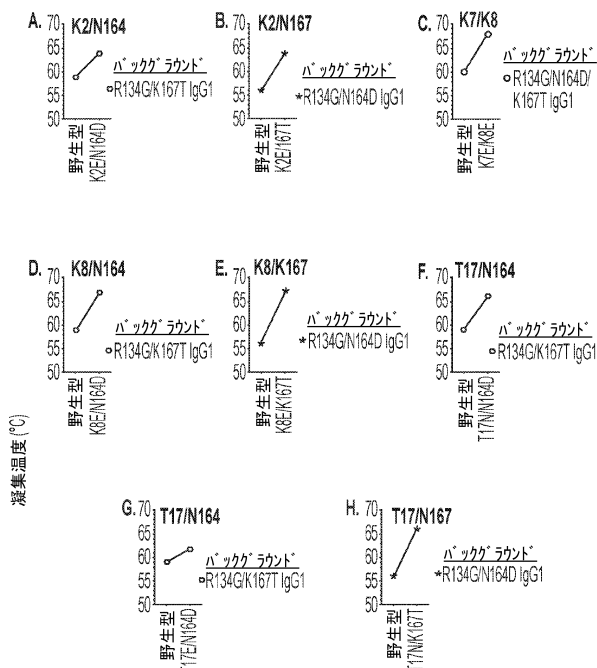
【図 6 - 7】

FIGURE 6, 続き



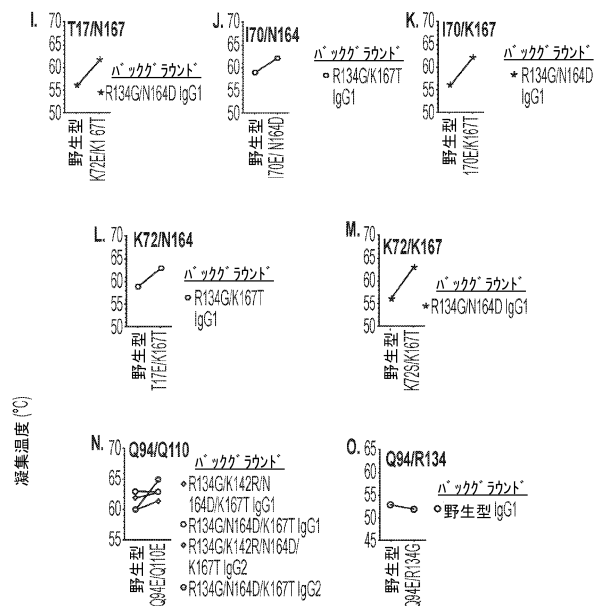
【図 7 - 1】

FIGURE 7



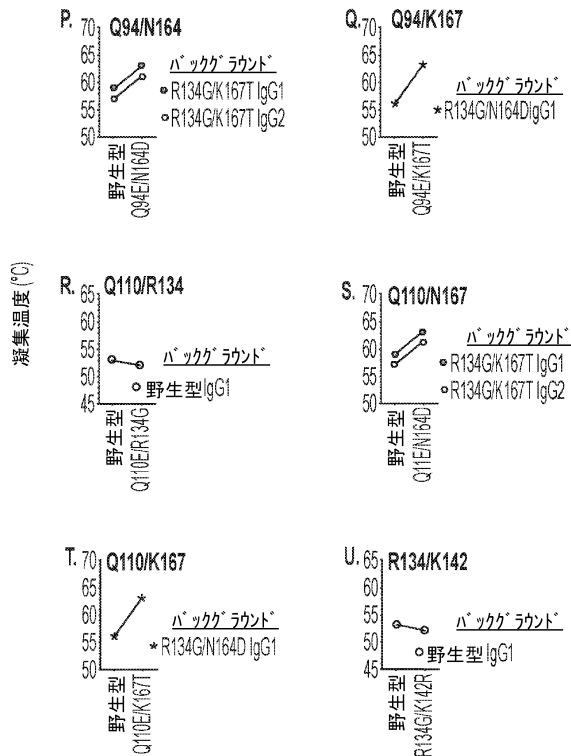
【図 7 - 2】

FIGURE 7, 続き



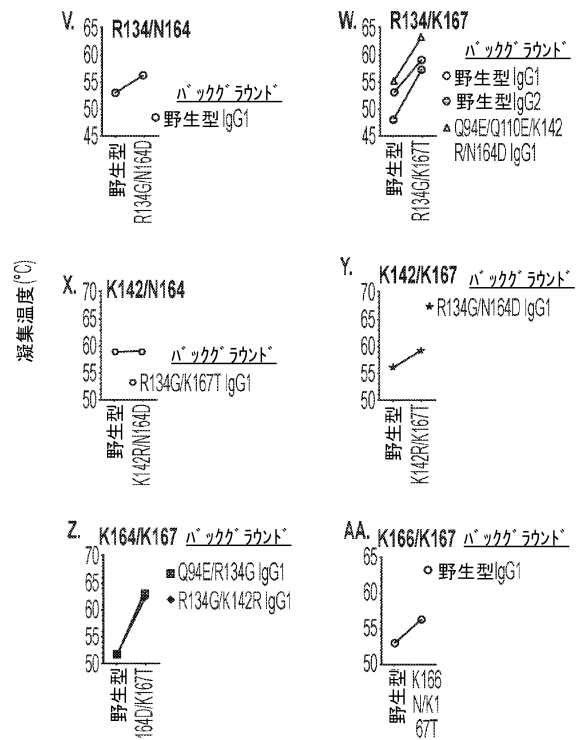
【図 7 - 3】

FIGURE 7, 続き



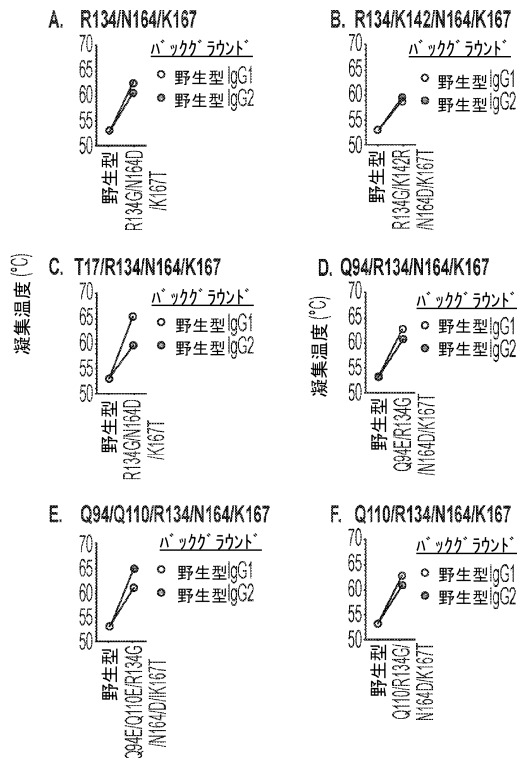
【図 7 - 4】

FIGURE 7, 続き



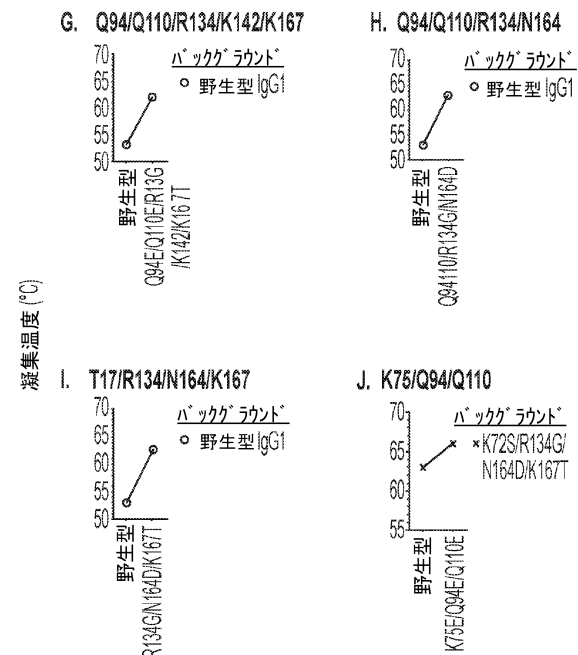
【図 8 - 1】

FIGURE 8



【図 8 - 2】

FIGURE 8, 続き



10

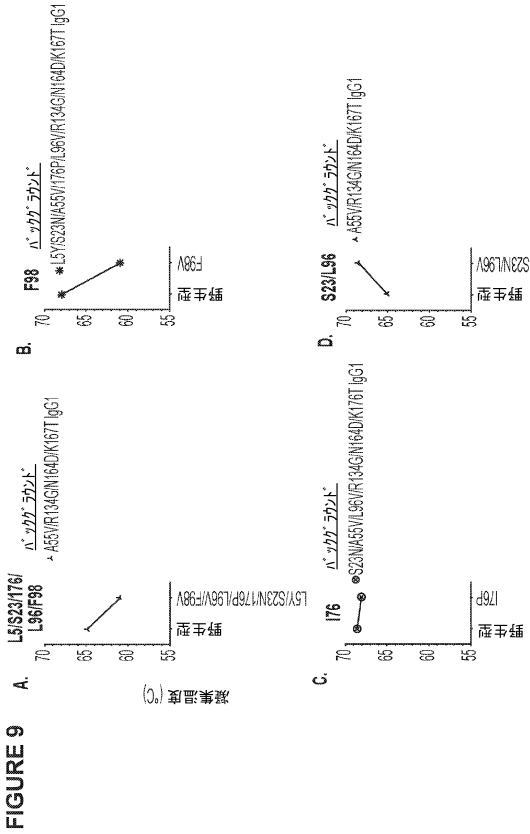
20

30

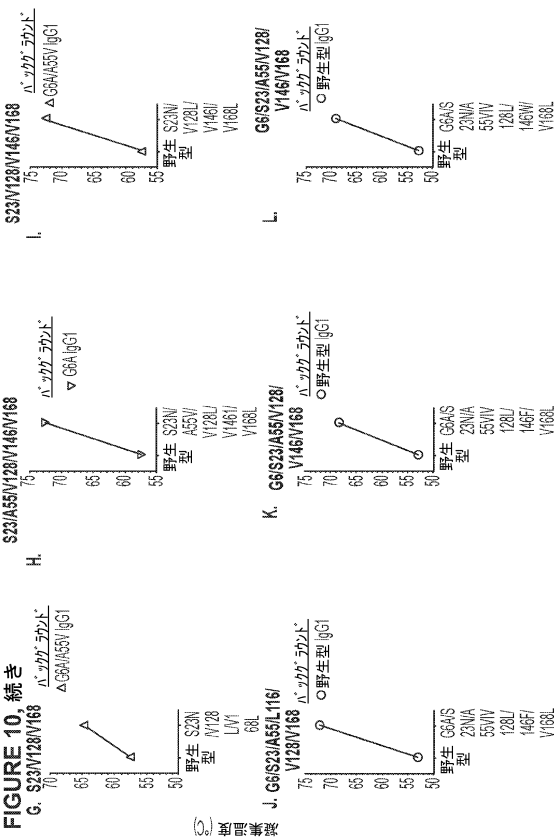
40

50

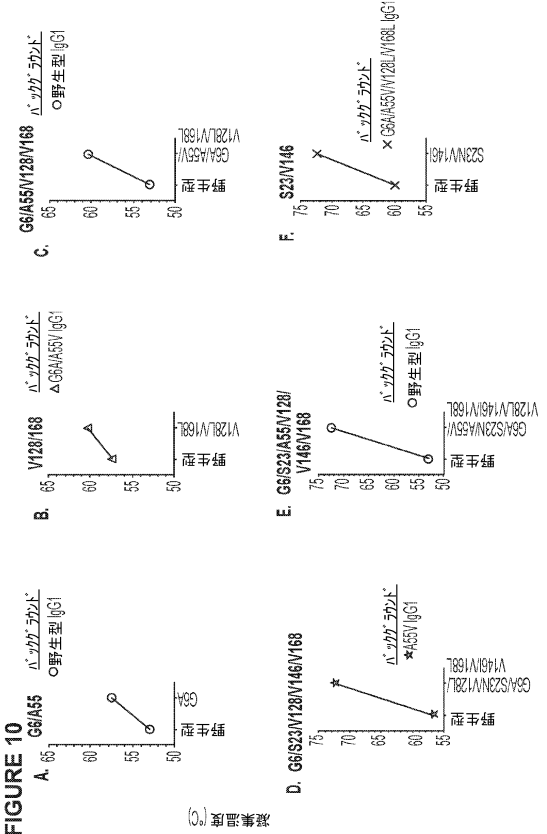
【図 9】



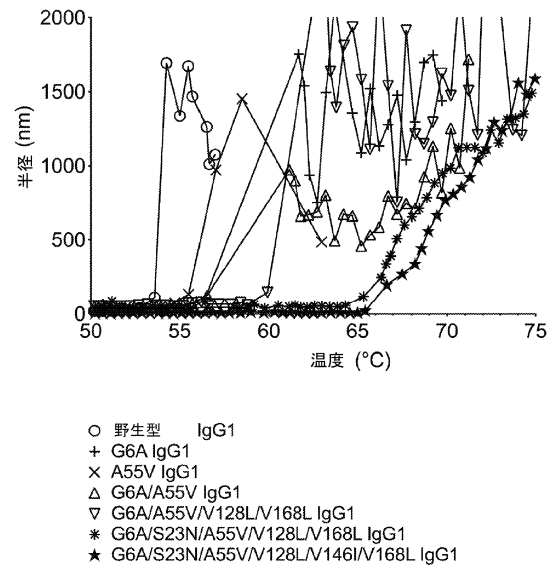
【図 10 - 2】



【図 10 - 1】



【図 11】
FIGURE 11



10

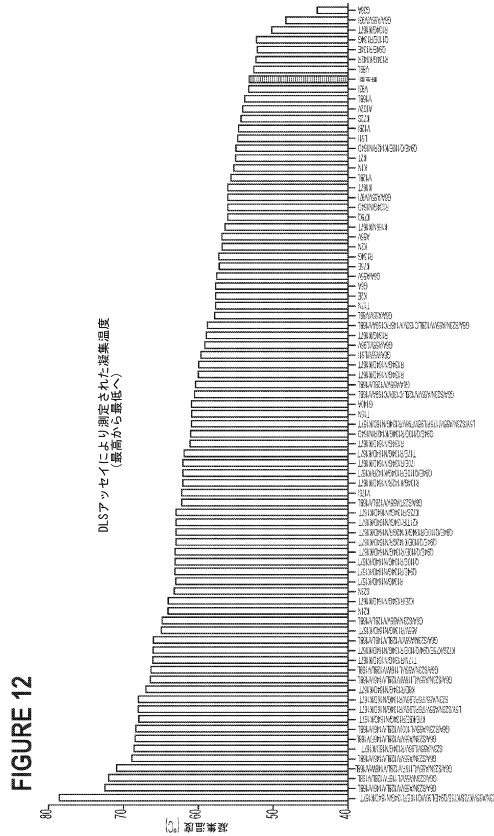
20

30

40

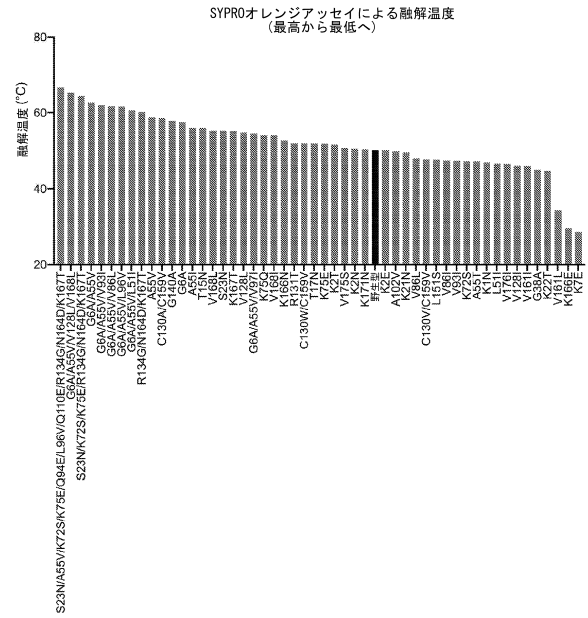
50

【図 1 2】



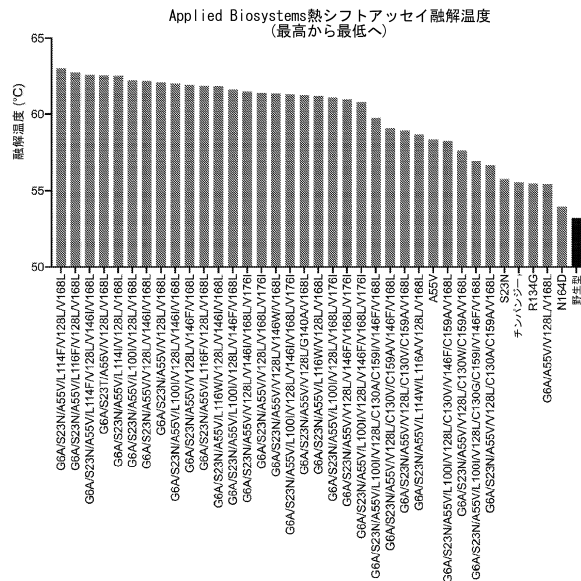
【図 1 3】

FIGURE 13



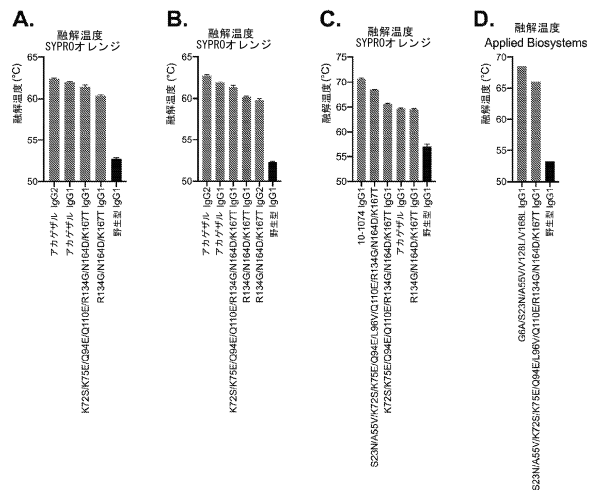
【図 1 4】

FIGURE 14



【図 1 5】

FIGURE 15



10

20

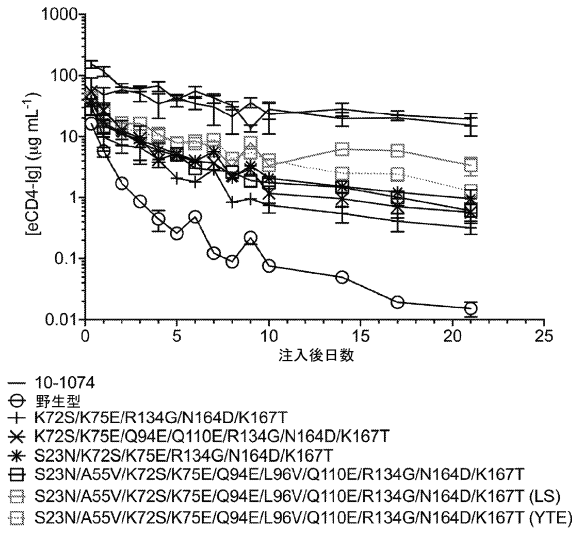
30

40

50

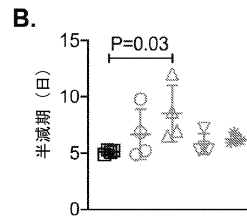
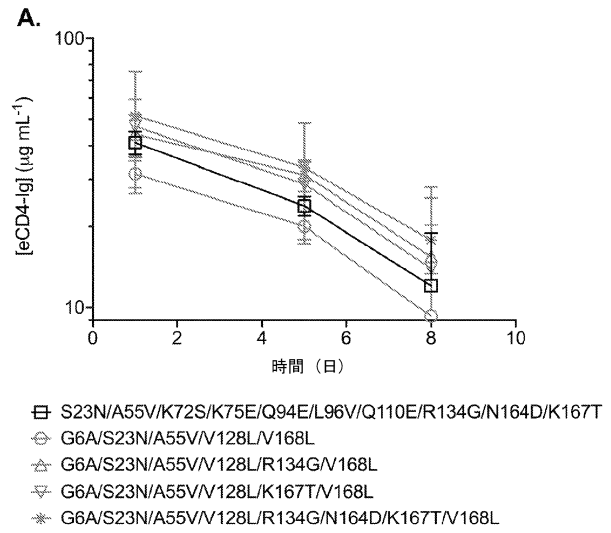
【図 19】

FIGURE 19



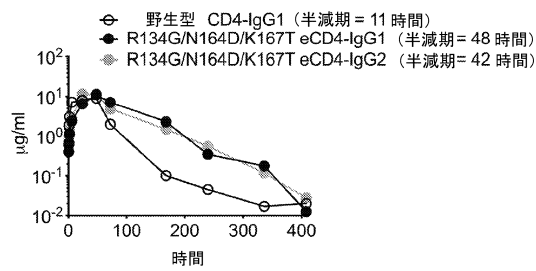
【図 20】

FIGURE 20



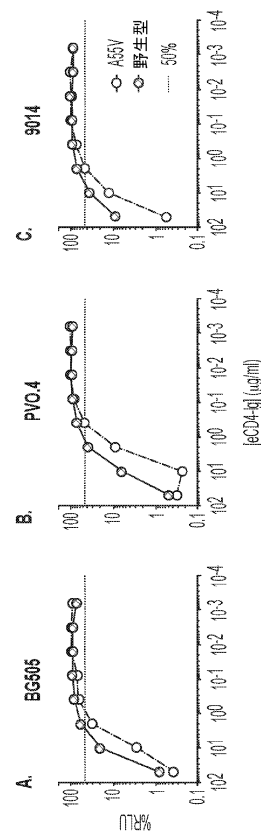
【図 21】

FIGURE 21



【図 22】

FIGURE 22



10

20

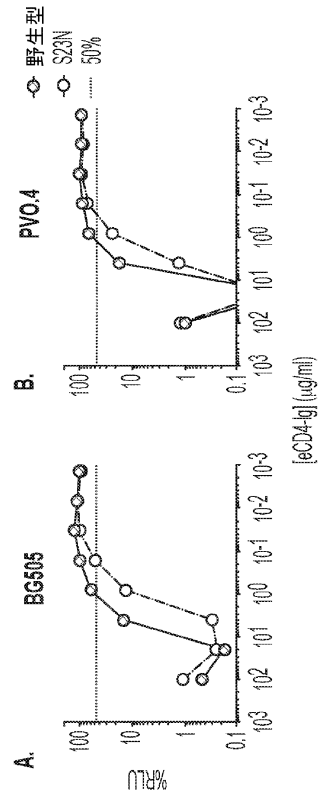
30

40

50

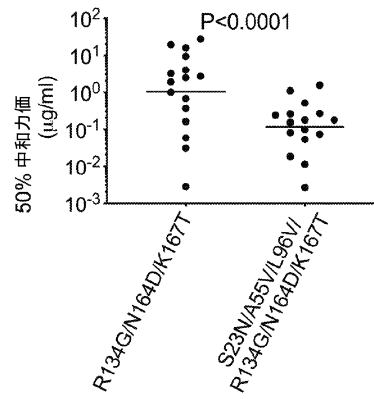
【図 2 3】

FIGURE 23



【図 2 4】

FIGURE 24

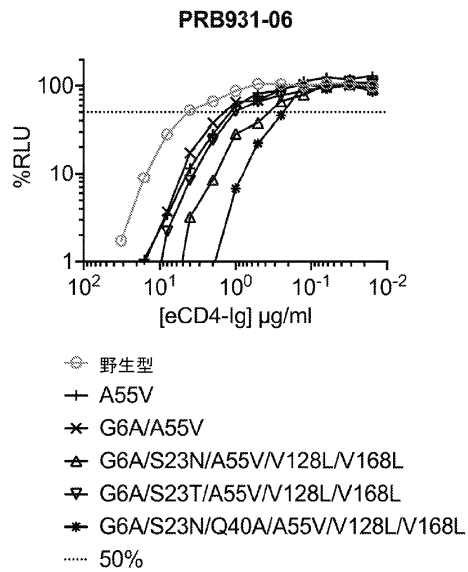


10

20

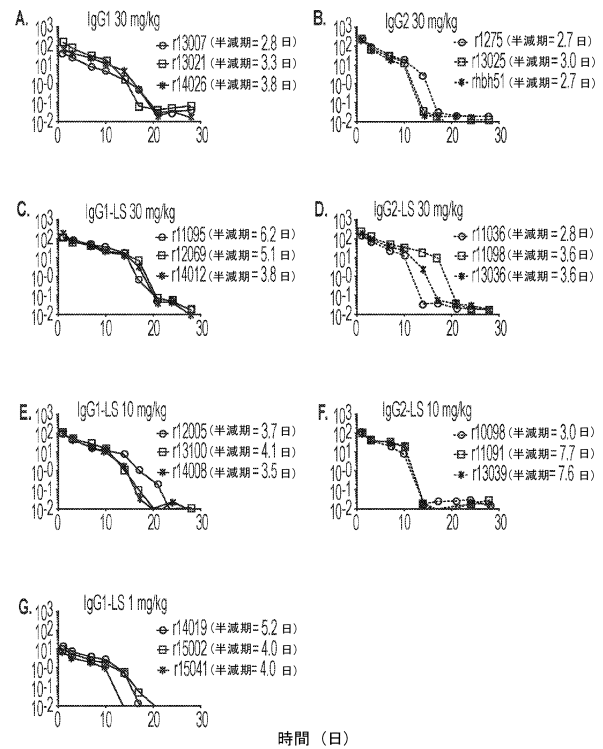
【図 2 5】

FIGURE 25



【図 2 6】

FIGURE 26



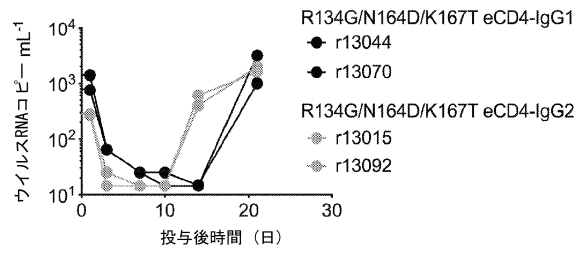
30

40

50

【図 27】

FIGURE 27



10

【配列表】

0007490632000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/62 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)
C 1 2 N 15/49 (2006.01)
C 1 2 N 15/864 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
A 6 1 K 38/02 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 P 31/18 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/62 Z
C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 15/49
C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
A 6 1 K 38/02
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 43/00 1 2 1

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ファーザン, マイケル

アメリカ合衆国、3 3 4 0 8・フロリダ、ジュノ・ビーチ・アパートメント・1 0 0 3、オーシャ
ン・ドライブ・8 0 0

(72)発明者 ガードナー, マシュー

アメリカ合衆国、3 3 4 5 8・フロリダ、ジュピター・ナンバー・3 0 3、ブライザ・ウェイ・1
1 5

(72)発明者 フェッツァー, アイナ

アメリカ合衆国、3 3 4 1 8・フロリダ、パーム・ビーチ・ガーデンズ・マートルウッド・サーク
ル・イースト・1 2 1 1

(72)発明者 アルパート, マイケル

アメリカ合衆国、ジュピター・ピア・デル・ソル・1 4 8 3

(72)発明者 ベイリー, チャールズ

アメリカ合衆国、ジュピター・ナンバー・3 0 3、ユニバーシティ・ブルバード・8 1 1

審査官 松井 一泰

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 4 0 4 0 5 (U S , A 1)

国際公開第 2 0 1 4 / 1 5 0 7 4 8 (W O , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 2 4 7 7 3 4 (U S , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

C12N 15/00-15/90

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)

UniProt/GeneSeq