

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/186721

発行日 平成29年4月20日(2017. 4. 20)

(43) 国際公開日 平成27年12月10日(2015. 12. 10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
C O 7 K 14/11 (2006.01)	C O 7 K 14/11 Z N A	4 H O 4 5
C O 7 K 16/10 (2006.01)	C O 7 K 16/10	
C 4 O B 40/08 (2006.01)	C 4 O B 40/08	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2016-525195 (P2016-525195)	(71) 出願人	501203344
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/065986		国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
(22) 国際出願日	平成27年6月3日(2015. 6. 3)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(31) 優先権主張番号	特願2014-115221 (P2014-115221)	(71) 出願人	500101243
(32) 優先日	平成26年6月3日(2014. 6. 3)		株式会社ファーマフーズ
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		京都府京都市西京区御陵大原1-4-9
		(74) 代理人	110000338
			特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
		(72) 発明者	内田 裕子
			茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体またはその可変領域を含む抗体断片、抗原ポリペプチド、およびその利用

(57) 【要約】

H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの抗体およびその可変領域を含む抗体断片、抗原ポリペプチド、およびその利用を提供するため、本発明は、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスのH A 1 領域のうち、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるH A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体およびその可変領域を含む抗体断片、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるH A 1 抗原ポリペプチドならびに当該抗体およびその可変領域を含む抗体断片の利用について提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン H A 1 領域のうち、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする、抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 2】

重鎖可変領域中に、配列番号 4 に示される C D R 1、配列番号 5 に示される C D R 2 および配列番号 6 または配列番号 4 6 に示される C D R 3 のすべてを含んでおり、且つ、軽鎖可変領域中に、配列番号 7 に示される C D R 1、配列番号 8 に示される C D R 2 および配列番号 9 に示される C D R 3 のすべてを含んでいることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

10

【請求項 3】

重鎖可変領域が、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 13 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ

軽鎖可変領域が、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 10 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

20

【請求項 4】

重鎖可変領域が、配列番号 4 5 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ

軽鎖可変領域が、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項 3 に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 5】

以下の (1) ~ (4) の何れかに示す、H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン H A 1 領域のうち、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片：

(1) 配列番号 1 または 4 4 に示されるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

30

(2) 配列番号 1 または 4 4 に示されるアミノ酸配列において 1 ~ 35 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

(3) 配列番号 1 または 4 4 に示されるアミノ酸配列に対して 90 % 以上の配列同一性を有する抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

(4) 上記 (1) に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

40

【請求項 6】

下記の (a) ~ (c) の工程を含む製造方法によって得られたことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片：

(a) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程；

(b) 上記工程 (a) で免疫したトリから上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および

(c) 上記工程 (b) で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

【請求項 7】

一本鎖可変領域断片または二価抗体であることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか

50

一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 8】

重鎖が配列番号 26 または配列番号 52 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、軽鎖が配列番号 28 に示されるアミノ酸配列からなる二価抗体であることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードすることを特徴とする、ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のポリヌクレオチドを有することを特徴とする、組換えベクター。

10

【請求項 11】

請求項 10 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 10 に記載の組換えベクターが導入されていることを特徴とする、形質転換体。

【請求項 12】

H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン HA1 領域のうち、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン HA1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を製造する方法であって、

下記の (a) ~ (c) の工程を含むことを特徴とする、方法：

(a) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン HA1 抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程；

20

(b) 上記工程 (a) で免疫したトリから上記ヘマグルチニン HA1 抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および

(c) 上記工程 (b) で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニン HA1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

【請求項 13】

上記抗体は、一本鎖可変領域断片または二価抗体であることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

【請求項 15】

試料中に含まれる H5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出するためのキットであって、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片を備えていることを特徴とする、キット。

30

【請求項 16】

試料中に含まれる H5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法であって、

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片と、生体から調製した試料とを反応させる工程を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 17】

上記試料は、気管、咽喉頭、口腔または総排泄腔の、拭い液であることを特徴とする、請求項 16 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体またはその可変領域を含む抗体断片、抗原ポリペプチド、およびその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) をはじめとする H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、2003 年以降各地で家禽における鳥インフルエンザの発生を引き起こし、アジアを中心に常在化の様相を呈している。このような高病

50

原性鳥インフルエンザウイルスが鳥類に感染し、その感染症が蔓延すると、畜産業等に甚大な損害を及ぼすと共に、ヒトへの感染も危惧される。日本国内におけるH P A I Vの防疫は摘発淘汰を基本としているため、現場レベルにおける早期検出が重要である。現在現場で簡易的に用いられる検査系として、A型インフルエンザウイルスを検出するものを用いられているが、H 5 N 1亜型高病原性鳥インフルエンザを即座に判定するものではない。既存の診断キットとして、例えば、インフルエンザ核タンパク質を標的抗原とした診断キットが挙げられるが、H 5 N 1亜型鳥インフルエンザウイルス特異性がなく、他のインフルエンザウイルスにも反応するという問題がある。また、その他の例としては、H 5 N 1亜型不活化ウイルスのリコンビナントH 5 ヘマグルチニン（H A、ウイルス赤血球凝集素）タンパク質を標的抗原とした診断キットが挙げられるが、イムノドミナントな抗原に対する抗体ができるため、ウイルスの遺伝子に変異があった場合、反応性が低下または検出できないという可能性があるという問題がある。そのため、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルス感染の診断試薬の開発が望まれている。効果的な診断試薬の開発のためには、広くH 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを認識する抗体作製が必要である。

【 0 0 0 3 】

例えば、特許文献1には、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスのH Aエンベロープ糖タンパク質またはN 1亜型のノイラミニダーゼ糖タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体が記載されている。また、特許文献2には、H AのH A 2サブユニットにおけるエピトープを認識および結合することができ、H 5 亜型の鳥インフルエンザウイルスに対して中和活性を有するモノクローナル抗体等が記載されている。

【 0 0 0 4 】

また、特許文献3には、鳥インフルエンザウイルスのH Aタンパク質のステム領域のエピトープに結合し、H 5 N 1亜型を包含するA型インフルエンザウイルスを中和する、単離されたモノクローナル抗体が記載されている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【特許文献1】日本国公開特許公報「特表2010-539162号公報（2010年12月16日公表）」

【特許文献1】日本国公開特許公報「特表2010-502207号公報（2010年1月28日公表）」

【特許文献3】日本国公開特許公報「特表2011-506344号公報（2011年3月3日公表）」

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

上述の特許文献1～3における抗体のスクリーニングに際し、抗体の活性の評価は、ウイルスの中和試験によって行われている。例えば血球凝集阻害試験などにより、H Aタンパク質活性の有無を試験することによって行われている。すなわち、従来技術における抗体は、ヒト等に感染した場合、当該抗体を用いてH 5 N 1亜型鳥インフルエンザウイルスを中和することを目的としている。その為、それらの抗体を検出試薬に供したとしても、ウイルスの変異が起ってしまった場合、抗体の反応性が失われ、ウイルスを検出できなくなる可能性が高い。

【 0 0 0 7 】

しかし、亜型ウイルス特異的な検出の標的となるウイルス赤血球凝集素（ヘマグルチニン、H A）タンパク質においてアミノ酸置換が頻繁に起こっており、広くH 5 亜型H Aを認識する抗体の作製が困難である。そのため、抗原検出によるH 5 亜型鳥インフルエンザウイルス感染の診断試薬の普及が遅れている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

10

20

30

40

50

上記の課題を解決するために、本願発明者らは鋭意検討をし、広く H 5 亜型 H A を認識し得る抗体の作出に成功した。

【 0 0 0 9 】

本発明は以下の何れかの一態様を包含する。

< 1 > H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン H A 1 領域のうち、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする、抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

< 2 > H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン H A 1 領域のうち、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を製造する方法であって、下記の (a) ~ (c) の工程を含むことを特徴とする、方法： (a) 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程； (b) 上記工程 (a) で免疫したトリから上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および (c) 上記工程 (b) で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

< 3 > 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片は、 H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスに特異的に結合し、且つ H 5 以外の他の亜型の鳥インフルエンザウイルスには結合しないという優れた効果を奏する。したがって、本発明に係る抗体を用いれば、 H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを正確、迅速且つ簡便に検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】本発明の実施例 1 に係る、抗体の作製方法における一工程を示す図である。ニワトリの免疫および免疫ニワトリ脾臓からの s c F v ファージ抗体ライブラリーの作製の工程を示している。

【図 2】本発明の実施例 1 に係る、抗体の作製方法における一工程を示す図である。 s c F v ファージライブラリーの、パニング選択の工程を示している。

【図 3】本発明の実施例 1 に係る、抗体の作製方法における一工程を示す図である。 s c F v ファージライブラリーの、 E L I S A を用いたスクリーニングの工程を示している。

【図 4】本発明の実施例 1 に係る、得られた野生型の単鎖抗体のアミノ酸配列の可変領域を示す図である。

【図 5】本発明の実施例 1 に係る、抗体の作製方法における一工程を示す図である。二価抗体発現ベクターへの組換えによる二価抗体の作製の工程を示している。

【図 6】本発明の実施例 1 に係る、野生型の二価抗体タンパク質を電気泳動後に C B B 染色した結果を示す図である。

【図 7】本発明の実施例 1 に係る、野生型の二価抗体の抗体価を示す図である。

【図 8】本発明の実施例 1 に係る、野生型の二価抗体の H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスの変異体および複数種類の H 5 以外の亜型鳥インフルエンザウイルスに対する抗体結合性を示す図である。

【図 9】本発明の実施例 2 に係る、野生型の単鎖抗体の H 鎖の C D R 3 のアミノ酸配列と変異型抗体の H 鎖の C D R 3 のアミノ酸配列とのアライメントを示す図である。

【図 1 0】本発明の実施例 2 に係る、変異型の二価抗体の抗体価を示す図である。

【図 1 1】本発明の実施例 2 に係る、変異型の二価抗体の、各亜型鳥インフルエンザウイルスに対する抗体結合性を示す図である。

【図 1 2】本発明の実施例に係る、 H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの抗原として用いた合成ペプチドの配列 (右) および H A タンパク質の立体構造 (左) を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 1 3】本発明の参考例に係る、H 1 ~ H 1 6 亜型鳥インフルエンザウイルスにおけるすべての亜型間 (a) および H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスに存在しているすべてのクレード間 (b) の配列同一性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

本発明の実施の形態について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明は、これに限定されるものではない。

【 0 0 1 3 】

〔用語等の定義〕

本明細書において、「ポリヌクレオチド」は、「核酸」または「核酸分子」とも換言でき、ヌクレオチドの重合体を意図している。また、「塩基配列」は、「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」とも換言でき、特に言及のない限り、デオキシリボヌクレオチドの配列またはリボヌクレオチドの配列を意図している。また、ポリヌクレオチドは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、一本鎖の場合はセンス鎖であってもアンチセンス鎖であってもよい。

10

【 0 0 1 4 】

本明細書において、「ポリペプチド」は、「タンパク質」または「タンパク質断片」とも換言できる。

【 0 0 1 5 】

本明細書において、「H 5 亜型鳥インフルエンザウイルス」および「H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルス」は、鳥インフルエンザウイルスのサブタイプ的一种を指している。

20

【 0 0 1 6 】

「鳥インフルエンザウイルス」は、それらの核タンパク質およびマトリックスタンパク質の抗原特異性に従って分類される。鳥インフルエンザウイルスは主に A、B および C 血清型に類別される。このうち、A 型鳥インフルエンザウイルスは、8 個の RNA 分節を有し、10 個のウイルスタンパク質をコードしている。

【 0 0 1 7 】

「ヘマグルチニン」(以下、「HA」と称する)は、インフルエンザウイルスのエンベロープ糖タンパク質を意味する。HA は、インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着および侵入を可能にする。「ノイラミニダーゼ」(以下、「NA」と称する)は、ウイルス粒子が感染後期に細胞表面から離れる際にシアル酸を切断する働きを有しており、感染性を獲得する役割を担っている。

30

【 0 0 1 8 】

全ての既知の A 型インフルエンザウイルスは鳥類に由来し、A 型のインフルエンザウイルスは、HA および NA の抗原性の性質によって亜型にさらに分類される。HA には、H 1 ~ H 1 6 の 16 個のサブタイプがあり、NA には、N 1 ~ N 9 の 9 個のサブタイプがある。これらの HA と NA との種々の組合せを有する、種々の A 型インフルエンザウイルスのサブタイプが存在している。これらの組み合わせのうち、鳥由来インフルエンザウイルスの H 5 N 1、H 6 N 1、H 7 N 3、H 7 N 7、H 7 N 9、H 9 N 2 および H 1 0 N 8 の亜型は、ヒトへの感染を引き起こすことが知られている。H 5 および H 7 亜型のインフルエンザウイルスのうち、一部のウイルスは本来の宿主である水禽類に対する病原性はそれほど高くないが、鶏等の家禽に感染した場合死に至らしめるほどの高い病原性を示すことが知られ、高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) と呼ばれている。さらに、近年では、家禽における H 5 N 1 亜型ウイルス感染によるインフルエンザの発生から、ヒトへの感染事例が相次いで報告されている。このような状況から、H 5 N 1 亜型 HPAIV が、ヒトからヒトへ効率的に感染できるように変異し、新型インフルエンザウイルスとなることが懸念されている。

40

【 0 0 1 9 】

近年アジアを中心に家禽に常在化している H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスは、

50

H A 遺伝子の塩基配列の相同性に基づいて、さらに複数種のクレードに分類することができる。米国生物工学情報センター (NCBI; National Center for Biotechnology Information) により提供される G e n B a n k データベース (ウェブページ: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) において、所定のアクセッション番号 (Accession No.) により登録されている H 5 N 1 亜型 H P A I V の H A 遺伝子は、WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Groupによって、クレード 0 から 9 まで、およびさらにそのサブクレードに分類されている。例えば、クレード 0 として A/Hong Kong/156/1997、クレード 1 として A/duck/Vietnam/2/2007、クレード 2 . 1 . 1 として A/chicken/Indonesia/7/2003、クレード 2 . 1 . 2 として A/Indonesia/CDC596/2006、クレード 2 . 1 . 3 として A/Indonesia/CDC940/2006、クレード 2 . 2 として A/Egypt/1394-NAMRU3/2007、クレード 2 . 3 . 1 として A/duck/Hunan/127/2005、クレード 2 . 3 . 2 として A/whooper swan/Akita/1/2008、クレード 2 . 3 . 3 として A/chicken/Guiyang/3055/2005、クレード 2 . 3 . 4 として A/Viet Nam/HN31242/2007、クレード 2 . 4 として A/Chicken/Yunnan/493/2005、クレード 2 . 5 として A/chicken/Yamaguchi/7/2004、クレード 3 として A/Pheasant/HongKong/FY155/2001、クレード 4 として A/goose/Guiyang/337/2006、クレード 5 として A/goose/Guangxi/914/2004、クレード 6 として A/duck/Hubei/wg/2002、クレード 7 として A/Beijing/01/2003、クレード 8 として A/chicken/Hong Kong/61.9/2002、およびクレード 9 として A/Goose/Shantou/1621/2005 が、それぞれのクレードの代表株として挙げられる。

10

【 0 0 2 0 】

また、本明細書において、「H A 1 領域」および「H A 2 領域」とは、それぞれ、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンタンパク質 (H A) のタンパク質分解酵素切断部位およびそれに連なる融合ペプチド領域を挟む 2 つの領域を指している。また、H A タンパク質の H A 1 - H A 2 接合部におけるタンパク質分解による切断はウイルスの増殖性と関連しており、この切断部位周辺に疎水性アミノ酸が連続して存在していることが H P A I V に特徴的である。そして、H A 1 領域および H A 2 領域は、鶏における高病原性に関与する。

20

【 0 0 2 1 】

また、上述の H 5 N 1 亜型におけるすべてのクレード間の H A 1 領域全域の配列同一性は、各クレードの株について、上に挙げたものを用いた場合、いずれの異なるクレードの組み合わせにおいても、91 ~ 99 % の配列同一性を有している。一方で、H 1 ~ H 1 6 すべての亜型間の H A 1 領域全域の配列同一性は、いずれの異なる亜型の組み合わせにおいても、7 ~ 51 % の範囲である。中でも、H 1 ~ H 4 亜型および H 6 ~ H 1 6 亜型それぞれの H A 1 領域全域と、H 5 型の H A 1 領域全域との配列同一性は、非常に低く、すべて 8 % ~ 21 % の範囲である。

30

【 0 0 2 2 】

また、上述の H 5 N 1 亜型におけるすべてのクレード間の H A 2 領域全域の配列同一性は、各クレードの株について、上に挙げたものを用いた場合、いずれのクレードの組み合わせにおいても、94 ~ 100 % の配列同一性を有している。一方で、H 1 ~ H 1 6 すべての亜型間の H A 1 領域全域の配列同一性は、いずれの異なる亜型の組み合わせにおいても、42 ~ 81 % の範囲である。中でも、H 1 ~ H 4 型および H 6 ~ H 1 6 亜型それぞれの H A 2 領域全域と、H 5 亜型の H A 2 領域全域との配列同一性は、45 ~ 75 % である。

40

【 0 0 2 3 】

また、本明細書において、「二価抗体」とは、1 分子あたり抗原結合部位を 2 つ有する抗体、つまり、抗原との結合価が二価の抗体を意味する。上記「二価抗体」は、それぞれ相同な 2 本の軽鎖 (軽鎖可変領域および軽鎖定常領域) と 2 本の重鎖 (重鎖可変領域および重鎖定常領域) とがジスルフィド結合 (S - S 結合) により結合した構造を有する抗体である。但し、完全長の抗体分子である必要はなく、2 本の重鎖が S - S 結合により結合することができる構造、すなわち少なくとも F (a b ') 2 フラグメントを有する構造であれば「二価抗体」の範疇に含まれる。

50

【 0 0 2 4 】

また、本明細書において、「一本鎖可変領域断片 (single-chain variable fragment、(s c F v))」とは、軽鎖 (Light chain、L 鎖とも称する) 可変領域と重鎖 (Heavy chain、H 鎖とも称する) 可変領域とがリンカーによってつながれ、2 種類の可変領域が接近することによって、1 つの抗原結合部位を形成した抗体を意味する。上記「一本鎖可変領域断片」は、1 分子あたり 1 つの抗原結合部位を有する抗体である。例えば、ファージディスプレイ法を用いた抗体作成方法によって得られる抗体を指す。本明細書においては「単鎖抗体」とも記載する。

【 0 0 2 5 】

本明細書において、「A および / または B」は、A および B と A または B との双方を含む概念であり、「A および B の少なくとも一方」とも換言できる。

10

【 0 0 2 6 】

〔 1 . 本発明に係る H A 1 抗原ポリペプチド 〕

本発明に係る H A 1 抗原ポリペプチドは、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであり得る。

【 0 0 2 7 】

また、本発明に係る H A 1 抗原ポリペプチドは、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド中の、連続する 1 5 個以上 1 6 個以下のアミノ酸からなるポリペプチドであり得る。

【 0 0 2 8 】

本明細書中において使用される場合、「配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる H A 1 抗原ポリペプチド」の機能が阻害されない限り、「配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」にリンカーペプチドが付加されたもの、他のアミノ酸またはタンパク質が連結されたもの (例えば、タグ化されたタンパク質または融合タンパク質) であってもよい。

20

【 0 0 2 9 】

配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる H A 1 抗原ポリペプチドに連結される、リンカーポリペプチドとしては、1 0 ~ 2 5 個のアミノ酸からなるポリペプチド等が挙げられ、タグとしては、H i s タグ、M y c タグおよび F l a g タグ等が挙げられる。

【 0 0 3 0 】

本発明に係る H A 1 抗原ポリペプチドの作製方法は、化学合成であっても発現ベクターを用いるものであってもよい。化学合成による場合は、本発明に係る H A 1 抗原ポリペプチドは、公知のポリペプチド合成法によって製造することができる。ポリペプチド合成法としては、液相ポリペプチド合成法、固相ペプチド合成法等の化学合成法が挙げられるが、これらに限定されない。発現ベクターを用いる場合は、発現ベクターを導入した形質転換体からポリペプチドを生成しても、インビトロ翻訳系を用いてポリペプチドを生成してもよい。例えば、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを挿入した発現ベクターを導入した宿主細胞中にて目的のポリペプチドを生成することができる。例えば、以下の〔 4 . 組換えベクター 〕の項目に記載の方法が好適に用いられる。また、形質転換体についても、例えば、以下の〔 5 . 形質転換体 〕の項目に記載の方法が

30

40

【 0 0 3 1 】

なお、本発明に係る H A 1 抗原ポリペプチドは、宿主細胞中において安定的に発現していることが好ましいが、一過性に発現していてもよい。このようにして生成されたポリペプチドを、公知の方法に従って精製することができる。ポリペプチドの精製方法としては、特に限定されないが、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、およびアフィニティクロマトグラフィー等が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

本発明に係る H A 1 抗原ポリペプチドは、実施例および図 1 2 にも示す通り、H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスの H A 1 領域のアミノ酸配列のうち、H 5 N 1 亜型の異なる

50

る株間において非常に高く保持されており、且つ立体構造上、H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスタンパク質の表面に出ている部位のアミノ酸配列である。一方で、H 1 ~ H 4 型および H 6 ~ H 1 6 型において、このアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列の配列同一性は非常に低い。すなわち本発明に係る H A 1 抗原ポリペプチドは、宿主内においても変異が起こりにくく且つ、構造上、抗体との結合性能が非常に優れている。したがって、本発明に係る H A 1 抗原ポリペプチドであれば、H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスに非常に特異的な抗体の作製に好適に利用することができる。

【 0 0 3 3 】

〔 2 . 本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片 〕

本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片は、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの H A 1 領域のうち、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする。

10

【 0 0 3 4 】

ここで、「H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する」とは、当該 H A 1 抗原ポリペプチドの配列を認識して結合することを意味しており、例えば、当該 H A 1 抗原ポリペプチドの配列を含む、より長い配列を有するポリペプチド等にも結合する。

【 0 0 3 5 】

本明細書において、上記「抗体」は、免疫グロブリン (I g A 、 I g D 、 I g E 、 I g Y 、 I g G 、 I g M およびこれらの F a b フラグメント、F (a b ') 2 フラグメント、F c フラグメント) を意味し、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ化抗体、ヒト化抗体等の二価抗体および一本鎖可変領域断片および抗体の相補性決定領域 (C D R) を含むペプチド等が挙げられるが、本発明はこれらに限定されない。

20

【 0 0 3 6 】

また、本発明の抗体の断片であって、上記抗体の可変領域を含む抗体断片も本発明の範囲に含まれる。かかる抗体断片としては、上記抗体の可変領域を含む抗体断片であって H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを認識する抗体断片であれば特に限定されるものではない。かかる抗体断片は、本発明の抗体の H 鎖全長、L 鎖全長、H 鎖の可変領域、および L 鎖の可変領域のいずれかの領域の断片であってもよい。このような抗体断片であれば、例えば、フローサイトメトリー法または E L I S A 法に好適に用いることができる。また、抗体断片は、ヒトその他の動物の抗体に移植することによって、キメラ抗体を作製するために好適に用いることができる。

30

【 0 0 3 7 】

また、本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片の一態様は、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる H A 1 抗原ポリペプチド中の、連続する 1 5 個以上 1 6 個以下のアミノ酸に特異的に結合する。

【 0 0 3 8 】

また、上述の抗体またはその可変領域を含む抗体断片と、H A 1 抗原ポリペプチドとの特異的な結合は、H A 1 抗原ポリペプチド中の 1 箇所の特定の領域に生じているか、または 2 か所以上の異なる領域に同時に生じていてもよい。

40

【 0 0 3 9 】

本発明に係る抗体の一態様は、H 鎖が配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、L 鎖が配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列からなる二価抗体である。また、本発明に係る抗体の別の例は、H 鎖が配列番号 5 2 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、L 鎖が配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列からなる二価抗体である。

【 0 0 4 0 】

また、配列番号 2 に示すアミノ酸配列は、本発明の一態様に係る抗体の H 鎖可変領域のアミノ酸配列であり、配列番号 3 に示すアミノ酸配列は、本発明の一態様に係る抗体の L 鎖可変領域のアミノ酸配列である。図 4 に本発明の一態様に係る抗体の H 鎖可変領域のアミノ酸配列および L 鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。図 4 に示すように、本発明の一態

50

様に係る抗体のH鎖可変領域は、四角で囲んで示しているCDRの領域である、CDR1、CDR2およびCDR3を有している。すなわち本発明の一態様に係る抗体のH鎖可変領域は、配列番号1に示すアミノ酸配列の1番目～130番目のアミノ酸配列からなり、31番目～35番目のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号1に示すアミノ酸配列の50番目～66番目のアミノ酸配列からなるCDR2および配列番号1に示すアミノ酸配列の99番目～119番目のアミノ酸配列からなるCDR3を有する。また、図4に示すように、本発明の一態様に係る抗体のL鎖可変領域は、四角で囲んで示しているCDR1、CDR2およびCDR3を有している。すなわち本発明の一態様に係る抗体のL鎖可変領域は、配列番号1に示すアミノ酸配列の148番目～270番目のアミノ酸配列からなり、配列番号1に示すアミノ酸配列の168番目～176番目のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号1に示すアミノ酸配列の193番目～203番目のアミノ酸配列からなるCDR2、および配列番号1に示すアミノ酸配列の232番目～240番目のアミノ酸配列からなるCDR3を有する。また、本発明の一態様の抗体は、配列番号1に示すアミノ酸配列からなる抗体である。また、本発明の別の態様の抗体はH鎖可変領域が配列番号45に示すアミノ酸配列からなり、且つ、L鎖可変領域が配列番号3に示すアミノ酸配列からなる。さらに、本発明の別の態様の抗体は配列番号44に示すアミノ酸配列からなる抗体である。

10

【0041】

本発明の一態様に係る抗体のH鎖可変領域のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号4～6に示し、本発明に係る抗体のL鎖可変領域のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号7～9に示す。本発明の別の態様に係る抗体のH鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列および塩基配列をそれぞれ配列番号46および47に示す。

20

【0042】

また、本発明に係る抗体の他の態様は、H鎖可変領域中に、配列番号4に示されるCDR1、配列番号5に示されるCDR2および配列番号6に示されるCDR3のすべてを含んでおり、且つ、L鎖可変領域中に、配列番号7に示されるCDR1、配列番号8に示されるCDR2および配列番号9に示されるCDR3のすべてを有している、抗体またはその可変領域を含む抗体断片である。

30

【0043】

また、本発明に係る抗体のさらに他の態様は、H鎖可変領域中に、配列番号4に示されるCDR1、配列番号5に示されるCDR2および配列番号46に示されるCDR3のすべてを含んでおり、且つ、L鎖可変領域中に、配列番号7に示されるCDR1、配列番号8に示されるCDR2および配列番号9に示されるCDR3のすべてを有している、抗体またはその可変領域を含む抗体断片である。

40

【0044】

また、本発明に係る抗体のさらに他の態様は、H鎖可変領域中に、配列番号4に示されるCDR1、配列番号5に示されるCDR2および配列番号6または配列番号46に示されるCDR3のうち少なくとも1つを含んでおり、且つ、L鎖可変領域中に、配列番号7に示されるCDR1、配列番号8に示されるCDR2および配列番号9に示されるCDR3のうちの少なくとも1つを有している、抗体またはその可変領域を含む抗体断片である。

【0045】

また、本発明に係る抗体のさらに他の態様は、H鎖可変領域中に、配列番号4に示されるCDR1、配列番号5に示されるCDR2および配列番号6または配列番号46に示されるCDR3のうち少なくとも1つを有しているか、またはL鎖可変領域中に、配列番号7に示されるCDR1、配列番号8に示されるCDR2および配列番号9に示されるCDR3のうちの少なくとも1つを有している、抗体またはその可変領域を含む抗体断片である。

【0046】

50

また、本発明に係る抗体、またはその可変領域を含む抗体断片は、以下の特徴を有するものも包含している。

【 0 0 4 7 】

H鎖可変領域が、配列番号2に示されるアミノ酸配列、または、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1～13個、好ましくは1～6個、より好ましくは1～2個または3個、さらに好ましくは1個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ

L鎖可変領域が、配列番号3に示されるアミノ酸配列、または、配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～2個または3個、さらにより好ましくは1個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加されたアミノ酸配列からなる、抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

10

【 0 0 4 8 】

一例として、本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片は、H鎖可変領域が配列番号2に示すアミノ酸配列からなり、且つL鎖可変領域が配列番号3に示すアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片を挙げることができる。

【 0 0 4 9 】

本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片の別の例は、H鎖可変領域が、配列番号45に示されるアミノ酸配列からなり、且つL鎖可変領域が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片を挙げることができる。ここで、配列番号45に示されるアミノ酸配列は、配列番号2に示すアミノ酸配列の105番目のアミノ酸YをRに、106番目のアミノ酸SをRに、107番目のアミノ酸YをVに、それぞれ置換した配列である。このような配列を有する抗体は、H5亜型鳥インフルエンザウイルスへの特異性を維持しながら、HA1抗原に対するより高い反応性を有しており、より好ましい。

20

【 0 0 5 0 】

さらに、本発明に係る抗体またはその可変領域を含む抗体断片は、H5亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニンHA1領域のうち、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその可変領域を含む抗体断片であって、以下の(1)～(4)の何れかに示すものを包含する。

(1) 配列番号1または44に示されるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

30

(2) 配列番号1または44に示されるアミノ酸配列において1～35個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

(3) 配列番号1または44に示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有する抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

(4) 上記(1)に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片。なお、ストリンジェントな条件については、本発明に係るポリヌクレオチドの欄で後述する。

40

【 0 0 5 1 】

また、本発明に係る抗体の一態様は、下記に示す、(a)～(c)の工程を含む製造方法によって得られたものである。

【 0 0 5 2 】

(a) 配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程；(b) 上記工程(a)で免疫したトリから上記ヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および(c) 上記工程(b)で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程

50

。

【 0 0 5 3 】

上記工程を含む製造方法については、以下の〔 6 . 本発明に係る抗体の製造方法 〕において詳細に記載する。

【 0 0 5 4 】

また、本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片は、一本鎖可変領域断片または二価抗体であり、好ましくは二価抗体である。

【 0 0 5 5 】

本発明に包含される単鎖抗体の例としては、配列番号 4 4 に示されるアミノ酸配列からなる抗体が挙げられる。

10

【 0 0 5 6 】

本発明に包含される単鎖抗体の他の例としては、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の 2 5 2 番目 ~ 3 5 1 番目のアミノ酸を配列番号 4 4 に示されるアミノ酸配列の 2 5 2 番目 ~ 3 5 9 番目のアミノ酸に置換したアミノ酸配列からなる抗体が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

本発明に包含される単鎖抗体のさらに他の例としては、配列番号 4 4 に示されるアミノ酸配列の 2 5 2 番目 ~ 3 5 9 番目のアミノ酸を配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の 2 5 2 番目 ~ 3 5 1 番目のアミノ酸に置換したアミノ酸配列からなる抗体が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

また、本発明に係る二価抗体の一例は、以下の特性：可変領域がニワトリ由来であり、定常領域がマウス I g G 1 由来である、二価のマウスキメラ型抗 H A 1 抗体であって、免疫グロブリンのサブタイプは I g G 1 であり、分子量は約 1 5 0 k D a である；を有するものである。

20

【 0 0 5 9 】

本発明に係る二価抗体のさらに具体的な一例としては、H鎖が配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、L鎖が配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列からなるものが挙げられる。さらに、本発明に係るより好ましい二価抗体の他の例としては、H鎖が配列番号 5 2 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、L鎖が配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列からなるものが挙げられる。

【 0 0 6 0 】

本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片は、標識剤によって、標識化された抗体も包含している。標識化された抗体は、以下の〔 7 . 本発明に係るキット 〕および〔 8 . H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法 〕において用いることができる。

30

【 0 0 6 1 】

上述の標識剤としては、酵素、酵素基質、放射性同位元素、発光物質、蛍光物質、ビオチンおよび着色物質等が挙げられる。酵素の例としては、ペルオキシダーゼ、β - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼおよびグルコース - 6 - リン酸脱水素酵素を挙げることができる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物およびN - ヒドロキシスクシンイミドエステル化合物等の架橋剤を用いる公知の方法により行うことができる。酵素基質としては、使用する酵素に応じて公知の物質を使用することができる。例えば、酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、O P D (オルトフェニレンジアミン) およびT M B (テトラメチルベンジジン) 等を、また酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合には、ニトロブルーテトラゾリウム (N B T) および5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスファターゼp - トルイジニル塩 (B C I P) の混合基質等を用いることができる。

40

【 0 0 6 2 】

放射性同位元素としては、¹²⁵I、³Hまたは³⁵S等の通常のラジオイムノアッセイで用いられているものを使用することができる。本発明に係る抗体への放射標識は公知の方法を用いて行うことができる。上記蛍光色素としては、フルオレセインイソチオシア

50

ネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートおよびフィコエリスリン等の通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。また、蛍光物質として、蛍光シリカナノ粒子を使用してもよい。また、上記発光物質としては、イソルミノール、アクリジンエステルおよびルシゲニン等を用いることができる。この際、標識の方法は、公知の方法を用いることができる。また、上記着色物質としては、例えば、着色ラテックス粒子および金コロイド等を挙げることができる。

【 0 0 6 3 】

また、本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片は、固体支持体に固相化されていてもよい。使用できる固体支持体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレンまたはポリビニル性のマイクロタイタープレート、試験管、キャピラリー、ビーズ（ラテックス粒子および金属化合物など）、膜（リボソームなど）およびフィルターなどが挙げられる。これらのうち、特にポリスチレンが好ましい。このように固相化された抗体は、例えば、後述する〔 8 . H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法〕における方法において好適に用いられる。

【 0 0 6 4 】

後述する実施例においても示す通り、本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片は、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスのH A 1 領域のアミノ酸配列のうち、H 5 亜型の異なる株間において高く保持されており、且つ立体構造上、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスタンパク質の表面に出ている部位に結合する。さらに、H 5 以外の亜型に対する結合性は著しく低い。そのため、本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片は、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを特異的に、簡便、且つ高感度に検出することができる。したがって、本発明に係る抗体は、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの検出するキットおよび検出方法等に、好適に利用することができる。

【 0 0 6 5 】

また、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスは、N 1 ~ N 9 のサブタイプを含んでおり、本発明において検出の対象として用いられるH 5 亜型鳥インフルエンザウイルスとしては、例えば、H 5 N 1 亜型、H 5 N 2 亜型およびH 5 N 8 亜型が挙げられる。

【 0 0 6 6 】

〔 3 . 本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片をコードするポリヌクレオチド〕

本発明に係るポリヌクレオチドは、上記抗体およびその可変領域を含む抗体断片をコードするものである。このポリヌクレオチドは、具体的には、例えば、以下の（ 1 ） ~ （ 4 ）の何れかに記載のポリヌクレオチドが挙げられる。

（ 1 ）配列番号 1 または 4 4 に示されるアミノ酸配列を有し、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスのH A 1 領域のうち、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるH A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードするポリヌクレオチド。

（ 2 ）配列番号 1 または 4 4 に示されるアミノ酸配列において 1 ~ 3 5 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列を有し、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスのH A 1 領域のうち、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるH A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードするポリヌクレオチド。なお、置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸の個数は、1 ~ 1 7 個であることが好ましく、1 ~ 1 3 個であることが好ましく、1 ~ 1 0 個であることがより好ましく、1 ~ 8 個であることがさらに好ましく、1 ~ 5 個であることがさらに好ましく、1 ~ 2 個または 3 個であることが特に好ましい。

（ 3 ）配列番号 1 または 4 4 に示されるアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の配列同一性を有し、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスのH A 1 領域のうち、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるH A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードするポリヌクレオチド。なお、アミノ酸配列の配列同一性は、9 5 % 以上であることが好ましく、9 6 % 以上であることがさらに好ま

10

20

30

40

50

しく、97%以上、98%以上、或いは99%以上であることが特に好ましい。

(4) 上記(1)に記載のポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチド。なお、ストリンジェントな条件下とは、例えば、参考文献：“Molecular cloning-a Laboratory manual 2nd edition (Sambrookら、1989)”に記載の条件などが挙げられる。ストリンジェントな条件下とは、より具体的には例えば、6×SSC(1×SSCの組成：0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.5%SDS、5×デンハートおよび100mg/mLニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに65で8～16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。なお、このポリヌクレオチドは、上記(1)に記載のポリヌクレオチドの塩基配列に対して90%以上の配列同一性を有することがさらに好ましく、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或いは99%以上の配列同一性を有することがさらに好ましい。

10

【0067】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、RNA(例えば、mRNA)の形態、またはDNAの形態(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)で存在し得る。DNAは、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。本発明にかかるポリヌクレオチドの一例としては、配列番号1、および配列番号44に示すポリペプチドをコードするDNAである。配列番号1に示すポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列の一例を配列番号54に示し、配列番号44に示すポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列の一例を配列番号55に示す。本発明に係るポリヌクレオチドは、非翻訳領域(UTR)の配列、シグナル配列およびイントロンなどの付加的な配列を含むものであってもよい。

20

【0068】

本発明に係るポリヌクレオチドを取得する(単離する)方法は、特に限定されるものではないが、例えば、上記ポリヌクレオチドの塩基配列の一部と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、ゲノムDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーをスクリーニングすればよい。或いは、本発明に係るポリヌクレオチドを、ホスホロアミダイト法などの核酸合成法に従って合成してもよい。

【0069】

また、本発明にかかるポリヌクレオチドを取得する方法として、PCRなどの増幅手段を用いる方法を挙げることができる。例えば、当該ポリヌクレオチドのcDNAのうち、5'側および3'側の配列(またはその相補配列)の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてゲノムDNA(またはcDNA)などを鋳型にしてPCRなどを行い、両プライマー間に挟まれるDNA領域を増幅することで、本発明にかかるポリヌクレオチドを含むDNA断片を大量に取得できる。

30

【0070】

本発明に係るポリヌクレオチドとしては、さらに、本発明の二価抗体をコードしているDNA(配列番号27および29および53)などを挙げることができる。

【0071】

〔4. 組換えベクター〕

本発明に係るポリヌクレオチド(例えばDNA)は、適当なベクター中に挿入された組換えベクターとして利用に供することもできる。当該ベクターの種類は、例えば、自立的に複製するベクター(例えばプラスミドなど)でもよいし、或いは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

40

【0072】

上記ベクターは、好ましくは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明に係るポリヌクレオチドは、転写に必要な要素(例えば、プロモーターなど)が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

【0073】

50

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、大腸菌のlac、trpおよびtacプロモータなどが挙げられる。

【0074】

昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、p o l hプロモータ、p 1 0プロモータ、およびp B 1プロモータなどが挙げられる。酵母細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、およびホスホグリセリン酸キナーゼプロモータなどが挙げられる。糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、A D H 3プロモータ、およびt p i Aプロモータなどが挙げられる。

【0075】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、S V 4 0プロモータ、ウシ・パピローマ・ウイルス（B P V）プロモータおよびヒトサイトメガロウイルス（C M V）プロモータなどが挙げられる。

【0076】

また、本発明に係るポリヌクレオチドは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはT P I 1ターミネータもしくはA D H 3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明に係る組換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル、転写エンハンサ配列および翻訳エンハンサ配列のような要素を有していてもよい。

【0077】

本発明に係る組換えベクターは、さらに、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするD N A配列を具備してもよく、その一例としてはS V 4 0複製起点（宿主細胞が哺乳類細胞のとき）が挙げられる。

【0078】

本発明に係る組換えベクターはさらに選択マーカーを含有してもよい。選択マーカーとしては、例えば、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシンまたはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

【0079】

〔5．形質転換体〕

本発明に係るポリヌクレオチド、または、本発明に係る組換えベクター（本発明の核酸構築物と総称する）を適当な宿主細胞に導入することによって形質転換体を作製することができる。

【0080】

宿主細胞としては、例えば、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞および高等真核細胞などが挙げられる。

【0081】

細菌細胞の例としては、バチルスおよびストレプトマイセスなどのグラム陽性菌または大腸菌などのグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌細胞の形質転換は、例えば、プロトプラスト法、またはコンピテント細胞を用いる方法などによって行えばよい。

【0082】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する生物の細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）およびサッカロマイセス・クルイベリ（*Saccharomyces kluyveri*）などが挙げられる。本発明の核酸構築物の酵母宿主への導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法および酢酸リチウム法などを挙げることができる。

【0083】

酵母細胞以外の真菌細胞の例は、糸状菌、例えば、アスペルギルス、ニューロスボラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する生物の細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、本発明の核酸構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることによって形質転換を行うことができる。核酸構築物の宿主染色体への組み込みは、例えば、相

10

20

30

40

50

同組換えまたは異種組換えによって行うことができる。

【0084】

高等真核細胞の例としては、植物細胞、動物細胞および昆虫細胞等が挙げられ、動物細胞としては、哺乳動物細胞および鳥類細胞がさらに挙げられる。

【0085】

昆虫細胞の例としては、Sf9細胞およびSf21細胞などが挙げられる。宿主細胞として昆虫細胞を用いる場合、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法またはリポフェクション法などを挙げることもできる。

10

【0086】

植物細胞の例としては、T87細胞などが挙げられる。宿主細胞として植物細胞を用いる場合、植物細胞の形質転換には、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、リポソーム法、DEAEデキストラン法およびマイクロインジェクション法などを用いることができる。

【0087】

哺乳動物細胞の例としては、HEK293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞、CHO細胞、SP2/0細胞およびNSO細胞などが挙げられる。宿主細胞として哺乳動物細胞を用いる場合、哺乳動物細胞の形質転換には、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、リポソーム法、DEAEデキストラン法およびマイクロインジェクション法などを用いることができる。

20

【0088】

上記の形質転換体は、導入された核酸構築物の発現を可能にする条件下で、適切な培養培地中で培養する。次いで、必要に応じて、形質転換体の培養物から、本発明に係る抗体またはその可変領域を含む抗体断片を単離精製する。

【0089】

なお、形質転換体は、細胞に限定されない。すなわち、形質転換体は、例えば、本発明に係る核酸構築物で形質転換された組織、器官、および個体であってもよい。

【0090】

ただし、細胞以外の形質転換体は、非ヒト由来のものであることが好ましい場合があり、特に個体は非ヒト由来のものであることが好ましい。

30

【0091】

〔6．本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片の製造方法〕

本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片の製造方法の一例は、H5亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニンHA1領域のうち、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を製造する方法であって、下記の(a)～(c)の工程を含むことを特徴とする、方法である：
(a) 配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程；
(b) 上記工程(a)で免疫したトリから上記ヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および
(c) 上記工程(b)で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

40

【0092】

以下に、それぞれの工程について説明する。

【0093】

(工程(a))

工程(a)は、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるHA1抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程である。抗原をトリに投与する方法は特に限定されない。例えば、抗原ポリペプチドを腹腔内に投与してもよいし、抗原ポリペプチドを静脈内に投与しても

50

よい。また、抗原の免疫原性を高める観点から、初回免疫は、抗原ポリペプチドと免疫賦活剤とを等量混合して投与することが好ましい。上記「免疫賦活剤」としては、例えば、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、または水酸化アルミニウムゲルアジュバント等のこの分野で通常用いられるものを利用することができる。

【 0 0 9 4 】

抗原ポリペプチドを投与する間隔としては、例えば、初回免疫後 4 週間後に追加免疫（2 次免疫）を行ない、さらに 3 ~ 4 週間後に追加免疫（3 次免疫）を行なうことができる。血清の上昇が認められない場合は、さらに 2 ~ 3 週間後に追加免疫を行なうことができる。

【 0 0 9 5 】

H A 1 抗原ポリペプチドを免疫するトリとしては、ニワトリ、ダチョウ、ウズラおよび七面鳥などが挙げられ、飼育の容易さおよび飼料の確保の観点からニワトリが最も好ましい。

【 0 0 9 6 】

（工程（b））

工程（b）は、上記工程（a）で免疫したトリから抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程である。抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を得る方法は特に限定されない。例えば、ハイブリドーマを作製することによってモノクローナル抗体を作製する方法（参考文献：J.Vet. Med. Sci 58 105 3 1996）またはファージディスプレイ法によりトリ型ファージ抗体を作製する方法（日本

10

20

【 0 0 9 7 】

ここで、一例として、ファージディスプレイ法を用いて H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を得る方法について説明する。

【 0 0 9 8 】

ファージディスプレイ法では、まず、上記工程（a）で免疫したトリから脾臓を摘出し、当該脾臓から R N A を抽出する。得られた R N A を鋳型として R T - P C R を行ない、トリ抗体の、様々な H 鎖可変領域と L 鎖可変領域の遺伝子を含む c D N A を回収する。

30

【 0 0 9 9 】

次いで、得られた H 鎖可変領域と L 鎖可変領域の遺伝子の複数の組合せを、リンカー（（G G G G S）× 3）をコードする遺伝子およびスパーサー（A s p - V a l）をコードする遺伝子を介して結合させ、s c F v 遺伝子を構築する。

【 0 1 0 0 】

次いで、トリの C λ と、g 3 p 遺伝子とを組み込んだプラスミドに、得られた s c F v 遺伝子を導入し、ファージミドベクターを作製する。

【 0 1 0 1 】

次いで、作製したファージミドベクターを宿主（例えば、大腸菌等）に形質転換する。

【 0 1 0 2 】

次いで、ファージミドベクターを形質転換した大腸菌にさらにヘルパーファージを感染させる。このようにして得られた大腸菌を培養すれば s c F v を発現するファージを得ることができる。

40

【 0 1 0 3 】

これらの複数の単鎖のファージ抗体（ファージ抗体ライブラリー）の中から H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮する方法として、例えば、パニング選択を行なうことができる。

【 0 1 0 4 】

上記「パニング選択」の方法としては特に限定されないが、例えば、抗原ポリペプチドをイムノモジュールプレートに固定化し、固定化した抗原ポリペプチドにファージ抗体群

50

を反応させ、結合しなかったファージを洗浄により除去し、抗原ポリペプチドに結合したファージだけを溶出して大腸菌に感染させて増殖させるという操作を数回繰り返す方法がある。パニング選択を行なうことによって、抗原ポリペプチドのみに特異的に結合するファージを濃縮することができる。

【 0 1 0 5 】

なお、このパニング選択の操作は、1回～6回繰り返すことが好ましく、6回繰り返すことがより好ましい。

【 0 1 0 6 】

(工程 (c))

工程 (c) は、上記工程 (b) で得られた抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体のうち、上記 H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を選抜する工程である。

【 0 1 0 7 】

選抜する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、E L I S A 法、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法および分子間相互作用解析等を行なうことができる。

【 0 1 0 8 】

例えば、E L I S A 法を行なう場合は、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる H A 1 抗原ポリペプチドを固相抗原として用いた、上記パニング選択によって濃縮されたファージ抗体について固相 E L I S A を行なうことによって、上記 H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、選抜することができる。

【 0 1 0 9 】

本発明に係る抗体の製造方法では、上記工程 (a) ～ (c) に加えて、得られたファージ抗体をもとにニワトリ型二価抗体を作製する工程 (ニワトリ型二価抗体を作製する方法については、国際公開第 2 0 0 6 / 0 9 3 0 8 0 号パンフレットを参照のこと) 、またはニワトリの天然抗体の可変領域を有するキメラ化抗体を作製する工程 (キメラ化抗体を作製する方法については、日本国公開特許公報「特開 2 0 0 6 - 2 8 2 5 2 1 号公報」および日本国公開特許公報「特開 2 0 0 5 - 2 4 5 3 3 7 号公報」を参照のこと) 、またはニワトリの天然抗体の抗原結合領域を有するヒト化抗体を作製する工程 (ヒト化抗体を作製する方法については、日本国公開特許公報「特開 2 0 0 6 - 2 4 1 0 2 6 号公報」を参照のこと) を含んでいてもよい。

【 0 1 1 0 】

このようなニワトリ型二価抗体またはキメラ化抗体の作製方法として、具体的には、例えば、〔 4 . 組換えベクター 〕において記載した発現用ベクターを用いる方法が挙げられ、好ましくは、H 鎖用発現用ベクターとL 鎖用発現用ベクターとを用い、これらにニワトリ抗体の可変域領域をそれぞれ導入して宿主となる哺乳動物細胞で発現させる方法を挙げることができる。

【 0 1 1 1 】

また、本発明に係る抗体の可変領域を含む抗体断片を作製する場合は、得られたファージ抗体をコードしている D N A を鋳型とした P C R による目的の領域の増幅等を含む方法が挙げられる。例えば、本発明に係る抗体の作製方法は、得られたファージ抗体または二価抗体もしくはキメラ抗体をコードしている D N A を鋳型として、I n v e r s e P C R 法を用いたランダム変異導入、または公知の変異導入法を用いた点変異導入等を行うことによって、目的の部位のアミノ酸配列を変異させる工程を包含していてもよい。

【 0 1 1 2 】

例えば、ニワトリ型二価抗体であれば、ニワトリ由来の試料における非特異的反応が低いと考えられるため、養鶏場などの現場における H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの検出等に好適且つより効果的に用いることができる。

【 0 1 1 3 】

なお、上記工程 (a) ～ (c) を含むものは本発明に係る製造方法の一例であり、本発明に係る他の一例としては、上述の〔 5 . 形質転換体 〕に記載された形質転換体を導入さ

10

20

30

40

50

れた核酸構築物の発現を可能にする条件下で、宿主細胞に適した適切な培養培地中で培養し、次いで、必要に応じて、形質転換体の培養物から、本発明に係る抗体またはその可変領域を含む抗体断片を単離精製する方法が挙げられる。

【 0 1 1 4 】

また、ヒト化抗体であれば、ヒト由来の試料における非特異的反応が低いと考えられるため、ヒトに対する H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの検出方法等に好適に用いることができる。

【 0 1 1 5 】

〔 7 . 本発明に係るキット 〕

本発明に係るキットは、試料中に含まれる H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出するためのキットであって、少なくとも本発明に係る抗体またはその可変領域を含む抗体断片を備えている。本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片については、〔 1 . 本発明に係る抗体 〕で説明した通りである。

【 0 1 1 6 】

また、本発明に係るキットは、本発明に係る抗体またはその可変領域を含む抗体断片以外の、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを認識する少なくとも一種の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をさらに備えていてもよい。例えば、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの H A 2 領域に含まれるアミノ酸配列を有する H A 2 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体およびその可変領域を含む抗体断片が挙げられる。より具体的には、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの H A 2 領域のうち、配列番号 1 7 のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体およびその可変領域を含む抗体断片が挙げられる。このような抗体としては、H 鎖が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、L 鎖が配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列からなる二価の抗 H A 2 抗体および H 鎖が配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、L 鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列からなる二価の抗 H A 2 抗体が挙げられる。また、これらの抗 H A 2 抗体の例としては、上記配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列からなる H 鎖をコードしている D N A が配列番号 1 9 に示される塩基配列からなり、且つ上記配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列からなる L 鎖をコードしている D N A が、配列番号 2 1 に示される塩基配列からなる抗 H A 2 抗体、および上記配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列からなる H 鎖をコードしている D N A が配列番号 2 3 に示される塩基配列からなり、且つ上記配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列からなる L 鎖をコードしている D N A が、配列番号 2 5 に示される塩基配列からなる抗 H A 2 抗体がさらに挙げられる。

【 0 1 1 7 】

本発明に係るキットは、本発明に係る抗体以外にも、イムノクロマトグラフィー法、E L I S A 法およびウエスタンブロット法等の免疫反応を行うために必要な部材（二次抗体、発色試薬、ブロッキング試薬等）、プレート（96 ウェルプレート等）およびチューブ等が含まれていてもよい。またウエスタンブロット法を行うために必要なメンブレン、電気泳動用ゲル、電気泳動装置、プロッティング装置およびプロッティング用試薬等が含まれていてもよい。例えば、本発明に係る抗体を検出するための二次抗体および二次抗体に結合させた標識酵素の基質等を備えていてもよい。

【 0 1 1 8 】

上記二次抗体としては、例えば、アルカリホスファターゼ標識抗 I g G 抗体および西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）標識抗 I g G 抗体等を挙げることができる。なお、用いる抗 I g G 抗体の由来は特に限定されず、目的に応じて適宜選択される。

【 0 1 1 9 】

また、H R P 検出用の基質としては、例えば、O P D、T M B および E C L（Electro-generated chemiluminescence）等を挙げることができる。また、アルカリホスファターゼの基質としては、例えば、ニトロブルーテトラゾリウム（N B T）および 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスファターゼ p - トルイジニル塩（B C I P）の混合基質等を挙げることができる。

【 0 1 2 0 】

また上記キットを構成する成分を格納するための1つ以上の容器（例えば、バイアル、管、アンプルおよびビンなど）が含まれていてもよい。また、上記キットにおいて使用する検出方法について詳細が記載された使用説明書がさらに含まれていてもよい。当該検出方法としては、後述する〔 8 . H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法 〕で説明される検出方法が挙げられる。

【 0 1 2 1 】

本発明に係るキットとしては、例えば、本発明に係る抗体、本発明に係る抗体以外の抗体、および検出感度を高めるために必要な部材を備えた、イムノクロマトグラフィーを利用したキットが挙げられる。

10

【 0 1 2 2 】

〔 8 . H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法 〕

本発明に係る H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法は、本発明に係る抗体またはその可変領域を含む抗体断片と、生体から調製した試料とを反応させる工程を含む。ここで、本発明に係る抗体については、〔 2 . 本発明に係る抗体およびその可変領域を含む抗体断片 〕に記載した通りである。

【 0 1 2 3 】

上述の本発明に係る抗体またはその可変領域を含む抗体断片と、生体から調製した試料とを反応させる工程は、本発明に係る抗体またはその可変領域を含む抗体断片を含む組成物に生体から調製した試料を接触させる工程と、上記抗体またはその可変領域を含む抗体断片を含む組成物と上記試料との間に生じる反応を検出する工程とを含んでいてもよい。

20

【 0 1 2 4 】

上記反応を検出に用いられる手法としては、E L I S A 法、放射線免疫測定法、蛍光免疫測定法、ウエスタンブロット法、イムノクロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法、免疫沈降法、免疫拡散法および赤血球凝集抑制試験等が挙げられる。

【 0 1 2 5 】

上述の反応を検出する方法は、例えば、標識剤で標識された抗体を用いた、サンドイッチ法、競合法および直接吸着法等が挙げられる。これらの方法により、試料中に存在する、目的とする抗原の量を測定することができる。

【 0 1 2 6 】

本発明に係る検出方法に用いる試料としては、特に限定されるものではないが、対象のタンパク質を少なくとも含み得るものであればよい。生体試料としては、例えば、細胞試料、組織試料および拭い液試料が挙げられ、中でも試料採取方法の容易性の観点から、拭い液試料が好ましい。拭い液試料としては、気管の拭い液、咽喉頭の拭い液、口腔の拭い液、および鳥類の総排泄腔の拭い液等が挙げられる。また、最適なウイルス増殖部位がウイルス毎に異なるため、一個体から採取した、気管の拭い液、咽喉頭の拭い液、口腔の拭い液および総排泄腔（鳥類の場合）の拭い液試料を全て検査に用いることが好ましい。生体試料の由来となる生物は、例えば、鳥類、ヒトおよびブタ等の哺乳動物が挙げられる。このうち、好ましくは、鳥類であり、鳥類のうち、より好ましくは家禽のニワトリである。

40

【 0 1 2 7 】

採取された生体試料は、必要に応じてタンパク質を抽出する操作を行ってからか、または、不要な成分を除去する操作を行ってから、検査に供してもよい。

【 0 1 2 8 】

また、得られた生体試料は、必要に応じて凍結保存等の、生体試料の種類に適した方法で保存してもよい。

【 0 1 2 9 】

また、本発明に係る検出方法は、本発明に係る抗体以外の、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを認識する少なくとも一種の抗体またはその可変領域を含む抗体断片と、生体から調製した試料とを反応させる工程をさらに含んでいてもよい。本発明に係る抗体およ

50

びその可変領域を含む抗体断片以外の抗体およびその可変領域を含む抗体断片については、〔 7 . 本発明に係るキット 〕に記載した通りである。

【 0 1 3 0 】

本発明に係る検査方法は、さらに、上記生体試料におけるウイルスの存在の有無を判定するか、上記生体試料における H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの量、より具体的には、生体試料の単位量あたりに含まれる H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの量を測定する工程を含んでいてもよい。ここで H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの量とは、例えば H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスタンパク質の量である。

【 0 1 3 1 】

但し、生体試料の単位量あたりに含まれる H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの量を測定するという概念には定量的測定および定性的測定の両方が含まれ、濃度測定その他、対照と比較可能な形式で H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの量を提示することが含まれる。より具体的には、例えば、検量線等を用いて濃度換算する以前の取得した時点でのデータ比較、または H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの量がある一定の閾値を超えているか否かという形式での結果の提示等も含まれる。

10

【 0 1 3 2 】

また、本発明に係る H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法は、対象となる個体における、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの感染の可能性を判定する工程を包含していてもよい。

【 0 1 3 3 】

ここで、「H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスの感染の可能性を判定する」とは、対象となる生物個体について、当該インフルエンザを発症しているか否かにかかわらず、当該インフルエンザウイルスに感染しているか否かを判定することを指す。

20

【 0 1 3 4 】

また、ここで、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスによって引き起こされる鳥インフルエンザの発症とは、対象となる生物に、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスが感染することによって、当該感染した生物に鳥インフルエンザの症状が生じることを指している。鳥インフルエンザのニワトリにおける症状としては、沈うつ、肉冠、肉垂および脚部のチアノーゼ、顔面浮腫、神経症状、羽毛削ごう、ならびに下痢などの症状が挙げられる。

【 0 1 3 5 】

当該判定する工程として、具体的には、例えば、対象となる生物がニワトリの場合、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを排泄しているか否かを判定する工程が挙げられる。

30

【 0 1 3 6 】

当該判定方法としては、顕性化したウイルス由来物質について、上述した H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する工程において用いられる手法において得られた発色および数値等のデータの目視により判定する方法が挙げられる。

【 0 1 3 7 】

当該工程を行うことにより、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスによって引き起こされる鳥インフルエンザを発症する前に、感染しているか否かを知ることができる。

【 0 1 3 8 】

判定の一例では、健常な対照と比較して被験個体の生体試料における当該ウイルスの量があらかじめ規定した閾値を超えた場合、被験個体は、H 5 亜型鳥インフルエンザウイルス感染によってウイルスを排泄していると判定される。なお、ウイルスの量があらかじめ規定した閾値を超えることは、定量的測定による結果であっても定性的測定による結果であってもよく、具体的な数値の比較はもちろん、相対的な量の比較（実際に量を算出する必要は無く、ある基準より高いか低いかを判断する）も含む概念である。

40

【 0 1 3 9 】

対照試料の上記検査は、被験個体の試料の検査と同時にに行われてもよく、また別々に行われてもよい。すなわち、被験個体の数値と比較される対照試料の数値は、被験個体の試料が検査されるときとは異なるときに行われた検査で得られた値であってもよい。また、

50

対照試料の検査は、被験個体の検査を行う個体自身が行う必要は無く、例えば、既に取得されデータベース等に蓄積されている対照試料の検査値を閾値として用いることもできる。

【0140】

判定に用いられる対照試料の数値については、健常個体の試料の数値を直接利用してもよく、一定の人数の健常個体の試料の数値を母集団としたときに得られる平均値を利用してもよい。また、カットオフ値をあらかじめ設定しておき、被験個体の数値とこのカットオフ値とを比較してもよい。

【0141】

このような方法により、H5亜型鳥インフルエンザウイルスに感染の可能性を早期に判定できるため、H5亜型鳥インフルエンザウイルス感染個体を有している農場内および当該農場から他の家禽農場への感染拡大を最小限に食い止める為の早期初動対応をとることができる。

10

【0142】

本発明に係るH5亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法によれば、既存の検出方法よりも試料中に含まれるH5亜型鳥インフルエンザウイルスを特異的に、正確、迅速且つ高感度に検出することができる。

【0143】

〔9. まとめ〕

本発明は以下の何れかの一態様を包含する。

20

<1> H5亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニンHA1領域のうち、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合することの特徴とする、抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

<2> 重鎖可変領域中に、配列番号4に示されるCDR1、配列番号5に示されるCDR2および配列番号6または配列番号46に示されるCDR3のすべてを含んでおり、且つ、軽鎖可変領域中に、配列番号7に示されるCDR1、配列番号8に示されるCDR2および配列番号9に示されるCDR3のすべてを含んでいることを特徴とする、<1>に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

<3> 重鎖可変領域が、配列番号2に示されるアミノ酸配列、または、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1~13個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ軽鎖可変領域が、配列番号3に示されるアミノ酸配列、または、配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、<1>または<2>に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

30

<4> 重鎖可変領域が、配列番号45に示されるアミノ酸配列からなり、且つ

軽鎖可変領域が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、<3>に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

<5> 以下の(1)~(4)の何れかに示す、H5亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニンHA1領域のうち、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合することの特徴とする、<1>~<4>のいずれかに記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片：(1)配列番号1または配列番号44に示されるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、(2)配列番号1または配列番号44に示されるアミノ酸配列において1~35個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、(3)配列番号1または配列番号44に示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有する抗体またはその可変領域を含む抗体断片、(4)上記(1)に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

40

50

< 6 > 下記の (a) ~ (c) の工程を含む製造方法によって得られたことを特徴とする、< 1 > ~ < 5 > のいずれかに記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片：

(a) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程；(b) 上記工程 (a) で免疫したトリから上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および (c) 上記工程 (b) で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

< 7 > 一本鎖可変領域断片または二価抗体であることを特徴とする、< 1 > ~ < 6 > のいずれかに記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

< 8 > 重鎖が配列番号 26 または配列番号 52 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、軽鎖が配列番号 28 に示されるアミノ酸配列からなる二価抗体であることを特徴とする、< 1 > ~ < 7 > のいずれかに記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

< 9 > < 1 > ~ < 8 > のいずれかに記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードすることを特徴とする、ポリヌクレオチド。

< 10 > < 9 > に記載のポリヌクレオチドを有することを特徴とする、組換えベクター。

< 11 > < 9 > に記載のポリヌクレオチドまたは < 10 > に記載の組換えベクターが導入されていることを特徴とする、形質転換体。

< 12 > H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン H A 1 領域のうち、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を製造する方法であって、下記の (a) ~ (c) の工程を含むことを特徴とする、方法：(a) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程；(b) 上記工程 (a) で免疫したトリから上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および (c) 上記工程 (b) で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

< 13 > 上記抗体は、一本鎖可変領域断片または二価抗体であることを特徴とする、< 12 > に記載の方法。

< 14 > 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

< 15 > 試料中に含まれる H5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出するためのキットであって、< 1 > ~ < 8 > のいずれかに記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片を備えていることを特徴とする、キット。

< 16 > 試料中に含まれる H5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法であって、< 1 > ~ < 8 > のいずれかに記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片と、生体から調製した試料とを反応させる工程を含むことを特徴とする、方法。

< 17 > 上記試料は、気管、咽喉頭、口腔または総排泄腔の、拭い液であることを特徴とする < 16 > に記載の方法。

< 18 > 鳥インフルエンザウイルスのうち H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのみに特異的に結合することを特徴とする、抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

< 19 > H5 亜型鳥インフルエンザウイルスに特異的に結合し、かつ H1 ~ H4 および H6 ~ H16 亜型鳥インフルエンザウイルスに特異的に結合しないことを特徴とする、抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

< 20 > 上記 H5 亜型鳥インフルエンザウイルスは H5 N1 亜型鳥インフルエンザウイルスであることを特徴とする、< 18 > または < 19 > に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

< 21 > H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン H A 1 領域における、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列で示される領域に特異的に結合することを特徴とする

10

20

30

40

50

、 < 1 8 > ~ < 2 0 > のいずれかに記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【 0 1 4 4 】

以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。

【実施例】

【 0 1 4 5 】

10

〔実施例 1：野生型抗体の作製および反応性の評価〕

（ 1 - 1 . 抗体の作製 ）

< ニワトリの免疫および免疫ニワトリ脾臓からの s c F v ファージ抗体ライブラリーの作製 >

60日齢のメスのニワトリに、H5亜型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンの合成ポリペプチド：HA1抗原ポリペプチド（“ペプチド番号：1111059N-1”）（配列番号10）を免疫した（0.3mg/羽）。一次免疫には完全フロイントアジュバンド（014-09541、Wako）、二次および三次免疫には不完全フロイントアジュバンド（011-09551、Wako）を用いて抗原を免疫した。4回目の免疫はPBS（phosphate buffered saline）に希釈した抗原を静脈注射した。4回目の免疫から3日後にニワトリの脾臓を回収し、Ficoll paque PLUS（17-1440-03、GE Healthcare）を用いた密度勾配遠心によりリンパ球を単離し、得られたリンパ球からTRIzol Reagent（15596026、Life Technologies）を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAからPrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（6210A、TAKARA）を用いたRT-PCRによりcDNAの合成を行い、s c F v ファージライブラリーを作製した。s c F v ファージライブラリーの作製は、参考文献：“Nakamura et al., J Vet Med Sci. 2004 Ju;66 (7): 807-814”に記載の方法に従って行った。

20

【 0 1 4 6 】

上述の工程の模式図を図1に示す。図1は、抗体の作製方法における一工程を示す図であり、上述のニワトリの免疫および免疫ニワトリ脾臓からのs c F v ファージ抗体ライブラリーの作製の工程を示している。

30

【 0 1 4 7 】

< パニング選択 >

s c F v ファージ抗体ライブラリーを用いて、合成ペプチドを固相化したプレートによるパニングを行った。パニングは参考文献：“Nakamura et al., J Vet Med Sci. 2004 Ju;66 (7): 807-814”に記載の方法に従って行った。5回パニングを行った後、ライブラリーの反応性を、合成ペプチドを固相化したプレートを用いたELISAによって確認し、反応性が上昇し始めたライブラリーからファージのスクリーニングを行った。スクリーニングの手法は以下の通りである。ファージを大腸菌に感染させてアンピシリン（50μg/ml、nacalai）を含む2×YT Agar plateにプレーティングし、得られたコロニーをアンピシリン含有2×YT液体培地中で培養した。ヘルパーファージに感染させた後、アンピシリン（50μg/ml）、カナマイシン（25μg/ml、明治製菓株式会社）、IPTG（100μg/ml、nacalai）含有2×YT液体培地中でファージの誘導を行った。得られた培養上清中のs c F v ファージ抗体の反応性を、抗原HA1固相化プレートを用いたELISAによって確認した。

40

【 0 1 4 8 】

上述の工程の模式図を図2に示す。図2は、抗体の作製方法における一工程を示す図であり、s c F v ファージライブラリーの、パニング選択の工程を示している。

【 0 1 4 9 】

続いて、上述のライブラリーのスクリーニングを行った。スクリーニングは以下の< E

50

L I S A > の項目に示す、E L I S A 法を用いて行った。

【 0 1 5 0 】

< E L I S A >

スクリーニングでは、5 μ g / m l の合成ペプチドを含む P B S を 5 0 μ l / ウェルで 9 6 ウェルプレート (442404、Thermo) に入れ、一晚、4 で抗原を固相化した。固相化の後、2 5 %Block Ace (UK-B80、DSファーマバイオメディカル) を含む P B S でウェルをブロッキングし、s c F v ファージ抗体を含む培養上清を反応させた。二次抗体として、H R P 標識 Goat anti-chickenIgG (H+L) (14-24-06 、KPL) を 1 0 %Block Ace に 1 0 0 0 倍希釈した溶液を加え、基質として用いた O P D の発色をプレートリーダー (Model 680、BIO-RAD社) で 4 9 0 n m および 6 3 0 n m の吸光度を測定した。

10

【 0 1 5 1 】

上述の工程の模式図を図 3 に示す。図 3 は、本発明の実施例に係る、抗体の作製方法における一工程を示す図であり、s c F v ファージライブラリーの、E L I S A を用いたスクリーニングの工程を示している。

【 0 1 5 2 】

さらに、上述の工程で得られた陽性クローンを選択し、D N A シークエンサー (ABI PRISM 3100 - Genetic Analyzer、Applied Biosystems) を用いてシーケンスを行うことによって、選択された陽性クローンのうち、陽性クローン番号 No. 6-2-5 のアミノ酸の配列を決定した。シーケンスに用いたプライマーを配列番号 1 1 および配列番号 1 2 として示し、No. 6-2-5 のアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。また、No. 6-2-5 の H 鎖および L 鎖における C D R 1、2 および 3 の配列を図 4 に示す。図 4 は、得られた抗体のアミノ酸配列の可変領域を示す図である。

20

【 0 1 5 3 】

< 組換えマウス / ニワトリキメラ (I g G 1) 抗体発現ベクターへの組換え >

上記で選択したクローンの s c F v 抗体をコードする D N A 鎖を鋳型にして、ニワトリ由来抗体遺伝子 H 鎖可変領域および L 鎖可変領域の P C R 増幅を行った後、P C R 産物を S a c I I および N h e I 制限酵素処理 (R0157S、R0131S、BioLabs) し、H 鎖可変領域および L 鎖可変領域のそれぞれについて、同じように制限酵素処理したマウス / ニワトリキメラ抗体 (I g G 1) 発現ベクター (H 鎖用発現ベクター : pcDNA4 / myc-His、L 鎖用発現ベクター : pcDNA3 / myc-His、Invitrogen) に組換えた。作製した H 鎖および L 鎖のコンストラクトをほ乳類培養細胞にトランスフェクトした後、発現した抗体 (抗 H A 1 マウス / ニワトリキメラモノクローナル抗体) の精製を ProteinG Sepharose 4 Fast Flow (17-018 -02、GE healthcare) を用いて行った。以上により、本発明に係る二価抗体のクローンを得た (No. 6-2-5)。得られた No. 6-2-5 の二価抗体の H 鎖全長のアミノ酸配列を配列番号 2 6 に、H 鎖全長の塩基配列を配列番号 2 7 にそれぞれ示す。また、L 鎖全長のアミノ酸配列を配列番号 2 8 に、L 鎖全長の塩基配列を配列番号 2 9 にそれぞれ示す。なお、以降、実施例 1 で得られた No. 6-2-5 の配列を野生型とし、以下の実施例 2 においてこれを改変した配列を変異型配列として記載する。

30

【 0 1 5 4 】

上述の工程の模式図を図 5 に示す。図 5 は、抗体の作製方法における一工程を示す図であり二価抗体発現ベクターへの組換えによる二価抗体の作製の工程を示している。

40

【 0 1 5 5 】

得られた精製抗体を 5 ~ 2 0 % の c-Page1 (C520L、ATTO社) を用いて S D S - P A G E 電気泳動を行い、C B B 染色 (178-00551、Wako) によってその精製度を確認した。

【 0 1 5 6 】

結果を図 6 に示す。図 6 は、野生型の二価抗体タンパク質を電気泳動後に C B B 染色した結果を示す図である。

【 0 1 5 7 】

なお、上述の組換えに関しては、参考文献 : “ Tateishi et al., J Vet Med Sci. 2008 Apr;70(4): 397-400 ” に記載の方法に従った。また、H 鎖可変領域の P C R に用いたプ

50

ライマー配列を配列番号 13 および配列番号 14 に、L 鎖可変領域の PCR に用いたプライマー配列を配列番号 15 および配列番号 16 にそれぞれ示す。

【0158】

(1-2. H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス抗体の活性測定)

抗体価の測定については、以下の通り行った。5 μ g/ml の recombinant hemagglutinin (rHA) (H5N1 ウイルス由来、A/Vietnam/1203/2004、CT6450、Protein Sciences Corp.) またはウシ血清アルブミン (BSA (bovine serum albumin)) を含む PBS を同様に固相化し、ブロッキング後にマウス/ニワトリキメラ抗体の精製抗体 (No. 6-2-5) を、0 ~ 2 μ g/ml の濃度で反応させた。二次抗体として HRP 標識 Goat anti-mouse IgG (H+L) (474-1806、KPL 社) を用い、上記 2. と同様にして抗体の反応性を検出した。結果を図 7 に示す。図 7 は、野生型の二価抗体の抗体価を示す図である。

10

【0159】

(1-3. 抗体結合特異性の評価)

異なる株の H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス、および H5 以外の亜型鳥インフルエンザウイルスと本発明に係る抗体の反応性の測定を、以下の方法を用いて行った。

【0160】

10 μ g/ml の各種ウイルス、rHA または BSA のいずれかを含有する PBS を上記と同様に固相化し、ブロッキング後にマウス/ニワトリキメラ本発明に係る抗体の精製抗体 (No. 6-2-5) を 2 μ g/ml の濃度で反応させた。二次抗体に HRP 標識 Goat anti-mouse IgG (H+L) を用い、上記 2. と同様にして検出した。結果を図 8 に示す。図 8 は、野生型の二価抗体の H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスの変異体および複数種類の H5 以外の鳥インフルエンザウイルス亜型に対する抗体結合性を示す図である。図 8 に示されるように、本実施例で得られた野生型の精製二価抗体 (No. 6-2-5) は H5 亜型以外の鳥インフルエンザウイルスに対する結合性はほぼない一方、何れの H5 亜型の鳥インフルエンザウイルスに対しても結合性が高く、特異性があることが示された。

20

【0161】

[実施例 2: 変異型抗体の作製および反応性の評価]

(2-1. 抗体の作製)

< 変異ライブラリーの作製 >

上述のクローン番号 No. 6-2-5 の H 鎖を鋳型として、Inverse PCR 法を用いて No. 6-2-5 の H 鎖の CDR3 に 9 塩基ずつランダムな変異を導入したランダム変異体を 7 種類作製した (SMK-101、TOYOBO)。用いたプライマーセットは配列番号 30 ~ 43 に示す。

30

【0162】

得られた 7 種類のランダム変異体の H 鎖の可変領域および L 鎖の可変領域をそれぞれ PCR で増幅したものをリンカーでつなぎ合わせ、scFv ファージライブラリーを作製した。scFv ファージライブラリーの作製方法の詳細は、参考文献: "Nakamura et al., J Vet Med Sci. 2004 Ju;66 (7): 807-814" に記載の方法に従って行った。

【0163】

< パニング選択 >

scFv ファージ抗体ライブラリーを用いて、rHA (11700-V08H、Sino Biological Inc.) に対するパニングを行った。パニングは参考文献: "Nakamura et al., J Vet Med Sci. 2004 Ju;66 (7): 807-814" に記載の方法に従って行った。4 回パニングを実施した後、反応性の上昇を ELISA によって確認した。反応性が上昇してきた 2 回目のパニングライブラリからスクリーニングを実施した。スクリーニングは、[実施例 1] における (1-1. 抗体の作製) < パニング選択 > に記載の方法と同様の方法を用いて行った。

40

【0164】

外部委託によって、配列確認を実施した (ユーロフィンジェノミクス)。その結果、新規な配列の抗体の取得が確認できた。新規取得クローン No. 6-2-5-21 の単鎖抗体全長のアミノ酸配列を配列番号 44 に示す。新規に取得されたクローンである No. 6-2-5-21 の配列

50

は、No. 6-2-5と比較して、H鎖のCDR3の配列以外は同一の配列を有していた。No. 6-2-5-21のH鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号45に、CDR3のアミノ酸配列を配列番号46に、CDR3の塩基配列を配列番号47にそれぞれ示す。さらに、No. 6-2-5-21のH鎖におけるCDR3の配列を図9に示す。図9は、野生型抗体No. 6-2-5のH鎖のCDR3のアミノ酸配列と変異型抗体No. 6-2-5-21のH鎖のCDR3のアミノ酸配列とのアライメントを示す図である。

【0165】

<二価抗体への組換え>

次に、新規に取得されたクローンであるNo. 6-2-5-21の二価抗体への組換えを行った。まず、新規に取得されたクローンであるNo. 6-2-5-21のscFv抗体をコードするDNA鎖を鋳型にして、ニワトリ由来抗体遺伝子H鎖可変領域およびL鎖可変領域のPCR増幅を行った後、SacII (R0157S、BioLabs) およびNheI (R0131S、BioLabs) で制限酵素処理したマウス/ニワトリキメラ抗体 (IgG1) 発現ベクター (H鎖用発現ベクター: pcDNA4/myc-His、L鎖用発現ベクター: pcDNA3/myc-His、Invitrogen) に、GeneArt (登録商標) Seamless Cloning and Assembly (A14606、lifetechnologies) を用いて組換えた。実施例1と同様に、使用したマウスキメラ発現ベクターはTateishi et al., J Vet Med Sci. 2008 Apr;70(4): 397-400に記載されているベクターを使用した。可変領域増幅用プライマーの配列を配列番号48~51に示す。

【0166】

<二価抗体の製造>

作製したH鎖およびL鎖のコンストラクトを、ほ乳類培養細胞にExpi293Expression system (Cat#A14635、Invitrogen) を用いてトランスフェクトした後、発現した抗体の精製をProtein G Sepharose 4 Fast Flow (17-018-02、GE healthcare) を用いて行った。以上により、本発明に係る変異型の二価抗体のクローンを得た (No. 6-2-5-21)。得られた精製抗体を各種結合活性の測定に用いた。なお、得られたNo. 6-2-5-21の二価抗体のH鎖全長のアミノ酸配列を配列番号52に、H鎖全長の塩基配列を配列番号53にそれぞれ示す。また、L鎖全長のアミノ酸配列および塩基配列は、野生型No. 6-2-5の配列と同一であった。

【0167】

(2-2. 変異型抗体の活性測定)

<ELISAを用いた二価抗体の反応性評価>

5 µg/mlのrHA (11700-V08H、Sino Biological Inc.) を含むPBSを50 µl/ウェルの濃度で96ウェルプレート (442404、Thermo) に入れ、一晚、4℃で抗原を固相化させた。固相化の後、25% Block Ace (UK-B80DS、ファーマバイオメディカ) を含むPBSでウェルを37℃で1時間ブロッキングした。PBS-Tで1回洗浄した後、1 µg/mlの濃度から段階希釈をしたNo. 6-2-5またはNo. 6-2-5-21を含むPBSを37℃で1時間反応させた。二次抗体として、HRP標識Goat anti-mouse IgG (H+L) (474-1806、KPL) を10% Block Aceに1000倍希釈した溶液に加え、基質として用いたOPDの発色をプレートリーダー (Model 680、BIO-RAD) で490 nmおよび630 nmの吸光度を測定した。結果を図10に示す。図10は、変異型の二価抗体の抗体価を示す図である。

【0168】

<Biacoreを用いた二価抗体の反応性評価>

Biacore (Biacore T200、GE Healthcare) を行い、No. 6-2-5およびNo. 6-2-5-21のrHA (11700-V08H、Sino Biological) に対する親和性を評価した。No. 6-2-5およびNo. 6-2-5-21のFc部位はマウス型であるため、Mouse Antibody Capture Kit (BR-1008-38、GE Healthcare) を用いて、親和性を測定した。具体的には、メーカー提供の標準プロトコルに従い、NHSEDCを使用し、CM5チップ表面のフリーカルボキシル基を利用したアミンカップリング法によって、ウサギ抗マウスポリクローナル抗体をCM5チップ表面に固定化した。次に、No. 6-2-5およびNo. 6-2-5-21をウサギ抗マウスポリクローナ

ル抗体にキャプチャーした。Biacore T200に種々の濃度の r H A を供し、カインेटイクスセンサーグラムを作成し、結合定数を計算した。結果を以下の表 1 に示す。

【 0 1 6 9 】

【 表 1 】

	Ka(1/Ms)	Kd(1s)	KD(M)
No.6-2-5	4.950E+4	7.932E-4	1.603E-8
No.6-2-5-21	4.324E+4	5.703E-4	1.319E-8

10

(2 - 3 . 抗体結合特異性の評価)

H 5 亜型以外の亜型の鳥インフルエンザウイルスと No. 6-2-5-21 抗体の反応性の測定を、以下の方法を用いて行った。

【 0 1 7 0 】

5 μ g / m l の H 5 亜型および H 5 以外の各亜型の r H A を含む P B S を上記と同様に固相化し、ブロッキング後にマウス/ニワトリキメラ抗体 No. 6-2-5-21 を 1 μ g / m l の濃度で反応させた。二次抗体に H R P 標識 Goat anti-mouse IgG (H+L) を用い、< E L I S A を用いた二価抗体の反応性評価 > と同様に検出した。結果を図 1 1 に示す。図 1 1 は変異型の二価抗体の、各亜型鳥インフルエンザウイルスに対する抗体結合性を示す図である。

20

【 0 1 7 1 】

[参考例]

(1 . H A 1 抗原ポリペプチドの配列の解析)

N C B I のインフルエンザウイルスリソース (ウェブページ : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>) から、19795 個の鳥インフルエンザウイルスの H A 遺伝子のアミノ酸配列を取得した。なお、これらの全 H A 遺伝子は、H 1 ~ H 16 までの全亜型を含んでいる。遺伝子解析ソフトウェアである BioEdit (ウェブページ : <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) を用いて配列のアライメントを作成し、H 1 ~ H 16 の各亜型のコンセンサス配列をそれぞれ作成した。立体構造解析ソフトウェアである Pymol (ウェブページ : <http://www.pymol.org/>) を用い、プロテインデータバンク (ウェブページ : <http://pdbe.org/>) に登録されている H 5 亜型の H A タンパク質 (PDB ID: 2IBX) の立体構造と H 5 亜型のアミノ酸の配列とを比較した。

30

【 0 1 7 2 】

図 1 2 は、H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスの抗原として用いた合成ポリペプチドの配列 (右) および H A タンパク質の立体構造 (左) を示す図である。

【 0 1 7 3 】

図 1 2 に示すように、本実施例の抗体作製に用いた抗原ポリペプチドは、配列番号 10 として示す 16 個のアミノ酸からなるアミノ酸配列は、H A 1 領域のうち、H 5 N 1 亜型の異なるクレード 0 ~ 9 の株間で保存されていた。また、このアミノ酸配列は、N C B I に登録されている 1997 年以降に分離された 2812 株の H 5 亜型の 99.4 % において、保存されていた。

40

【 0 1 7 4 】

また、図 1 2 にも示されている通り、この 16 個のアミノ酸からなるアミノ酸配列は、H 5 亜型の異なる株間において高く保持され、且つ立体構造上タンパク質の表面に出ている。

【 0 1 7 5 】

(2 . H 1 ~ H 16 の亜型鳥インフルエンザウイルス間および H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスに存在しているすべてのクレード間の配列同一性)

50

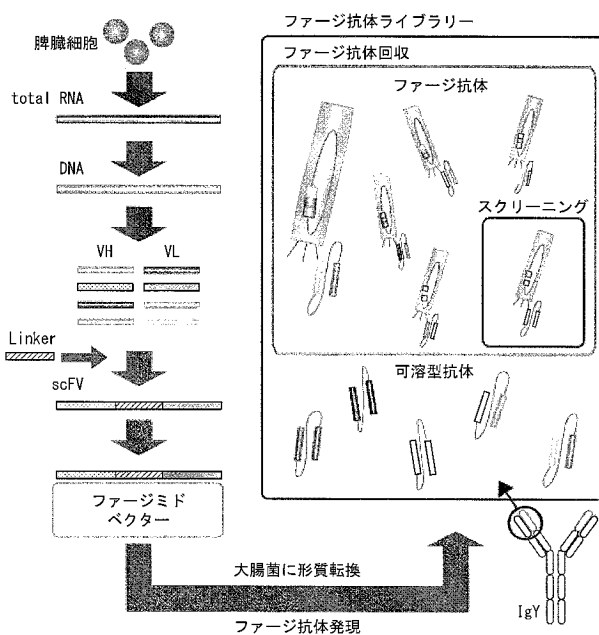
H 1 ~ H 1 6 の亜型鳥インフルエンザウイルスにおいて、N C B I のインフルエンザウイルスリソース（ウェブページ：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>）から、H 1 亜型について 8 7 8 1 個、H 2 亜型について 2 3 1 個、H 3 亜型について 4 5 3 6 個、H 4 亜型について 6 0 8 個、H 5 亜型について 2 8 1 2 個、H 6 亜型について 6 8 7 個、H 7 亜型について 7 8 7 個、H 8 亜型について 6 5 個、H 9 亜型について 7 3 9 個、H 1 0 亜型について 1 9 0 個、H 1 1 亜型について 1 8 7 個、H 1 2 亜型について 8 4 個、H 1 3 亜型について 5 3 個、H 1 4 亜型について 4 個、H 1 5 亜型について 1 2 個、H 1 6 亜型について 1 9 個の鳥インフルエンザウイルスの H A 遺伝子全長のアミノ酸配列を取得した。続いて、H 1 ~ H 1 6 亜型それぞれのアミノ酸配列のコンセンサス配列を亜型毎に作成し、遺伝子解析ソフトウェア GENETYX-MAC ver.17（株式会社ゼネティクス）を用いて、それらのアミノ酸のコンセンサス配列について、H 1 ~ H 1 6 のすべての亜型間の配列同一性を調べた。また、H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスに存在するすべてのクレードについて、すべてのクレード間の配列同一性を調べた。ただし、各クレードの配列は、それぞれ図 1 3 に記載した株のアミノ酸配列を用いた。結果を図 1 3 に示す。図 1 3 は、H 1 ~ H 1 6 亜型鳥インフルエンザウイルスにおけるすべての亜型間および H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスに存在しているすべてのクレード間の配列同一性を示す図である。（a）は H 1 ~ H 1 6 亜型鳥インフルエンザウイルスにおけるすべての亜型間の配列同一性を示しており、（b）は、H 5 N 1 亜型鳥インフルエンザウイルスに存在しているすべてのクレード間の配列同一性を示している。

10

【 図 1 】

図 1

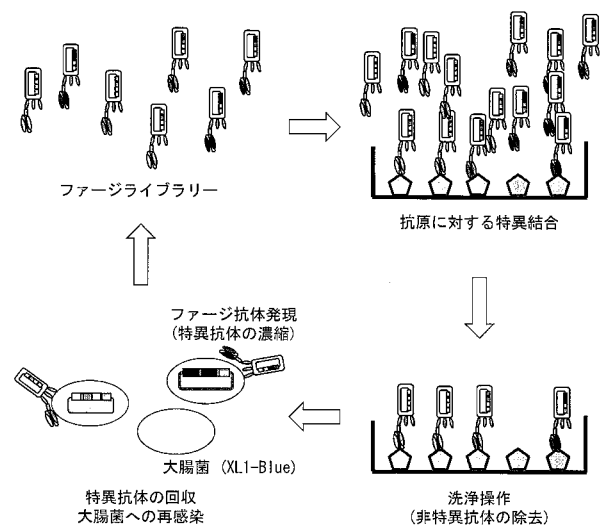
単鎖ニワトリ抗体ライブラリーの作製



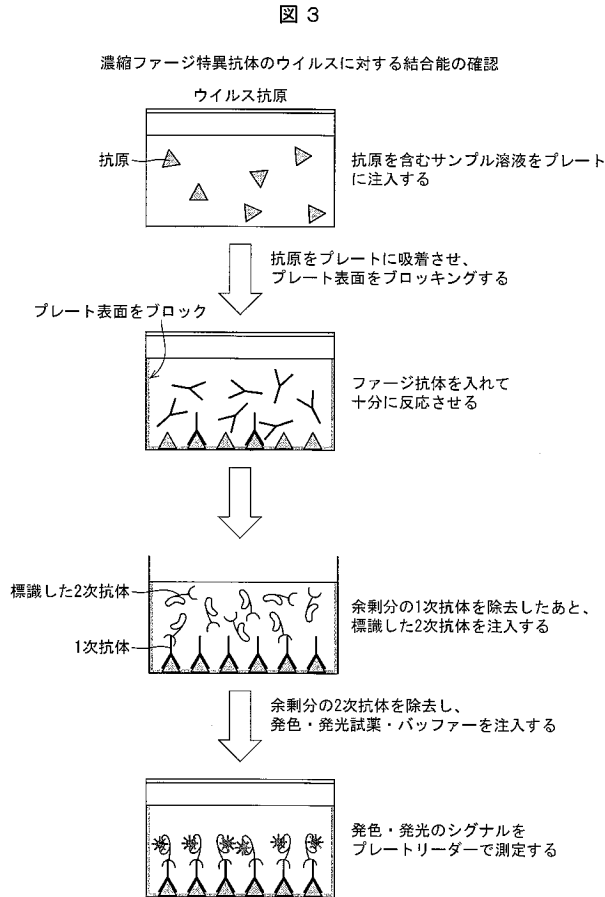
【 図 2 】

図 2

ファージライブラリーからの濃縮と、クローンの確立



【 図 3 】

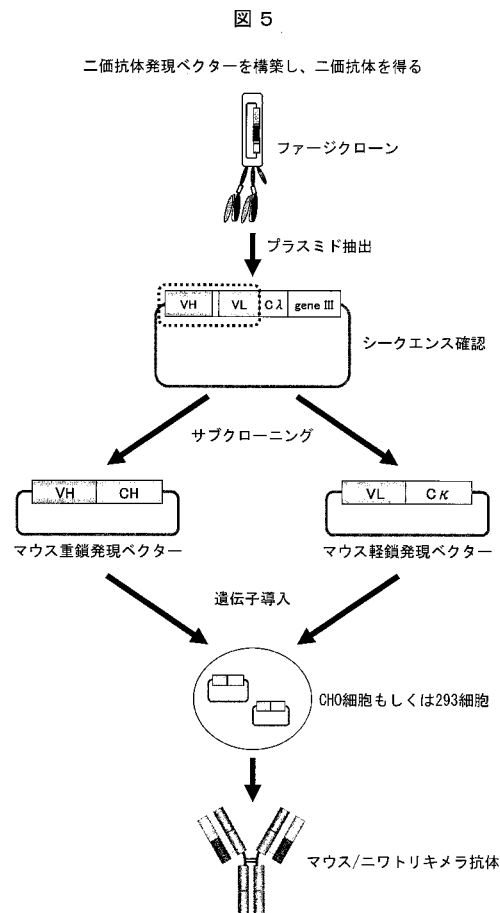


【 図 4 】

図 4

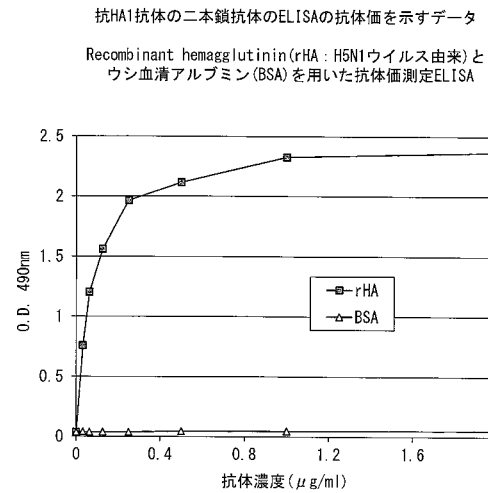
	H鎖CDR1	H鎖CDR2	
1:	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFS	SYAMN	WVRQAPGKGLEWVA
			GIYSDGSGTDY
60:			
61:	GS	AVKGRATISRDNGQSTVRLQLNLR	RAEDTATYYCA
			AAGRCSSYGYSCAFGGTIDAW
120:			
121:	GHGTEVIVST	GGGSGGGSGGGSGGGSD	VALTQPASVSANPGETVKITC
			SGGSSSYCY
180:			
181:	KSPGSAPVTIV	W	NDKRPSNIPS
			RFSGSKSGSTATI
			TTTGVR
			AEDEAVVFC
			GNADG
240:			
241:	AFGAGTTLTVL		

【 図 5 】



【 図 7 】

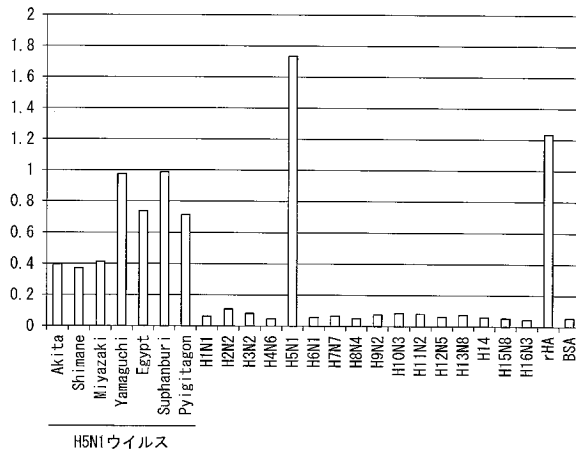
図 7



【図 8】

図 8

抗HA1抗体の鳥インフルエンザウイルスH5亜型の変異体および
複数の鳥インフルエンザウイルス亜型に対する抗体結合性をELISAにより
試験したデータ



rHA:recombinant hemagglutinin
(H5N1ウイルス由来の組換えヘマグルチニン、ポジティブコントロール)
BSA:bovine serum albumin(ネガティブコントロール)

【図 9】

図 9

	H鎖CDR3
No. 6-2-5	AAGRCSSYSYGYSCAFGGTIDA
No. 6-2-5-21	AAGRCSSRRVGYSCAFGGTIDA

【図 1 3】

図 13

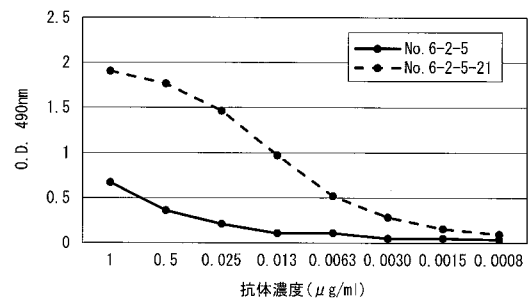
Clade	0	1	2.1.1	2.1.2	2.1.3	2.2	2.3.1	2.3.2	2.3.3	2.3.4	2.4	2.5	3	4	5	6	7	8	9
0	100	94	95	95	94	92	94	92	94	93	94	95	97	95	97	96	95	96	96
1	94	100	98	95	95	92	95	91	95	94	96	95	95	95	98	95	94	96	95
2.1.1	95	96	100	97	97	94	97	93	97	96	97	98	97	95	97	96	95	98	97
2.1.2	95	95	97	100	96	94	96	93	96	96	96	97	97	95	96	95	96	97	96
2.1.3	94	95	97	96	100	93	96	93	95	95	96	96	96	94	97	96	96	97	97
2.2	92	92	94	94	93	100	93	92	93	93	93	93	93	93	92	93	92	94	93
2.3.1	94	95	97	96	96	93	100	94	98	97	98	97	96	93	96	95	94	97	96
2.3.2	92	91	93	93	93	92	94	100	94	93	93	93	93	91	92	92	91	93	92
2.3.3	94	95	97	96	95	93	98	94	100	98	96	97	97	94	96	95	95	97	96
2.3.4	93	94	96	96	95	93	97	93	98	100	95	95	96	93	96	95	95	96	96
2.4	94	96	97	96	96	93	98	93	96	95	100	96	96	94	95	95	95	97	95
2.5	95	95	98	97	96	94	97	93	97	95	96	100	96	94	97	96	95	98	96
3	97	95	97	97	96	93	98	93	97	96	96	96	100	97	98	97	98	99	96
4	95	95	95	95	94	92	93	91	94	93	94	94	97	100	96	95	95	96	96
5	97	96	97	96	97	95	96	92	96	95	95	97	99	96	100	98	95	98	98
6	96	93	96	95	96	93	95	92	95	95	95	95	97	95	98	100	95	98	96
7	95	94	95	96	96	92	94	91	95	95	95	95	99	96	98	95	100	97	97
8	96	95	96	97	97	94	97	93	97	96	97	98	99	99	96	98	97	100	99
9	96	95	97	96	97	93	96	92	95	96	95	96	99	99	99	98	97	99	100

Clade 0 : A/Hong Kong/156/1997	Clade 2.3.2 : A/hosper swan/Wita/1/2008	Clade 5 : A/goose/Guangxi/814/2004
Clade 1 : A/duck/Vietnam/2/2007	Clade 2.3.3 : A/chicken/Guizhou/3055/2005	Clade 6 : A/duck/Hubei/16/2002
Clade 2.1.1 : A/chicken/Indonesia/7/2003	Clade 2.3.4 : A/Flt Nam/H6/1242/2007	Clade 7 : A/Beijing/1/2003
Clade 2.1.2 : A/Indonesia/100596/2006	Clade 2.4 : A/chicken/Turkey/493/2005	Clade 8 : A/chicken/Korea/81.3/2002
Clade 2.1.3 : A/Indonesia/100340/2006	Clade 2.5 : A/chicken/Tanaguchi/7/2004	Clade 9 : A/goose/Shantou/1821/2005
Clade 2.2 : A/Egypt/1394/HMR/2007	Clade 3 : A/Phasant/Hong Kong/F1155/2001	
Clade 2.3.1 : A/duck/Hunan/1127/2006	Clade 4 : A/goose/Guizhou/337/2006	

Subtype	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16
H1	100	16	22	13	21	18	20	13	23	12	17	14	14	15	15	19
H2	16	100	13	12	16	8	21	10	18	14	20	12	11	18	11	15
H3	22	13	100	20	13	21	14	14	23	17	12	20	10	11	15	13
H4	13	12	20	100	16	12	11	15	18	13	15	9	19	16	13	12
H5	21	16	13	16	100	16	12	12	18	16	13	12	8	13	11	11
H6	18	8	21	12	16	100	10	9	36	15	15	14	15	11	17	19
H7	20	21	14	11	12	10	100	16	15	17	16	14	15	18	19	16
H8	13	10	13	15	12	9	16	100	17	8	12	13	19	11	12	14
H9	23	16	23	18	18	36	15	17	100	16	12	16	7	16	16	14
H10	12	14	17	13	18	15	17	8	16	100	14	15	12	20	23	12
H11	17	20	12	15	13	15	16	12	12	14	100	15	19	17	13	22
H12	14	12	20	11	12	14	14	18	16	15	15	100	12	16	13	14
H13	14	11	10	19	8	15	15	11	7	12	19	12	100	14	17	51
H14	15	18	11	16	13	11	18	11	14	20	17	16	14	100	12	15
H15	15	11	15	13	11	17	19	12	16	23	13	13	17	12	100	13
H16	19	15	12	12	11	19	16	14	14	12	22	14	51	15	13	100

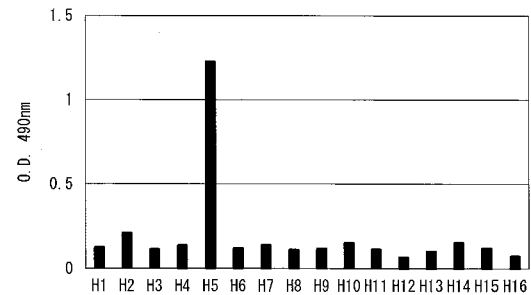
【図 1 0】

図 10



【図 1 1】

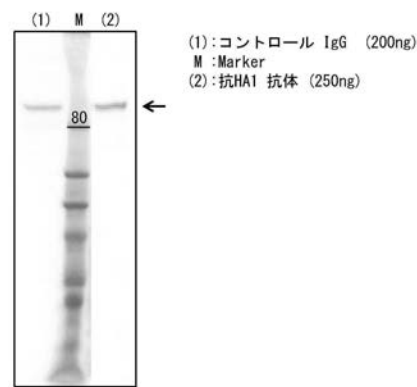
図 11



【図 6】

図 6

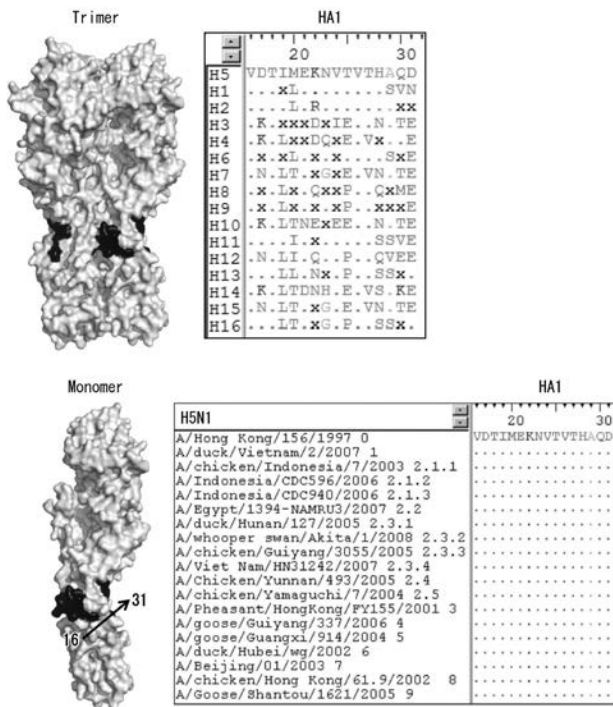
二価抗体タンパク質の非還元条件における電気泳動後のCBB染色の結果



【図 12】

図 12

標的合成ペプチド領域



【配列表】

2015186721000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年10月21日(2015.10.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン HA1 領域のうち、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン HA1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする、抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 2】

重鎖可変領域中に、配列番号 4 に示される CDR1、配列番号 5 に示される CDR2 および配列番号 6 または配列番号 46 に示される CDR3 のすべてを含んでおり、且つ、軽鎖可変領域中に、配列番号 7 に示される CDR1、配列番号 8 に示される CDR2 および配列番号 9 に示される CDR3 のすべてを含んでいることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 3】

重鎖可変領域が、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 13 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ

軽鎖可変領域が、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 3 に示される

アミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／もしくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項１または２に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項４】

重鎖可変領域が、配列番号４５に示されるアミノ酸配列からなり、且つ

軽鎖可変領域が、配列番号３に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項３に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項５】

以下の（１）～（４）の何れかに示す、Ｈ５亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニンＨＡ１領域のうち、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニンＨＡ１抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片：

（１）配列番号１または４４に示されるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

（２）配列番号１または４４に示されるアミノ酸配列において１～３５個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

（３）配列番号１または４４に示されるアミノ酸配列に対して９０％以上の配列同一性を有する抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

（４）上記（１）に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項６】

下記の（ａ）～（ｃ）の工程を含む製造方法によって得られたことを特徴とする、請求項１～５のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片：

（ａ）配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニンＨＡ１抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程；

（ｂ）上記工程（ａ）で免疫したトリから上記ヘマグルチニンＨＡ１抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および

（ｃ）上記工程（ｂ）で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニンＨＡ１抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

【請求項７】

一本鎖可変領域断片または二価抗体であることを特徴とする、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項８】

重鎖が配列番号２６または配列番号５２に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、

軽鎖が配列番号２８に示されるアミノ酸配列からなる二価抗体であることを特徴とする、請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項９】

請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードすることを特徴とする、ポリヌクレオチド。

【請求項１０】

請求項９に記載のポリヌクレオチドを有することを特徴とする、組換えベクター。

【請求項１１】

請求項１０に記載のポリヌクレオチドまたは請求項１０に記載の組換えベクターが導入されていることを特徴とする、形質転換体。

【請求項１２】

Ｈ５亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニンＨＡ１領域のうち、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニンＨＡ１抗原ポリペプチドに特異的に結合

する抗体を製造する方法であって、

下記の (a) ~ (c) の工程を含むことを特徴とする、方法：

(a) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程；

(b) 上記工程 (a) で免疫したトリから上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および

(c) 上記工程 (b) で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

【請求項 13】

上記抗体は、一本鎖可変領域断片または二価抗体であることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

(削除)

【請求項 15】

試料中に含まれる H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出するためのキットであって、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片を備えていることを特徴とする、キット。

【請求項 16】

試料中に含まれる H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法であって、

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片と、生体から調製した試料とを反応させる工程を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 17】

上記試料は、気管、咽喉頭、口腔または総排泄腔の、拭い液であることを特徴とする、請求項 16 に記載の方法。

【手続補正書】

【提出日】平成28年10月20日(2016.10.20)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H 5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン H A 1 領域のうち、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン H A 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする、抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 2】

重鎖可変領域中に、配列番号 4 に示される C D R 1、配列番号 5 に示される C D R 2 および配列番号 6 または配列番号 4 6 に示される C D R 3 のすべてを含んでおり、且つ、軽鎖可変領域中に、配列番号 7 に示される C D R 1、配列番号 8 に示される C D R 2 および配列番号 9 に示される C D R 3 のすべてを含んでいることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 3】

重鎖可変領域が、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 13 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ

軽鎖可変領域が、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列、または、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において、1 ~ 10 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 4】

重鎖可変領域が、配列番号 45 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ

軽鎖可変領域が、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項 3 に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 5】

以下の(1)～(4)の何れかに示す、H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン HA 1 領域のうち、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン HA 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片：

(1) 配列番号 1 または 44 に示されるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

(2) 配列番号 1 または 44 に示されるアミノ酸配列において 1～35 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

(3) 配列番号 1 または 44 に示されるアミノ酸配列に対して 90% 以上の配列同一性を有する抗体またはその可変領域を含む抗体断片、

(4) 上記(1)に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 6】

下記の(a)～(c)の工程を含む製造方法によって得られたことを特徴とする、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片：

(a) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン HA 1 抗原ポリペプチドをトリに免疫する工程；

(b) 上記工程(a)で免疫したトリから上記ヘマグルチニン HA 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および

(c) 上記工程(b)で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニン HA 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

【請求項 7】

一本鎖可変領域断片または二価抗体であることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 8】

重鎖が配列番号 26 または配列番号 52 に示されるアミノ酸配列からなり、且つ、

軽鎖が配列番号 28 に示されるアミノ酸配列からなる二価抗体であることを特徴とする、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片。

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片をコードすることを特徴とする、ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のポリヌクレオチドを有することを特徴とする、組換えベクター。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 10 に記載の組換えベクターが導入されていることを特徴とする、形質転換体。

【請求項 12】

H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン HA 1 領域のうち、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン HA 1 抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を製造する方法であって、

下記の(a)～(c)の工程を含むことを特徴とする、方法：

(a) 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるヘマグルチニン HA 1 抗原ポリペ

プチドをトリに免疫する工程；

(b) 上記工程(a)で免疫したトリから上記ヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合するファージ抗体を含むファージ抗体ライブラリーを得る工程；および

(c) 上記工程(b)で得られたファージ抗体のうち、上記ヘマグルチニンHA1抗原ポリペプチドに特異的に結合する抗体を濃縮および選抜する工程。

【請求項13】

上記抗体は、一本鎖可変領域断片または二価抗体であることを特徴とする、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

試料中に含まれるH5亜型鳥インフルエンザウイルスを検出するためのキットであって、請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片を備えていることを特徴とする、キット。

【請求項15】

試料中に含まれるH5亜型鳥インフルエンザウイルスを検出する方法であって、

請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体またはその可変領域を含む抗体断片と、生体から調製した試料とを反応させる工程を含むことを特徴とする、方法。

【請求項16】

上記試料は、気管、咽喉頭、口腔または総排泄腔の、拭い液であることを特徴とする、請求項15に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/065986

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/10(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, C12Q1/70(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i

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)

C07K16/10, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, C12Q1/70, G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2008/039267 A2 (PHARMEXA INC.), 03 April 2008 (03.04.2008), SEQ ID NO:3579 & EP 2069376 A1	14 1-13, 15-17
Y	TSUDA Y et al., Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection, Microbiol. Immunol., 2007, Vol.51, No.9, pp.903-907	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 August 2015 (13.08.15)

Date of mailing of the international search report
25 August 2015 (25.08.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/065986

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/119722 A1 (National University Corporation Hokkaido University), 01 October 2009 (01.10.2009), paragraphs [0001], [0011], [0016], [0017], [0023], [0024], [0033]; examples & JP 5586064 B2 & US 2011/0065095 A1 & EP 2284260 A1	1-17
Y	Hitoshi TAKAHASHI et al., "H5HA Tokuitei na Monoclonal Kotai no Sakusei to H5N1 Influenza Jinsoku Shindanho Kochiku no Kento", The Japanese Society of Virology Gakujutsu Shukai Program Shoroku-shu, 29 October 2013 (29.10.2013), vol.61, page 431	1-17
Y	JP 2011-514321 A (Temasek Life Sciences Laboratory Ltd.), 06 May 2011 (06.05.2011), claims; paragraphs [0018], [0019], [0024], [0025], [0031], [0032] & US 2011/0053142 A1 & WO 2009/099394 A1 & EP 2250197 A1	1-17
P,X	Yuji SHOYA et al., "H5 Agata Ko-Byogensei Tori Influenza Virus no Jinsoku Shindan Kit no Kaihatsu", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2015 (05.03.2015), vol.2015, 2C25p17	1-17
A	WO 2007/021002 A1 (BL Inc.), 22 February 2007 (22.02.2007), & JP 2014-95720 A	1-17
A	Mie KOBAYASHI (ISHIHARA) et al., "H5N1 Influenza Virus Kokando Kenshutsukei Kaihatsu ni Muketa H5HA Tokuiteki Kotai no Epitope Kaiseki", The Japanese Society of Virology Gakujutsu Shukai Program Shoroku-shu, 29 October 2013 (29.10.2013), vol.61, page 208	1-17
A	JP 2008-196967 A (BL Inc.), 28 August 2008 (28.08.2008), (Family: none)	1-17
A	JP 2013-87069 A (Toyobo Co., Ltd.), 13 May 2013 (13.05.2013), (Family: none)	1-17
A	YANG M et al., Production and diagnostic application of monoclonal antibodies against influenza virus H5, J. Virol. Methods., 2009, Vol.162, No.1-2, pp.194-202	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/065986

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HA Y et al., H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes, EMBO J., 2002, Vol.21, No.5, pp.865-875	1-17
A	YANG JP et al., Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: mimotope and neutralizing activity, J. Biochem., 2010, Vol.148, No.4, pp.507-515	1-17
A	HE F et al., Complementary monoclonal antibody-based dot ELISA for universal detection of H5 avian influenza virus, BMC Microbiol., 2010, Vol.10, 330	1-17
A	HO HT et al., Rapid detection of H5N1 subtype influenza viruses by antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay using H5- and N1-specific monoclonal antibodies, Clin. Vaccine Immunol., 2009, Vol.16, No.5, pp.726-732	1-17
A	JP 2011-506344 A (Dana-Farber Cancer Institute, Inc.), 03 March 2011 (03.03.2011), & US 2011/0038935 A1 & WO 2009/079259 A2 & EP 2222701 A1	1-17
A	JP 2009-524434 A (HX Diagnostics Inc.), 02 July 2009 (02.07.2009), & US 2009/0068637 A1 & WO 2007/089753 A2 & EP 1977015 A1	1-17
A	WO 2013/122827 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH-OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION), 22 August 2013 (22.08.2013), & JP 2015-512871 A & EP 2814837 A1	1-17
P,A	KOBAYASHI-ISHIHARA M et al., Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin, PLoS One, 2014.06.19, Vol.9, No.6, e99201, doi: 10.1371/journal.pone.0099201	1-17

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 5 9 8 6									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/10(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, C12Q1/70(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/10, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, C12Q1/70, G01N33/569											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAlus/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X A	WO 2008/039267 A2 (PHARMEXA INC.) 2008.04.03, 配列番号 3579 & EP 2069376 A1	14 1-13, 15-17									
Y	TSUDA Y et al., Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection, Microbiol. Immunol., 2007, Vol.51, No.9, pp.903-907	1-17									
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 13.08.2015		国際調査報告の発送日 25.08.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 西村 亜希子	4 N 3 4 3 5 電話番号 03-3581-1101 内線 3488								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 5 9 8 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2009/119722 A1 (国立大学法人 北海道大学) 2009.10.01, 段落 [0001], [0011], [0016], [0017], [0023], [0024], [0033], 実施例 & JP 5586064 B2 & US 2011/0065095 A1 & EP 2284260 A1	1-17
Y	高橋仁ほか, H5HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H5N1 インフ ルエンザ迅速診断法構築の検討, 日本ウイルス学会学術集会プログ ラム・抄録集, 2013.10.29, Vol.61, p.431	1-17
Y	JP 2011-514321 A (テマセック・ライフ・サイエンス・ラボラトリ ー・リミテッド) 2011.05.06, 特許請求の範囲, 段落 [0018], [0019], [0024], [0025], [0031], [0032] & US 2011/0053142 A1 & WO 2009/099394 A1 & EP 2250197 A1	1-17
P, X	庄屋雄二ほか, H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの迅速診 断キットの開発, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2015.03.05, Vol.2015, 2C25p17	1-17
A	WO 2007/021002 A1 (株式会社ビーエル) 2007.02.22, & JP 2014-95720 A	1-17
A	小林(石原)美栄ほか, H5N1 インフルエンザウイルス高感度検出系開 発に向けた H5HA 特異的抗体のエピトープ解析, 日本ウイルス学会学 術集会プログラム・抄録集, 2013.10.29, Vol.61, p.208	1-17
A	JP 2008-196967 A (株式会社ビーエル) 2008.08.28, (ファミリーなし)	1-17
A	JP 2013-87069 A (東洋紡績株式会社) 2013.05.13, (ファミリーなし)	1-17
A	YANG M et al., Production and diagnostic application of monoclonal antibodies against influenza virus H5, J. Virol. Methods., 2009, Vol.162, No.1-2, pp.194-202	1-17
A	HA Y et al., H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes, EMBO J., 2002, Vol.21, No.5, pp.865-875	1-17

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 5 9 8 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	YANG JP et al., Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: mimotope and neutralizing activity, J. Biochem., 2010, Vol.148, No. 4, pp.507-515	1-17
A	HE F et al., Complementary monoclonal antibody-based dot ELISA for universal detection of H5 avian influenza virus, BMC Microbiol., 2010, Vol.10, 330	1-17
A	HO HT et al., Rapid detection of H5N1 subtype influenza viruses by antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay using H5- and N1-specific monoclonal antibodies, Clin. Vaccine Immunol., 2009, Vol.16, No.5, pp.726-732	1-17
A	JP 2011-506344 A (ダナーファーバー キャンサー インスティテュート, インコーポレイテッド) 2011.03.03, & US 2011/0038935 A1 & WO 2009/079259 A2 & EP 2222701 A1	1-17
A	JP 2009-524434 A (エイチエックス・ダイアグノスティックス・インコーポレイテッド) 2009.07.02, & US 2009/0068637 A1 & WO 2007/089753 A2 & EP 1977015 A1	1-17
A	WO 2013/122827 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH-OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 2013.08.22, & JP 2015-512871 A & EP 2814837 A1	1-17
P,A	KOBAYASHI-ISHIHARA M et al., Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin, PLoS One, 2014.06.19, Vol.9, No.6, e99201, doi: 10.1371/journal.pone.0099201	1-17

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	L
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A

(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, 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, 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, UG, US

(出願人による申告) 平成 24 年度、文部科学省、地域社会における危機管理システム改革プログラム (各種感染症への対応) 「鳥インフルエンザ防疫システムの構築」、産業技術力強化法第 19 条の適用を受ける特許出願

- (72) 発明者 西藤 岳彦
茨城県つくば市観音台三丁目 1 番地 5 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門内
- (72) 発明者 鈴木 康司
茨城県つくば市観音台三丁目 1 番地 5 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門内
- (72) 発明者 庄屋 雄二
京都府京都市西京区御陵大原 1 - 4 9 株式会社ファーマフーズ内
- (72) 発明者 豊浦 雅義
京都府京都市西京区御陵大原 1 - 4 9 株式会社ファーマフーズ内
- (72) 発明者 石田 有希子
京都府京都市西京区御陵大原 1 - 4 9 株式会社ファーマフーズ内

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA53 FA74

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 184 条の 10 第 1 項 (実用新案法第 48 条の 13 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	含有其可变区，抗原多肽及其用途的抗体或抗体片段		
公开(公告)号	JPWO2015186721A1	公开(公告)日	2017-04-20
申请号	JP2016525195	申请日	2015-06-03
申请(专利权)人(译)	国立研究开发法人农业·食品产业技术総合研究机构 医药食品国际有限公司		
[标]发明人	内田裕子 西藤岳彦 鈴木康司 庄屋雄二 豊浦雅義 石田有希子		
发明人	内田 裕子 西藤 岳彦 鈴木 康司 庄屋 雄二 豊浦 雅義 石田 有希子		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/11 C07K16/10 C40B40/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/01 G01N33/569 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	C07K16/10 C07K16/46 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/70 G01N33/569		
FI分类号	C12N15/00.A C07K14/11.ZNA C07K16/10 C40B40/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/01 G01N33/569.L G01N33/53.D G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045 /DA76 4H045/EA53 4H045/FA74		
优先权	2014115221 2014-06-03 JP		
其他公开文献	JP6525214B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

为了提供H5亚型禽流感病毒的抗体和包含其可变区的抗体片段，抗原性多肽及其用途，本发明显示了H5亚型禽流感病毒的HA1区，如SEQ ID NO：10所示。 特异性结合由氨基酸序列和含有其可变区的抗体片段组成的HA1抗原多肽的抗体，由SEQ ID NO：10所示的氨基酸序列组成的HA1抗原多肽和含有该抗体及其可变区的抗体片段 提供有关使用。

(19) 日本国特許庁 (JP)		再 公 表 特 許 (A1)		(11) 国際公開番号 WO2015/186721	
発行日 平成29年4月20日 (2017. 4. 20)		(43) 国際公開日 平成27年12月10日 (2015. 12. 10)			
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 12 N 15/09 (2006.01)		C 12 N 15/00		A 4 B 0 6 5	
C 07 K 14/11 (2006.01)		C 07 K 14/11		Z N A 4 H 0 4 5	
C 07 K 16/10 (2006.01)		C 07 K 16/10			
C 40 B 40/08 (2006.01)		C 40 B 40/08			
C 12 N 1/15 (2006.01)		C 12 N 1/15			
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 43 頁) 最終頁に続く	
出願番号 特願2016-525195 (P2016-525195)		(71) 出願人 501203344			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/065986		国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構			
(22) 国際出願日 平成27年6月3日 (2015. 6. 3)		茨城県つくば市観音台3-1-1			
(31) 優先権主張番号 特願2014-115221 (P2014-115221)		(71) 出願人 500101243			
(32) 優先日 平成26年6月3日 (2014. 6. 3)		株式会社ファーマフーズ			
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		京都府京都市西京区御陵大原1-4-9			
		(74) 代理人 110000338			
		特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK			
		(72) 発明者 内田 裕子			
		茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門内			
		最終頁に続く			
(54) 【発明の名称】 抗体またはその可変領域を含む抗体断片、抗原ポリペプチド、およびその利用					