

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-504107
(P2019-504107A)

(43) 公表日 平成31年2月14日(2019.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40 ZNA	4B064
C07K 16/10 (2006.01)	C07K 16/10	4C084
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 S	4C085
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4H045
A61P 35/00 (2006.01)	A61K 39/395 P	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-543026 (P2018-543026)
 (86) (22) 出願日 平成28年11月2日 (2016.11.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年4月27日 (2018.4.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/060134
 (87) 国際公開番号 W02017/079314
 (87) 国際公開日 平成29年5月11日 (2017.5.11)
 (31) 優先権主張番号 62/249,868
 (32) 優先日 平成27年11月2日 (2015.11.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 518150426
 シン バイオテクノロジー、エルエルシー
 アメリカ合衆国 33558 フロリダ、
 ルッツ、リュ ボルドルー 4708
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 シン、シュナンダ
 アメリカ合衆国 33558 フロリダ、
 ルッツ、リュ ボルドルー 4708
 Fターム(参考) 4B064 AG01 AG26 AG27 CA02 CA10
 CA19 CA20 CA21 CC24 DA01

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内抗原に対して向けられた単一ドメイン抗体

(57) 【要約】

本発明は、外因性標的化配列または化学組成物を使用することなく状態または疾患を治療するための組成物および方法を提供する。本発明は、状態または疾患を引き起こす標的に対して向けられた単一ドメイン抗体 (s d A b)、s d A bを含むタンパク質およびポリペプチドに関する。本発明はまた、s d A b、s d A bを含むタンパク質およびポリペプチド、ならびに組成物を含む。本発明は、予防、治療または診断目的のための組成物、s d A b、およびs d A bをコードする核酸の使用を含む。

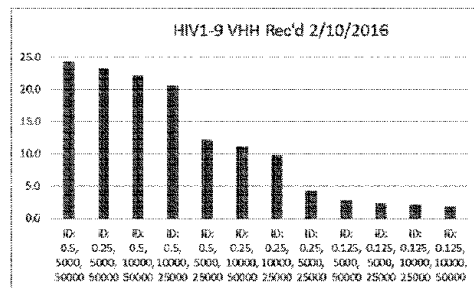


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (H I V - 1) 逆転写酵素単一ドメイン抗体 (s d A b)

【請求項 2】

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

【請求項 3】

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

10

【請求項 4】

前記対象が哺乳動物である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

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

【請求項 7】

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

【請求項 8】

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

20

【請求項 9】

配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のポリペプチドに対して向けられた抗体。

【請求項 11】

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

30

a) 配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの 1 つまたは複数のドメインに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を作製するステップと；

b) 前記対象から試料を得るステップと；

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

d) 前記対象の s d A b の量を定量化するステップと

を含む方法。

40

【請求項 12】

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

【請求項 13】

抗エボラ V P 2 4 単一ドメイン抗体 (s d A b) 。

【請求項 14】

配列番号 5 5 に示されるアミノ酸配列を含む抗エボラ V P 2 4 s d A b 。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 に記載の抗エボラ V P 2 4 s d A b を用いて、対象の疾患を治療、疾患の発症を予防、または疾患の再発を予防する方法であって、有効量の前記抗エボ

50

ラVP24 sdAbを、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法。

【請求項16】

前記対象が哺乳動物である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記哺乳動物がヒトである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

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

【請求項19】

前記1種または複数の化合物が抗ウイルス化合物である、請求項18に記載の方法。

10

【請求項20】

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

【請求項21】

配列番号55に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項22】

請求項21に記載のポリペプチドに対して向けられた抗体。

【請求項23】

対象由来の試料中の抗エボラVP24 sdAbのレベルを測定する方法であって、
 a) 配列番号55に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの1つまたは複数のドメインに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を作製するステップと；
 b) 前記対象から試料を得るステップと；
 c) 前記マウスモノクローナル抗体および前記試料を用いて定量的イムノアッセイを行って、対象のsdAbの量を決定するステップと；
 d) 前記対象のsdAbの量を定量化するステップと
 を含む方法。

20

【請求項24】

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

30

【請求項25】

抗アラキドン酸12-リポキシゲナーゼ(ALOX12)単ドメイン抗体(sdAb)。

【請求項26】

配列番号49、配列番号50、配列番号51または配列番号52に示されるアミノ酸配列を含む抗ALOX12 sdAb。

【請求項27】

請求項25または26に記載の抗ALOX12 sdAbを用いて、対象の疾患を治療、疾患の発症を予防、または疾患の再発を予防する方法であって、有効量の前記抗ALOX12 sdAbを、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法。

40

【請求項28】

前記対象が哺乳動物である、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記哺乳動物がヒトである、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記抗ALOX12 sdAbが1種または複数の化合物と組み合わせて投与される、請求項27に記載の方法。

【請求項31】

50

有効量の前記抗 A L O X 1 2 s d A b を、それを必要とする対象に投与することが、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、経腸投与、非経口投与、眼内投与、皮下投与、経皮投与、点眼剤として投与、鼻スプレーとして投与、吸入または噴霧によって投与、局所投与および埋め込み可能な薬物として投与を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 2】

配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1 または配列番号 5 2 に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載のポリペプチドに対して向けられた抗体。

【請求項 3 4】

対象由来の試料中の抗 A L O X 1 2 s d A b のレベルを測定する方法であって、
 a) 配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1 または配列番号 5 2 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの 1 つまたは複数のドメインに対して向けられたマウスモノクローナル抗体を作製するステップと；
 b) 前記対象から試料を得るステップと；
 c) 前記マウスモノクローナル抗体および前記試料を用いて定量的イムノアッセイを行って、対象の s d A b の量を決定するステップと；
 d) 前記対象の s d A b の量を定量化するステップと
 を含む方法。

10

【請求項 3 5】

前記定量的イムノアッセイが、酵素結合免疫吸着測定 (E L I S A)、特異的分析物標識および再捕捉アッセイ (S A L R A)、液体クロマトグラフィー、質量分析、蛍光活性化セルソーティングまたはこれらの組み合わせを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この P C T 国際特許出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる 2 0 1 5 年 1 1 月 2 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 2 4 9 8 9 8 号の利益を主張する。

30

【0002】

配列表

本出願は、ハードコピーの代わりにテキストフォーマットで配列リストと一緒に提出している。配列表は、2 0 1 6 年 1 0 月 2 7 日に作成された「s e q u e n c e l i s t i n g . t x t」という表題のファイルとして提供され、サイズが 5 8 キロバイトである。配列表の電子フォーマットの情報は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

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

40

【0004】

ヌクレオチドおよびタンパク質などの異常な細胞内または膜貫通成分によって引き起こされるウイルス感染症またはがんなどのいくつかの疾患または状態が存在する。異常な成

50

分の排除を使用して、疾患または状態を予防または治療することができる。このような疾患の治療に利用可能なくつかの薬理的化合物が存在するが、これらの化合物は、非罹患細胞に対して効果がない、送達不能である、または毒性であり得る。

【0005】

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

【0006】

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

【0007】

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

【発明の概要】

【0008】

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

【0009】

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

【0010】

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

【0011】

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

10

【0012】

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

【0013】

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

20

【0014】

本発明のさらに別の実施形態は、抗アラキドン酸12-リボキシゲナーゼ(ALOX12)sdAbに関する。一態様では、抗ALOX12 sdAbが、配列番号49、配列番号50、配列番号51または配列番号52に示されるアミノ酸配列を含む。本発明はまた、有効量の抗ALOX12 sdAbを、それを必要とする対象に投与することによって、抗ALOX12 sdAbを用いて、対象の疾患を治療、疾患の発症を予防、または疾患の再発を予防する方法を含む。対象は、ヒトなどの哺乳動物であり得る。抗ALOX12 sdAbは、1種または複数の化合物と組み合わせて投与することができる。有効量の抗ALOX12 sdAbを、それを必要とする対象に投与することは、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、直腸投与、経腸投与、非経口投与、眼内投与、皮下投与、経皮投与によることができ、点眼剤として投与され、鼻スプレーとして投与され、吸入または噴霧によって投与され、局所投与され、埋め込み可能な薬物として投与され得る。

30

【0015】

別の実施形態では、本発明は、配列番号49、配列番号50、配列番号51または配列番号52に示されるアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドに関する。別の実施形態では、本発明は、配列番号49、配列番号50、配列番号51または配列番号52のポリペプチドに対して向けられた抗体を含む。

40

【0016】

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

50

【0017】

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

【図面の簡単な説明】

【0018】

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【発明を実施するための形態】

【0019】

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

【0020】

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

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

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

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

10

20

30

40

50

【0024】

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

【0025】

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

【0026】

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

【0027】

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

【0028】

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

【0029】

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

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

【0030】

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

【0031】

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

10

【0032】

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

20

【0033】

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

【0034】

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

30

40

50

【0035】

「合成」という用語は、インビトロの化学的または酵素的合成による作製を指す。

【0036】

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

【0037】

本明細書で使用される「治療用組成物」は、医薬組成物、遺伝物質、生物製剤および他の物質などの治療効果を有することが意図される物質を意味する。遺伝物質には、遺伝的ベクター、遺伝子調節要素、遺伝子構造要素、DNA、RNAなどの直接的または間接的遺伝子治療効果を有することが意図された物質が含まれる。生物製剤には、生物である、または治療効果を有することが意図された生物由来の物質が含まれる。

10

【0038】

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

20

【0039】

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

30

【0040】

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

【0041】

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

40

【0042】

50

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

【0043】

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

10

【0044】

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

20

【0045】

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

30

【0046】

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

【0047】

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

40

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

50

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

【0051】

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

10

【0052】

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

【0053】

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

【0054】

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

20

【0055】

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

30

【0056】

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

【0057】

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

40

50

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

【0058】

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

10

【0059】

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

【0060】

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

20

【0061】

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

30

40

【0062】

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

50

9～11年と推定される。

【0063】

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

10

【0064】

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

【0065】

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

20

【0066】

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

30

【0067】

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

【0068】

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

40

【0069】

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

50

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

【0070】

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

10

20

【0071】

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

30

【0072】

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

40

【0073】

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

50

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

【0074】

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

10

【0075】

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

20

30

【0076】

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

40

【0077】

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

50

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

【0078】

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

10

【0079】

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

20

【0080】

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

30

【0081】

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

40

50

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

【0082】

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

10

【0083】

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

20

【0084】

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

30

【0085】

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

40

【0086】

50

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

10

【 0 0 8 7 】

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

20

【 0 0 8 8 】

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

30

【 0 0 8 9 】

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

40

【 0 0 9 0 】

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

50

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

【0091】

10

抗HIV-1 RT sdAbのアミノ酸配列を以下に示す：

【0092】

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

【0093】

HIV1-2 (配列番号26) : QVQLVESGGGSVQAGDSLRLSCAA
 SGNTASRFSGMGWFRQAPGKEREGVA AISAGGLTYADS
 VKGRFTISRDN AKNTLYLDMNRLKPEDTAMY YCAA AISDRM
 TGIQALAA LPR LRPEDYGNWGQGT LVT VSS

20

【0094】

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

【0095】

HIV1-16 (配列番号28) : QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAA
 ASGNTYSSSY CMGWFRQAPGKDREGVARIFTRSGTTYA
 DSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNS LKPEDA AMY YCAA AQG
 GACISFTSFAKNFVYRGQGT LVT VSS

30

【0096】

HIV1-27 (配列番号29) : EVQLGESGGGSVQAGGSLRLSCAA
 ASVYSYTTNCM MGWFRQAPGKEREGVAVIY SAGGLTYAD
 SVKGRFTISQDNGKNTVYLTMNRLKPEDTAMY YCAA KRWC
 SSWNRGEEYNYWGQGTQVTVSS

【0097】

HIV1-30 (配列番号30) : QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAA
 ASVYSYNTN CMGWFRQAPGKEREGAAVIYAAGGLTYAD
 SVKGRFTISQENKNTVYLTMNRLKPEDTAMY YCAA KRWC
 SSWNRGEEYNYWGQGTQVTVSS

40

【0098】

HIV1-21 (配列番号31) : EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK
 ASGYTYNSR VDIRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT
 YYADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KPEDTAMY YCAL
 SDRFAAQVPARYGIRPSDYN YWGE GTQVTVSS

【0099】

HIV1-4 (配列番号32) : HVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKA
 SGYTYNSR VDIRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTY
 YADSVKGRFTISQDNAKNTVY LQMNAL KPEDTAMY YCAL S

50

DRFAAQVPARYGIRPSDYNWYWGEGTLVTVSS

【0100】

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

【0101】

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

10

【0102】

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

【0103】

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

20

【0104】

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

【0105】

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

30

【0106】

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

【0107】

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

40

【0108】

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

【0109】

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

50

SDRFAAQVPARYGIRPSDYDYWGEGLVTVSS

【0110】

HIV1-39(配列番号43):EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCK
ASGYTYSNRVD I RSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVT
YYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNA LKPEDTAMYYCAL
SDRFAAQVPTRYGIRPSDYNWYGQGTQVTVSS

【0111】

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

10

【0112】

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

20

【0113】

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

【0114】

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

30

【0115】

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

【0116】

ラクダの免疫化に使用した組換えALOX12タンパク質配列(配列番号44)は:
MGRYRIRVATGAWLFSGSYNRVQLWLVGTRGEAELELQL
RPARGE E E E F D H D V A E D L G L L Q F V R L R K H H W L V D D A W F C D
RITVQGP G A C A E V A F P C Y R W V Q G E D I L S L P E G T A R L P G D N
A L D M F Q K H R E K E L K D R Q Q I Y C W A T W K E G L P L T I A A D R K D D
L P P N M R F H E E K R L D F E W T L K A G A L E M A L K R V Y T L L S S W N C
L E D F D Q I F W G Q K S A L A E K V R Q C W Q D D E L F S Y Q F L N G A N P M
L L R R S T S L P S R L V L P S G M E E L Q A Q L E K E L Q N G S L F E A D F I
L L D G I P A N V I R G E K Q Y L A A P L V M L K M E P N G K L Q P M V I Q I Q
P P N P S S P T P T L F L P S D P P L A W L L A K S W V R N S D F Q L H E I Q Y

40

50

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

であった。

【0117】

10

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

【0118】

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

20

【0119】

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

30

【0120】

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

40

【0121】

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

50

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

【0122】

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

【0123】

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

10

【0124】

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

【0125】

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

20

【0126】

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

【0127】

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

30

【0128】

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

40

【0129】

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

【0130】

50

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

【0131】

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

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

であった。

【0132】

免疫化の結果として、1つの抗VP24 sdAb、VP24__5が得られ、これをVP24との結合についてスクリーニングした。VP24__5のDNA配列（配列番号54）は：

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

である。

【0133】

VP24__5 sdAbのアミノ酸配列（配列番号55）を以下に示し、CDRに下線を付した：

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

【0134】

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

【実施例】

10

20

30

40

50

【0135】

実施例1：SDABの作製

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

【0136】

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

10

【0137】

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

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

20

【0138】

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

30

【0139】

タンパク質結合実験の陰性対照は抗STAT3 sdAbであった、VHH14（配列番号56）：QVQLVESGGGSVQAGGSLRRLSCVASTYTGCMGWF
RQAPGKEREGVAALSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVK
NAVYLMNTVKPEDAAMYCYCAAREGWECGETWLDRTAGGH
TYWGGQGLVTVSS

【0140】

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

40

【表 1】

表 1

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

10

【 0 1 4 1 】

最高分析物濃度の2倍系列希釈の表2に示される分析物濃度で完全な速度論的分析を行った。HIV1-9抗RT sdAbは、HIV-1とエボラVP24分析物の両方に結合した。

【表 2】

表 2

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

20

30

【 0 1 4 2 】

実施例3：HIV1-9(配列番号27)SDABはELISAでHIV-1逆転写酵素に結合する

HIV1-9抗HIV-1 RT sdAb(配列番号27)の2つの異なる試料を、ELISAにおいて、コーティング抗原、二次抗体およびHRP濃度のチェッカーボードに対して1μg/mLで評価した。コーティング抗原は、1ウェル当たり0.5、0.025および0.125μg/mLの組換えHIV-1 RT(Creative BioMart)(配列番号1)であった。二次抗体は1:5000および1:10000で希釈したビオチン化ウサギ抗ラマで、HRPは1:25000および1:50000で希釈した。シグナル対ノイズ比>20が濃度のいくつかで見られた。ELISAの結果を図1および図2に示す。

40

【 0 1 4 3 】

HIV1-9抗HIV-1 RT sdAb(配列番号27)の希釈系列(1μg/mL~0.0001μg/mL)を評価するために、3つの組み合わせを選択した。

【表 3】

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

【0144】

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

【0145】

実施例4: VP24-5 (配列番号55) S D A BはVP24に結合する

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

【表 4】

表 3

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

【0146】

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

【表 5】

表 4

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

【0147】

10

20

30

40

50

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

V P 2 4 - 5 抗エボラ V P 2 4 s d A b (配列番号 5 5) の 2 つの異なる試料を、E L I S A において、コーティング抗原、二次抗体および H R P 濃度のチェッカーボードに対して $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で評価した。コーティング抗原は、1 ウェル当たり 0.5、0.025 および $0.125 \mu\text{g}/\text{mL}$ の組換えエボラ V P 2 4 (C r e a t i v e B i o M a r t) (配列番号 5 3) であった。二次抗体は 1 : 5 0 0 0 および 1 : 1 0 0 0 0 で希釈したビオチン化ウサギ抗ラマであった。H R P を 1 : 1 0 0 0 0 および 1 : 2 5 0 0 0 の希釈で使用した。E L I S A の結果を図 5 および図 6 に示す。シグナル対ノイズ比は低く、分析を高濃度で繰り返した。

10

【 0 1 4 8 】

1 および $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の V P 2 4 - 5 抗エボラ V P 2 4 s d A b (配列番号 5 5) を用いて E L I S A を繰り返した。組換え V P 2 4 (配列番号 5 3) を 1 ウェル当たり 0.5 または $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のいずれかで使用した。二次抗体は 1 : 1 0 0 0、1 : 4 0 0 0、1 : 1 0 0 0 0 および 1 : 1 0 0 0 0 で希釈したビオチン化ウサギ抗ラマであった。H R P を 1 : 2 5 0 0 0 および 1 : 5 0 0 0 0 の希釈で使用した。E L I S A の結果を図 7 および 8 に示す。

【 0 1 4 9 】

V P 2 4 - 5 抗エボラ V P 2 4 s d A b (配列番号 5 5) の希釈系列 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $0.0001 \mu\text{g}/\text{mL}$) を評価するために、3 つの組み合わせを選択した。

20

【表 6】

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

【 0 1 5 0 】

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

30

【 0 1 5 1 】

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

【配列表フリーテキスト】

【 0 1 5 2 】

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

40

【 図 1 】

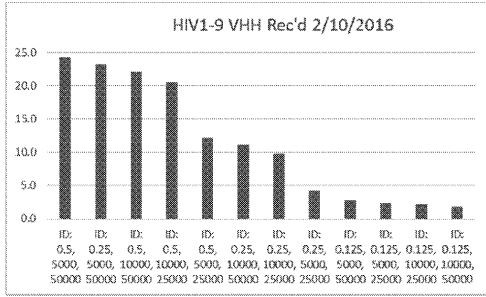


FIG. 1

【 図 2 】

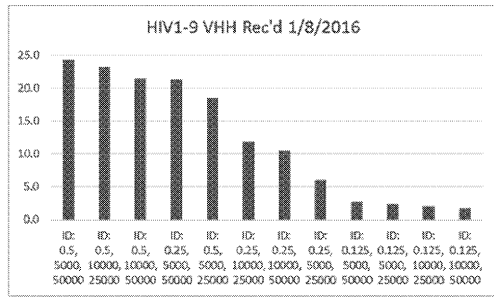
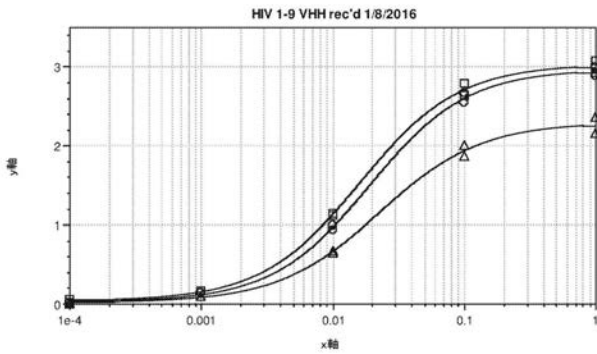


FIG. 2

【 図 4 】



4-PFit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ 標準(0.5/10/25 HIV1-9 1/8/16: 濃度 対 V...	0.0231	1.17	0.0191	2.97	0.999
□ 標準(0.5/5/50 HIV1-9 1/8/16: 濃度 対 Val...	0.0344	1.16	0.0161	3.03	0.998
△ 標準(0.5/10/50 HIV1-9 1/8/16: 濃度 対 Va...	0.0153	1.13	0.0227	2.29	0.997

【 図 5 】

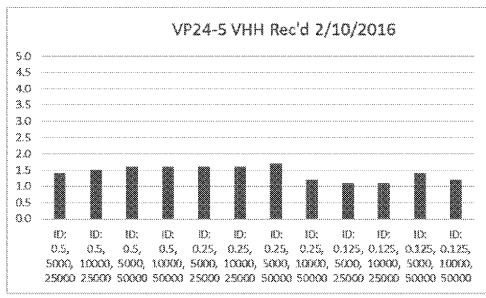
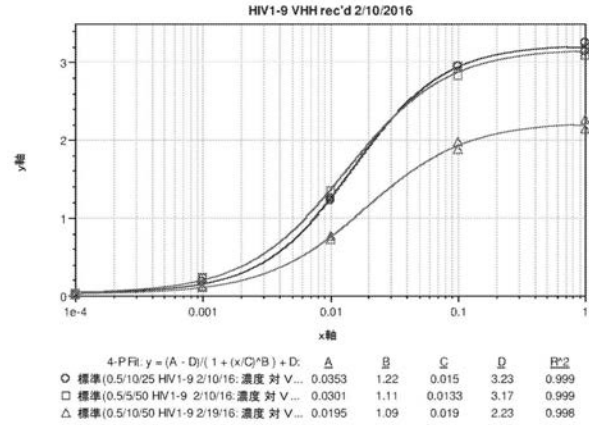


FIG. 5

【 図 3 】



【 図 6 】

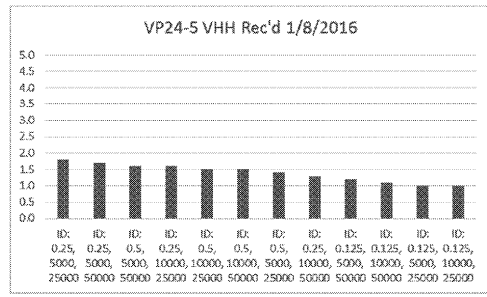


FIG. 6

【 図 7 】

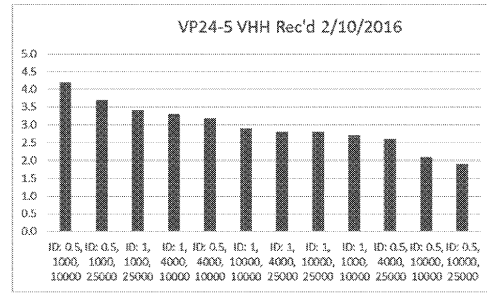


FIG. 7

【 図 8 】

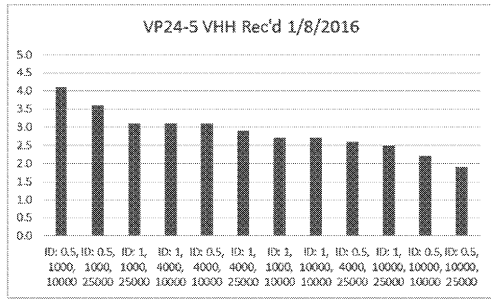
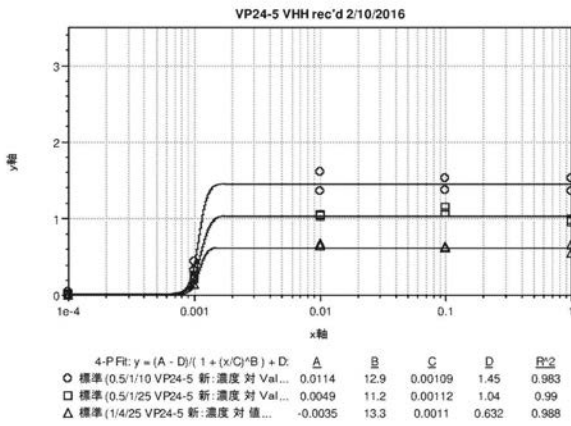
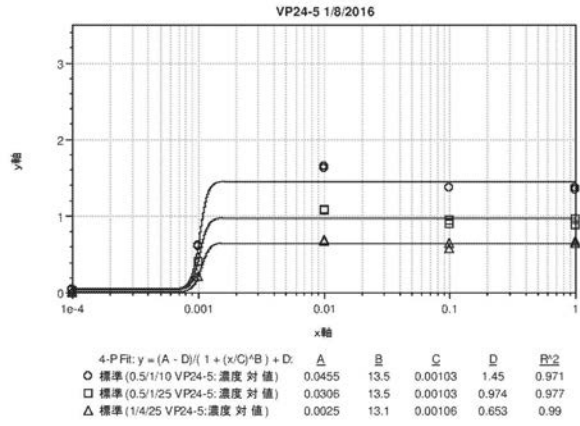


FIG. 8

【 図 9 】



【 図 10 】



【 配列表 】

2019504107000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US16/60134
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C07K 16/10; A61K 39/42, 39/395, 38/55; G01N 33/68, 33/563, 33/53; A61P 31/18 (2017.01) CPC - C07K 16/1045, 16/1036, 16/10; A61K 39/42, 39/395, 38/55; G01N 33/6857, 33/6854, 33/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2006/0147987 A1 (RAMAKRISHNAN, V) July 6, 2006; paragraphs [0037], [0092], [0099], [0136]-[0138], [0188], [0190]; claims 1, 3, 24-26	1, 3/1, 4/3/1, 5/4/3/1, 6/3/1, 8/3/1 7/6/3/1
Y	US 2015/0274813 A1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY, et al.) October 1, 2015; paragraphs [0011], [0016]-[0018], [0099]; claim 10	7/6/3/1
A	WO 2011/051327 A2 (NOVARTIS AG) May 5, 2011; SEQ ID NO: 2; paragraph [0080]	2, 3/2, 4/3/2, 5/4/3/2, 6/3/2, 7/6/3/2, 8/3/2, 9-12, 14, 15/14, 16/15/14, 17/16/15/14, 18/15/14, 19/18/15/14, 20/14, 21-24, 26, 27/26, 28/27/26, 29/28/27/26, 30/27/26, 31/27/26, 32-35
A	US 2005/0048060 A1 (REVETS, H et al) March 3, 2005; SEQ ID NO: 5; paragraph [0041]	2, 3/2, 4/3/2, 5/4/3/2, 6/3/2, 7/6/3/2, 8/3/2, 9-12
A	US 2005/0037421 A1 (HONDA, T et al.) February 17, 2005; SEQ ID NO: 33; paragraph [0388]	2, 3/2, 4/3/2, 5/4/3/2, 6/3/2, 7/6/3/2, 8/3/2, 9-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 April 2017 (06.04.2017)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">25 APR 2017</div>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/60134

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/086276 A2 (SELECTIVE GENETICS, INC.) October 23, 2003; page 4, lines 8-10; page 5, lines 25-27; page 6, lines 11-13; page 57, lines 23-27; page 62, lines 1-10; page 66, lines 1-5, 29-30 and 34-35; claims 11, 12, 27, 39;	13, 15/13, 16/15/13, 17/16/15/13, 18/15/13, 19/18/15/13
Y	US 2005/0112699 A1 (SUTOVSKY, P et al.) May 26, 2005; paragraphs [0007], [0014], [0036], [0038]-[0039], [0068], [0070], [0072]; claims 1, 8, 24, 27	25, 27/25, 28/27/25, 29/28/27/25, 30/27/25, 31/27/25
Y	US 2010/0196902 A1 (PESTANO, G et al.) August 5, 2010; paragraphs [0104], [0130]).	25, 27/25, 28/27/25, 29/28/27/25, 30/27/25, 31/27/25
A	US 2011/0091446 A1 (De STROOPER, B et al.) April 21, 2011; Nanobody B10 (Nb_B10); paragraph [0019];	14, 15/14, 16/15/14, 17/16/15/14, 18/15/14, 19/18/15/14, 20/14, 21-24
A	WO 2009/150539 A2 (INSTITUT PASTEUR et al.) December 17, 2009; NbAahl19; page 5, line 5;	14, 15/14, 16/15/14, 17/16/15/14, 18/15/14, 19/18/15/14, 20/14, 21-24
A	US 2011/0172396 A1 (BORGES, E et al.) July 14, 2011; DLLBI104G01; paragraph [0353]	26, 27/26, 28/27/26, 29/28/27/26, 30/27/26, 31/27/26, 32-35
A	US 2010/0166734 A1 (DOLK, E et al.) July 1, 2010; VHH antibody, 4_e111; Table D-1;	26, 27/26, 28/27/26, 29/28/27/26, 30/27/26, 31/27/26, 32-35
A	US 2010/0136584 A1 (BHATT, RS et al.) June 3, 2010; entire document	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 5/4/3/1-2, 6/3/1-2, 7/6/3/1-2, 8/3/1-2, 9-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/60134

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

-Please See Supplemental Page-

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US16/60134

-***-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-12 are directed toward an anti-HIV-1 reverse transcriptase sdAb comprising SEQ ID NO: 27; a method of treating a disease, preventing development of a disease, or preventing recurrence of a disease in a subject using said sdAb; an isolated polypeptide comprising SEQ ID NO:27; an antibody directed toward said polypeptide; and a method of measuring the levels of an anti-HIV-1 reverse transcriptase sdAb in a sample from a subject.

Group II, Claims 13-24 are directed toward an anti-Ebola VP24 sdAb comprising SEQ ID NO: 55; a method of treating a disease, preventing development of a disease, or preventing recurrence of a disease in a subject using said sdAb; an isolated polypeptide comprising SEQ ID NO:55; an antibody directed toward said polypeptide; and a method of measuring the levels of an anti-Ebola VP24 sdAb in a sample from a subject.

Groups III+, Claims 25-35; and SEQ ID NO: 49 (anti-ALOX12 sdAb) are directed toward an anti-ALOX12 sdAb comprising SEQ ID NO: 49; a method of treating a disease, preventing development of a disease, or preventing recurrence of a disease in a subject using said sdAb; an isolated polypeptide comprising in SEQ ID NO:49; an antibody directed toward said polypeptide; and a method of measuring the levels of an anti-ALOX12 sdAb in a sample from a subject.

The anti-ALOX12 sdAb can be searched to the extent that they comprise an amino acid sequence encompassing SEQ ID NO: 49 (first exemplary anti-ALOX12 sdAb sequence). Applicant is invited to elect additional anti-ALOX12 sdAb sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each sdAb, to be searched. Additional sdAb sequence(s) can be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 25, 28 (in-part), 27 (in-part), 28 (in-part), 29 (in-part), 30 (in-part), 31 (in-part), 32 (in-part), 33 (in-part), 34 (in-part), and 35 (in-part), encompass this first named invention of Groups III+ and thus these claims can be searched, with payment of a fee for the search of Groups III+, to the extent that they encompass SEQ ID NO: 49 (anti-ALOX12 sdAb sequence). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected sdAb sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) can result in only the first claimed invention of groups III+ to be searched/examined. An exemplary election would be an anti-ALOX12 sdAb comprising SEQ ID NO: 50 (first exemplary elected anti-ALOX12 sdAb sequence).

The inventions listed as Groups I, II, and III+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I include an anti-HIV-1 reverse transcriptase sdAb, which is not present in Groups II or III+; the special technical features of Group II includes an anti-Ebola VP24 sdAb, which is not present in any of Groups I or III+; the special technical features of Group III+ includes an anti-ALOX12 sdAb, which is not present in any of Groups I or II.

Groups I-III+ share the technical features including: a single domain antibody (sdAb); a method of treating a disease, preventing development of a disease, or preventing recurrence of a disease in a subject using said sdAb, the method comprising administering an effective amount of the sdAb to a subject in need thereof; an isolated polypeptide; an antibody directed toward the polypeptide; a method of measuring the levels a sdAb in a sample from a subject, the method comprising the steps of: a) generating a mouse monoclonal antibody directed against one or more domains of a polypeptide; b) obtaining a sample from the subject; c) performing a quantitative immunoassay with the mouse monoclonal antibody and the sample to determine the amount of sdAb in a subject; and d) quantifying the amount of sdAb in the subject.

No technical features are shared between the sbAb sequences of Groups I, II and III+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2012/007880 A2 (ABLYNX NV) (hereinafter 'Abylnx').

Abylnx discloses a single domain antibody (sdAb) (abstract); a method of treating a disease in a subject using said sdAb (a method of treating a disease in a subject using said sdAb; abstract; page 1 third paragraph), the method comprising administering an effective amount of the sdAb to a subject in need thereof (the method comprising administering an effective amount of the sdAb to a subject in need thereof; page 1, third paragraph; page 43, second paragraph); an isolated polypeptide (page 3, third paragraph); an antibody directed toward the polypeptide (an ELISA to detect SDAB-01 polypeptide; page 3, third paragraph; page 59, sixth paragraph); a method of measuring the levels a sdAb in a sample from a subject (ELISA (a method of measuring the levels a sdAb in a sample from a subject; page 13, sixth paragraph), the method comprising the steps of: a) generating a mouse monoclonal antibody directed against one or more domains of a polypeptide (a) generating a mouse monoclonal antibody directed against one or more domains of a polypeptide; page 30, sixth paragraph – page 37, first paragraph); b) obtaining a sample from the subject (b) obtaining a sample from the subject; page 34, third paragraph; page 59, sixth paragraph); c) performing a quantitative immunoassay and the sample to determine the amount of sdAb in a subject (c) performing a quantitative immunoassay and the sample to determine the amount of sdAb in a subject; page 59, sixth paragraph); and d) quantifying the amount of sdAb in the subject (d) quantifying the amount of sdAb in the subject; page 59, sixth paragraph).

Abylnx does not disclose performing a quantitative immunoassay with the mouse monoclonal antibody.

However, one of ordinary skill in the art would have readily appreciated that an ELISA immunoassay requires monoclonal antibody reagents for accurate and replicable detection of target analytes. Further, the generation of monoclonal antibody reagents in non-human animals, such as mice, for use in immunoassays such as ELISA was commonly practiced in the art at the time of the invention. Thus, generating mouse monoclonal antibodies for use in the immunoassay of Abylnx would have been obvious to one of ordinary skill in the art.

Since none of the special technical features of the Groups I, II and III+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Abylnx reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

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

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

Fターム(参考) 4C084 AA19 MA13 MA17 MA23 MA24 MA52 MA56 MA58 MA59 MA60
 MA63 MA66 NA05 NA14 ZA16 ZA45 ZA70 ZA75 ZA96 ZB26
 ZB33 ZC20 ZC35 ZC75
 4C085 AA14 CC02 CC05 DD62 EE01 EE03 GG02 GG04 GG05 GG08
 GG10
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA05 DA75 DA76 DA89 EA20
 FA74

