

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2004/087764

発行日 平成18年6月29日(2006.6.29)

(43) 国際公開日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2005-504305 (P2005-504305)	(71) 出願人	000161932 京都電子工業株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2004/004355		京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68
(22) 国際出願日	平成16年3月26日(2004.3.26)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稔
(31) 優先権主張番号	特願2003-91663 (P2003-91663)	(74) 代理人	100083356 弁理士 柴田 康夫
(32) 優先日	平成15年3月28日(2003.3.28)	(72) 発明者	澤田石 一之 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68 京都電子工業株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	日向野 桂一 京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町68 京都電子工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイオキシンを認識する組換抗体および該抗体をコードする遺伝子

## (57) 【要約】

本発明は、2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン(2, 3, 4, 7, 8-PeCDF)に結合活性を有する新規な組換抗体、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子、該遺伝子を導入したベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、該組換抗体の製造方法、該組換抗体を用いる2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの免疫学的捕獲法ならびに測定法に関する。本発明の組換抗体を用いて、ダイオキシソソ類、特に2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定することができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン (2, 3, 4, 7, 8-P e C D F) に結合活性を有する組換抗体であって、

(1) 2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを認識するモノクローナル抗体D x 3 8 6 0のH鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(2) 該モノクローナル抗体D x 3 8 6 0のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(3) 2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを認識するモノクローナル抗体D x 3 1 5 0のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(4) 該モノクローナル抗体D x 3 1 5 0のL鎖可変領域を構成し、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(5) 上記(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチド；ならびに

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドのフラグメントであり、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む組換抗体。

**【請求項2】**

(5)のポリペプチドが、(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に98%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチドである請求項1に記載の組換抗体。

**【請求項3】**

モノクローナル抗体D x 3 8 6 0のH鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチド、ならびに、モノクローナル抗体D x 3 8 6 0のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチドを含む請求項1に記載の組換抗体。

**【請求項4】**

モノクローナル抗体D x 3 1 5 0のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチド、ならびに、モノクローナル抗体D x 3 1 5 0のL鎖可変領域を構成し、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチドを含む請求項1に記載の組換抗体。

**【請求項5】**

請求項1に記載の組換抗体のアミノ酸配列をコードするDNA。

**【請求項6】**

請求項5に記載のDNAを含むクローニングまたは発現ベクター。

**【請求項7】**

請求項6に記載のクローニングまたは発現ベクターで形質転換した形質転換体。

**【請求項8】**

請求項1に記載の組換抗体の製造方法であって、請求項7に記載の発現ベクターで形質転換した形質転換体を適当な培地中で培養し、該形質転換体または培地から組換抗体を回収することを含んでなる方法。

**【請求項9】**

2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを免疫学的に捕獲する方法であって、請求項1に記載の

10

20

30

40

50

組換抗体を使用することを特徴とする方法。

【請求項10】

2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを免疫学的に測定する方法であって、請求項1に記載の組換抗体を使用することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン(2, 3, 4, 7, 8-PeCDF)に結合活性を有する新規な組換抗体、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子、該遺伝子を導入したベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、該組換抗体の製造方法、該組換抗体を用いる2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの免疫学的捕獲法ならびに測定法に関する。

【背景技術】

内分泌攪乱物質による環境汚染が問題となり、その汚染状況の把握やヒトの健康への影響などの調査が進められている。これら内分泌攪乱物質によるヒトや環境への影響が明らかになるに従い、日本のみならず世界各国においても重大な社会的関心事となっている。なかでもダイオキシン類については、ヒトや生態系および環境への持続的な影響が懸念されおり、汚染状況の把握や、ヒトや生態系での暴露状況の調査、摂取ルートの解明、さらには汚染箇所のダイオキシン量のモニタリングや汚染除去方法への対応が急務となっている。ダイオキシン類は、有機塩素化合物の使用、生産、燃焼などの過程で生成することから発生源が多岐に渡るとともに、土壌、水質、大気、食品、海産物などにおいて広範な汚染が確認されている。従って、膨大な生体試料や環境試料などの試料中のダイオキシン濃度を測定し、対策を講じる必要から、ダイオキシン類の簡便かつ迅速な測定方法の確立が望まれている。

ダイオキシン類には、75種類のポリクロロジベンゾダイオキシン(PCDD)および135種類のポリクロロジベンゾフラン(PCDF)からなる多数の構造異性体が存在する。最も毒性が高い2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシン(2, 3, 7, 8-TCDD)の毒性を1としたときの各ダイオキシン異性体の相対毒性が毒性等価指数として示されており、ダイオキシン類の分析においては毒性の高い7種類のPCDDおよび10種類のPCDFが測定対象物質とされている。また、内分泌攪乱物質の1つとして以前から問題とされていたポリクロロビフェニール(PCB)のうち12種類の共平面(coplanar)PCBもダイオキシン類として測定されるようになった。

ダイオキシン類の測定は、従来、高分解能ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(HRGC/HRMS)分析により行われていた。しかし、HRGC/HRMS法は、試料中の妨害物質を除去するために多段階のクリーンアップ操作を必要とし、分析機器が高額であり、かつ測定者の習熟を要するため、特定の分析機関においてのみ測定が可能であった。ダイオキシン類の分析方法、特にHRGC/HRMS法においては、毒性の高い17種類のダイオキシン異性体の含有量を個々に定量し、次いで各異性体の実測値に毒性等価指数を乗じた値の総和を、2, 3, 7, 8-TCDD相当量である毒性等量(TEQ)に換算し、この換算値をダイオキシン分析値として用いている。従って、データ解析を含め被検体の分析に多大な時間を要する。これらの理由から、ダイオキシン類のより簡便で安価かつ高感度な測定方法の開発が強く望まれている。

また、特定の指標物質を測定することにより、より簡便にダイオキシン量(TEQ)を把握しようという考え方が根強く存在している。前駆体であるクロロベンゼンを測定する方法もこの1つである。近年、ダイオキシン異性体の1つである2, 3, 4, 7, 8-PeCDF量が、ダイオキシン類の総TEQと非常に高い相関性を有することが明らかになってきた(高菅ら、第11回環境化学討論会講演要旨集、136頁、2002年)。土壌、底質、大気、水質、排ガス、飛灰などの環境試料、母乳、血液などの生体試料、ならびに、海産物、食品などの広範な試料においても、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFは、全ダイオキシンの主要構成成分でありその含有量はダイオキシン類の総TEQと $R=0.96\sim 0.99$ の高い相関を示す。従って、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFは、ダイオキ

シン量を把握するための指標物質として注目されている。

一方、抗体を利用してダイオキシン類を定量する試みも行われている。

例えば、特開2002-340882号公報には、ダイオキシン類の捕集ユニット、抽出ユニット、分離精製ユニット、および抗体を用いてダイオキシン類を測定する測定ユニットの4つのユニットから構成されるダイオキシン類の測定装置および測定方法が記載されている。

また、特開2002-228660号公報には、2, 3, 7, 8-TCDDに高親和性のモノクローナル抗体を作製し、これを用いてヒト血液や母乳などの生体試料中のダイオキシン類を検出する方法が記載されている。

さらに、特開2002-119279号公報には、ダイオキシン類である複数の異性体に対して交差反応性を有する数種の抗体を用い、ダイオキシン類の存在量を推定する方法が記載されている。 10

しかし、これらの文献には、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体、ならびに、該モノクローナル抗体をコードする遺伝子配列、該遺伝子配列に基づく組換え抗体および該組換え抗体を用いる2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの測定方法については記載されていない。

また、これら文献の方法は、試料中に含まれるダイオキシン類のTEQを把握するには至らないという欠点を有する。

#### 【発明の開示】

(発明が解決しようとする技術的課題)

20

本発明者らは、HRGC/HRMS法で測定される17種類のダイオキシン類の主要構成成分であり、かつ、その含有量がダイオキシン類の総TEQと高い相関性を有する指標異性体である2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定する方法を確立しようとした。

(その解決方法)

本発明者らは、上記課題を解決するために、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体を抗原として用いて、通常の細胞融合法により、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体を産生する2株のハイブリドーマ、即ち、モノクローナル抗体Dx3860を産生するハイブリドーマDx3860r1およびモノクローナル抗体Dx3150を産生するハイブリドーマDx3150r1を得た。 30

また、本発明者らは、これらのハイブリドーマ中に含まれるmRNAを単離および精製し、このmRNAをもとにcDNAを合成した。次いで、このcDNAの中から、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域ならびにモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAを選択するため、抗体遺伝子特有の配列を利用してPCRを行い、目的の抗体遺伝子の特異的に増幅させた。これら選択されたcDNAの塩基配列を解析し、それらがコードするアミノ酸配列を推定した。

その結果、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAは、それぞれ配列番号1および2で示され、一方、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をコードするcDNAは、それぞれ配列番号3および4で示されることがわかった。 40

また、モノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域およびL鎖可変領域の推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号5および6で示され、一方、モノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域およびL鎖可変領域の推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号7および8で示されることがわかった。

さらに、本発明者らは、上記抗体の可変領域中の超可変領域(CDR1~3)のアミノ酸配列およびその位置を特定した。超可変領域のアミノ酸配列を以下の表1~4に示す。

表 1 : D x 3 8 6 0 の H 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala	配列番号 9
CDR 2	Phe-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Thr	配列番号 10
CDR 3	Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly-Pro-Ala-Tyr	配列番号 11

表 2 : D x 3 8 6 0 の L 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Leu-Asn-Tyr	配列番号 12
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Leu	配列番号 13

10

表 3 : D x 3 1 5 0 の H 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Tyr	配列番号 14
CDR 2	Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Tyr-Asn	配列番号 15
CDR 3	Val-Ser-Tyr-Gly-Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr	配列番号 16

20

表 4 : D x 3 1 5 0 の L 鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Ser-Asn-Tyr	配列番号 17
CDR 2	Asn-Thr-Asn	
CDR 3	Ala-Leu-Trp-Tyr-Asn-Thr-His-Leu-Val	配列番号 18

モノクローナル抗体 D x 3 8 6 0 の H 鎖および L 鎖可変領域中の超可変領域 (CDR 1 ~ 3) の位置を、DNA 配列およびアミノ酸配列と共に、それぞれ図 1 および図 2 に示す。また、モノクローナル抗体 D x 3 1 5 0 の H 鎖および L 鎖可変領域中の超可変領域 (CDR 1 ~ 3) の位置を、DNA 配列およびアミノ酸配列と共に、それぞれ図 3 および図 4 に示す。

30

図 1 において、アミノ酸配列の 26 ~ 33 位が CDR 1 を、51 ~ 57 位が CDR 2 を、96 ~ 103 位が CDR 3 を示す。

図 2 において、アミノ酸配列の 26 ~ 34 位が CDR 1 を、52 ~ 54 位が CDR 2 を、91 ~ 98 位が CDR 3 を示す。

図 3 において、アミノ酸配列の 26 ~ 34 位が CDR 1 を、52 ~ 58 位が CDR 2 を、97 ~ 107 位が CDR 3 を示す。

図 4 において、アミノ酸配列の 26 ~ 34 位が CDR 1 を、52 ~ 54 位が CDR 2 を、91 ~ 99 位が CDR 3 を示す。

40

また、本発明者らは、上記抗体の可変領域をコードする DNA を発現ベクターに組み込み、該ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞において組換抗体を発現させた。さらに、本発明者らは、該組換抗体を用いて、試料中の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を定量しうることを確かめた。また、本発明者らは、上記抗体の可変領域をコードする DNA に変異を導入し、この変異導入 DNA を用いて上記のように組換抗体を発現させ、該組換抗体を用いて、試料中の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を定量しうることを確かめた。

即ち、本発明は、2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン (2, 3, 4, 7, 8-PeCDF) に結合活性を有する組換抗体であって、

(1) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を認識するモノクローナル抗体 D x 3 8 6 0 の

50

H鎖可変領域を構成し、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(2) 該モノクローナル抗体D x 3 8 6 0のL鎖可変領域を構成し、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(3) 2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを認識するモノクローナル抗体D x 3 1 5 0のH鎖可変領域を構成し、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(4) 該モノクローナル抗体D x 3 1 5 0のL鎖可変領域を構成し、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(5) 上記(1)～(4)のポリペプチドのアミノ酸配列に95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチド；ならびに

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドのフラグメントであり、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fに結合活性を有するポリペプチド；

からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む組換抗体を提供するものである。

また、本発明は、上記の組換抗体のアミノ酸配列をコードするDNA、該DNAを含むクローニングまたは発現ベクター、該ベクターで形質転換した形質転換体、該形質転換体を用いて該組換抗体を製造する方法、ならびに、該組換抗体を用いて2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを免疫学的に捕獲および測定する方法を提供するものである。

(従来技術より有効な効果)

本発明の組換抗体を用いて、ダイオキシシン類、特に2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを、免疫学的手法により、迅速、簡便、高感度に捕獲および測定することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、モノクローナル抗体D x 3 8 6 0のH鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図2は、モノクローナル抗体D x 3 8 6 0のL鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図3は、モノクローナル抗体D x 3 1 5 0のH鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図4は、モノクローナル抗体D x 3 1 5 0のL鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列および超可変領域(CDR1～3)の位置を示す。

図5は、s c F vフラグメントD x 3 8 6 0 H Lの構成を示す。

図6は、s c F vフラグメントD x 3 8 6 0 L Hの構成を示す。

図7は、s c F vフラグメントD x 3 1 5 0 H Lの構成を示す。

図8は、s c F vフラグメントD x 3 1 5 0 L Hの構成を示す。

図9は、抗2, 3, 4, 7, 8-P e C D F s c F vを用いた間接競合イムノアッセイにより、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを測定した結果を示すグラフである。

図10は、H鎖可変領域ポリペプチド画分と抗2, 3, 4, 7, 8-P e C D F活性の関係を示すグラフである。

図11は、モノクローナル抗体D x 3 8 6 0のV<sub>H</sub>鎖変異体のアミノ酸配列を示す。

図12は、変異導入D x 3 8 6 0 s c F v提示ファージにより、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを測定した結果を示すグラフである。

図13は、変異導入D x 3 8 6 0 s c F v提示ファージの抗体価を比較するグラフである。

図14は、変異導入D x 3 8 6 0 s c F v提示ファージのDMSO存在下での反応性を比較するグラフである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

本発明で言う「抗体」には、生体内に存在する天然型抗体の他に、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域またはその組合せにより形成される、少なくとも1つの抗原結合部位を有するポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドには、例えば、H鎖またはL鎖の可変領域のみを含むポリペプチド、1組のH鎖フラグメントとL鎖からなるF a bフラグ

10

20

30

40

50

メント、2組のH鎖フラグメントとL鎖からなるF ( a b' )<sub>2</sub> フラグメント、H鎖可変領域とL鎖可変領域がリンカーにより1本に結合された一本鎖組換抗体 ( s c F v ) などが含まれる。

s c F v には、例えば、N末端側から「(H鎖可変領域) - (リンカー) - (L鎖可変領域)」の順序で結合されたポリペプチド、ならびに、「(L鎖可変領域) - (リンカー) - (H鎖可変領域)」の順序で結合されたポリペプチドが含まれる。リンカーは、s c F v が抗原に結合する際に、H鎖可変領域およびL鎖可変領域が効率良く折り畳まれるように、これらの領域の間に配置させるものである。このリンカーは、通常、5～15個のアミノ酸から構成されており、例えば、- ( G l y<sub>4</sub> S e r )<sub>3</sub> - を例として挙げることができる。本発明において使用するリンカーは、上記目的を達成できる限り、アミノ酸の10  
数および種類に制限はない。

また、本発明の組換抗体においては、H鎖可変領域またはL鎖可変領域のN末端側およびC末端側に、さらに適当なアミノ酸配列が付加されていてもよい。例えば、以下の実施例において示すように、「(H鎖可変領域) - (リンカー) - (L鎖可変領域)」ポリペプチドの場合には、H鎖可変領域のN末端側に分泌シグナル領域を、L鎖可変領域のC末端側にエピトプタグ配列を付加することができる。また、「(L鎖可変領域) - (リンカー) - (H鎖可変領域)」ポリペプチドの場合には、L鎖可変領域のN末端側に分泌シグナル領域を、H鎖可変領域のC末端側にエピトプタグ配列を付加することができる。

本発明の組換抗体には、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域またはその組合せにより形成される少なくとも1つの抗原結合部位を有するポリペプチドの他に、これらポリペプチドと実質的に同じ機能を有する変異ポリペプチドが含まれる。本発明で言う「実質的に同じ機能」とは、抗原に対する結合力が実質的に同じであることを意味する。即ち、配列番号5～8で示されるアミノ酸配列を有する本発明の抗2, 3, 4, 7, 8-P e C D F 抗体のH鎖およびL鎖の可変領域は、抗原との結合力が実質的に同じである限り、1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換または付加変異を含むことができる。このような本発明の変異ポリペプチドは、配列番号5～8で示されるアミノ酸配列に対して、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する。また、この変異は、図1～4に示される抗体可変領域中の超可変領域 ( C D R 1 ~ 3 ) 以外のフレームワークに存在するのが好ましい。

また、本発明の組換抗体には、配列番号5～8で示されるポリペプチドのフラグメント30  
であって、元のポリペプチドと実質的に同じ機能を有するフラグメント、ならびに、これらフラグメントの組合せにより形成されるポリペプチドが含まれる。これらのフラグメントは、図1～4に示される超可変領域 ( C D R 1 ~ 3 ) の少なくとも1つ、好ましくは2つ、さらに好ましくは3つ全てを含有する。

本発明の組換抗体は、所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを調製し、該DNAを発現ベクターに組み込み、該発現ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞を適当な培地中で培養して該組換抗体を発現させることにより製造することができる。

所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、配列番号1～4 (または図1～4) に示されるcDNA配列またはアミノ酸配列に基づいて、合成により調製することができる。別法によれば、所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、40  
次のようにして得ることもできる。即ち、本発明者らは、以下の実施例において示すように、N末端側からモノクローナル抗体D x 3 8 6 0のH鎖可変領域、リンカー、D x 3 8 6 0のL鎖可変領域を、この順序で含むフラグメント (図5を参照) を組込んだ発現ベクターを作製し、このベクターを大腸菌Bに導入し、この大腸菌B ( p E T 2 2 Δ - D x 3 8 6 0 H L ) を特許生物寄託センターに寄託した。さらに、本発明者らは、N末端側からモノクローナル抗体D x 3 1 5 0のH鎖可変領域、リンカー、D x 3 1 5 0のL鎖可変領域を、この順序で含むフラグメント (図7を参照) を組込んだ発現ベクターを作製し、このベクターを大腸菌K - 1 2に導入し、この大腸菌K - 1 2 ( p E T 2 2 Δ - D x 3 1 5 0 H L ) を特許生物寄託センターに寄託した。所望のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、これらの発現ベクターから適当な制限酵素を用いて切出し、所望により 50

DNA配列中に変異を加えることにより得ることができる。また、DNAフラグメントの連結のために、常法によりフラグメントの末端を修飾することができる。

得られたDNAフラグメントの発現ベクターへの組込みは、市販の発現ベクター [例えば、pET-22b (+) など] の所定のフラグメント挿入部位に合致させるように、DNAフラグメントの末端を加工し、末端加工されたDNAフラグメントを発現ベクターに挿入することによって行うことができる。

このようにして得た発現ベクターを、適当な宿主細胞、特に大腸菌 [例えば、大腸菌B株、K-12株、BL21 (DE3) 株など] に導入し、挿入したDNAフラグメントの発現に適した培地で宿主細胞を培養することにより、所望の組換抗体を発現させることができる。発現された組換抗体を、常法により宿主細胞またはその培養液から回収することができる。回収した組換抗体は、例えばクロマトグラフィー法によって精製することができる。

この方法により、所望の組換抗体を、血清を必要とする培地で動物細胞を培養することにより得られるモノクローナル抗体より安価に、かつ大量に製造することができる。

得られた組換抗体を用いて試料中の2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを免疫学的に、迅速に捕獲することができる。このような捕獲法としては、イムクロマトグラフィーや免疫沈降による2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの分離、精製および濃縮方法が含まれる。また、このような2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの捕獲作用を利用することにより、該組換抗体を用いて生体中に摂取されたダイオキシン類のうち主要物質である2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを迅速に捕獲し、除去することも可能である。

また、得られた組換抗体を用いて試料中の2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを免疫学的に迅速かつ高感度に測定することができる。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素免疫測定 (EIA)、蛍光免疫測定 (FIA) などが含まれる。

また、免疫学的測定法は非競合法と競合法に大別される。本発明の組換抗体は競合法に用いるのが好ましい。この競合法には、間接競合法と直接競合法が含まれる。間接競合法においては、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体を固定化し、試料中の遊離2, 3, 4, 7, 8-PeCDFと固定化抗原との間で、組換抗体との反応を競合させる。直接競合法においては、組換抗体を固定化し、試料中の2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの存在量に応じ、該組換抗体に結合する標識2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体の量を測定する。

#### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF抗体産生ハイブリドーマの調製

2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、次のようにして調製した。即ち、初めに2, 3, 4, 7, 8-PeCDFにアルキル鎖を導入し、その末端を活性エステル体とした。次いで、これを、常法に従い、キャリアタンパク質であるウシ血清アルブミン (BSA) に導入し、免疫用コンジュゲートを調製した。

この免疫用コンジュゲートを、アジュバントRAS R-700 (Ribi社) 中に十分に乳化させ、この乳化液200  $\mu$  lをBALB/cマウス (7週齢、雌) の腹腔内に投与して、マウスを免疫感作した。2週間毎に追加免疫を行い、追加免疫より約1週間の経過後に尾静脈より採血し、血中抗体価を競合EIA法により測定した。

2, 3, 4, 7, 8-PeCDFに対する高い抗体産生が確認されたマウスを選択し、尾静脈内に免疫用コンジュゲートを投与して、最終免疫を行った。最終免疫より3~4日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。対数増殖期にあるマウスミエロマ細胞 (Sp2/O) と脾臓細胞を細胞数が1:5になるように混合し、ポリエチレングリコール法 (PEG法) にて細胞融合を行った。10% FCS含有HAT培地に懸濁し、96ウエル培養プレートに分注 (1~2.5  $\times$  10<sup>5</sup> /ウエル) し、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

。

培養開始より7~10日後、ハイブリドーマの増殖が見られたウエルの培養上清を一部採取し、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体-BSAコンジュゲートを固相化したマイクロタイタープレートに添加した。室温で1時間反応させた後、0.05% Tween 20含有PBS(-)で洗浄した。次いで、プレートにペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG( $\gamma$ 鎖認識)抗体(KPL社)を加えて室温で1時間反応させた後、同様にプレートを洗浄した。基質溶液(TMB基質、KPL社)を加えてプレート上のペルオキシダーゼ活性を測定し、培養上清中の抗体価を求めた。高い抗体価を示すウエルのうち、固相化2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体-BSAコンジュゲートに対する抗体価が、20% DMSOに溶解した2, 3, 4, 7, 8-PeCDFによって大きく阻害されるウエルを選抜し、該ウエル中のハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした。クローニングにより単離された細胞を培養することによって、2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識する2種類のモノクローナル抗体産生クローンを樹立した。

10

即ち、このようにして、モノクローナル抗体Dx3860を産生するハイブリドーマDx3860r1およびモノクローナル抗体Dx3150を産生するハイブリドーマDx3150r1を得た。

#### mRNAの単離および精製

抗2, 3, 4, 7, 8-PeCDF抗体産生ハイブリドーマDx3860r1およびDx3150r1を、5%CO<sub>2</sub>通気条件下、10%FCSを含有するRPMI 1640培地中で増殖させた。対数増殖期にある約 $2.8 \sim 5.0 \times 10^7$ 個の細胞から、AGPC法[Chomczynski, P., Sacchi, N., Anal. Biochem., 162, p. 156-159 (1987)]によって全RNAを抽出した。次いで、オリゴdTがラテックスビーズに結合したOrigotex-dT 30(宝酒造)を用いてpoly(A)+RNAを精製した。

20

#### cDNAの合成

Mouse scFv Module/Recombinant Phage Antibody System(Amersham Pharmacia社)に含まれるPrimed first-strand reaction mixを用いて、上記のpoly(A)+RNAからcDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型とし、Mouse Ig-Primer Set(Novagen)およびTaq DNAポリメラーゼ(Applied Biosystems社)を用いてPCRを行った。Dx3860H鎖にはMuIgVH5'-AとMuIgVH3'-2のプライマーセットを、Dx3150H鎖にはMuIgVH5'-DとMuIgVH3'-2のプライマーセットを用いた。また、Dx3860L鎖およびDx3150L鎖の両方には、MuIg $\lambda$ V<sub>L</sub>5'-AとMuIg $\lambda$ V<sub>L</sub>3'-1のプライマーセットを用いた。用いたプライマーを以下の表5に示す。PCR反応は次のように行った。即ち、Dx3860H鎖とDx3150L鎖については、94℃×1分間、50℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを30サイクル行い、Dx3150H鎖については、94℃×1分間、60℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを30サイクル行い、Dx3860L鎖については、94℃×1分間、60℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを5サイクル行い、その後さらに、94℃×1分間、50℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを30サイクル行った。

30

40

表5：cDNA合成用PCRプライマー

H鎖 5'側		
Dx3860	MuIgV <sub>H</sub> 5'-A	GGGAATTCATGRASITTSKGGYTMARCTKGRITTT (配列番号19)
Dx3150	MuIgV <sub>H</sub> 5'-D	ACTAGTCGACATGGRCAGRCTTACWYYTTCATTCCT (配列番号20)
		ACTAGTCGACATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT (配列番号21)
		ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRATCATSYTCTT (配列番号22)
H鎖 3'側 (Dx3860、Dx3150共通)		
	MuIgV <sub>H</sub> 3'-2	CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG (配列番号23)
L鎖 5'側 (Dx3860、Dx3150共通)		
	MuIgλ V <sub>L</sub> 5'-A	GGGAATTCATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT (配列番号24)
L鎖 3'側 (Dx3860、Dx3150共通)		
	MuIgλ V <sub>L</sub> 3'-1	CCCAAGCTTAGCTCYTCWGWGAIGGYGGRAA (配列番号25)

10

cDNAのサブクローニング

上記のPCR産物を、TAクローニングキットであるpGEM-T Easy Vector System I (Promega社)を用いてpGEM-T Easyに挿入した後、大腸菌XL1-Blueを形質転換した。コンピテントセルとして、XL1-Blue Competent Cells (STRATAGENE社)を使用した。

20

塩基配列の決定とアミノ酸配列の解析

pGEM-T Easyにサブクローニングした抗体遺伝子cDNAクローンについて、T7プライマー(5'-TAATACGACTCACTATAGGG:配列番号26)を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems社)によるシーケンス反応を行った。次いで、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社)にて配列を解析した。その結果、Dx3860抗体遺伝子のH鎖およびL鎖可変領域をコードするcDNAの塩基配列およびその推定アミノ酸配列(配列番号1および2)ならびにDx3150抗体遺伝子のH鎖およびL鎖可変領域をコードするcDNAの塩基配列およびその推定アミノ酸配列(配列番号3および4)を得た。塩基配列の解析ならびにアミノ酸配列の推定および解析には、解析ソフトDNAsis (日立ソフトエンジニアリング)を使用した。

30

また、配列番号1~4の配列中に含まれる超可変領域は、ImMunoGeneTicデータベース(<http://imgt.cines.fr>)の分類に従って特定した。このデータベースは、Lefranc, M.-P.ら[Nucleic Acids Research, 27, p. 209-212 (1999)]、Ruiz, M.ら[Nucleic Acids Research, 28, p. 219-221 (2000)]、および、Lefranc, M.-P. [Nucleic Acids Research, 29, p. 207-209 (2001)]の論文を参照して作成されている。特定した超可変領域(CDR1~3)の位置を、DNA配列およびアミノ酸配列と共に、図1~4に示す。

40

発現ベクターpET22Δの作製

市販ベクターであるpET-22b(+)(Novagen社)の制限酵素サイトXbaI-NcoI間の配列を、市販ベクターであるpET-3d(Novagen社)の制限酵素サイトXbaI-NcoI間の配列に置換して、T7/lacプロモーター、ヒスチジンタグおよびT7ターミネーターを有する発現ベクターpET22Δを作製した。この発現ベクターpET22Δを、制限酵素NcoI(New England Biolabs社)とNotI(東洋紡社)で切断し、その末端をCalf intestine

50

Alkaline Phosphatase (東洋紡社) により脱リン酸化処理した。0.7%アガロースゲル電気泳動により、切断したpET22Δのバンドを分離し、ゲルを切り出し、MagExtractor-PCR & Gel Clean Up (東洋紡社) を用いてDNAをゲルより抽出した。このNcoI-NotIサイトに、以下のようにscFvフラグメントを組み込み、これをscFv発現ベクターとした。

cDNAからのscFvフラグメントの作製

クローニングした抗体遺伝子のH鎖およびL鎖のcDNAを、リンカー配列をコードするDNAにより連結し、これを発現ベクターに組み込むために、制限酵素配列を含むプライマーを用いて、H鎖およびL鎖のcDNAをPCRで増幅した。Dx3150 H鎖は、BamHIサイトの配列をGGATCCからGGATTCに変更し、かつ、BamHIサイトの前後の配列を含むようにプライマーを設計し、H鎖DNAを5'側と3'側の2つに分け増幅した。リンカーDNAは、fill-inによりH鎖およびL鎖のcDNAを連結するために、これらの配列の一部を含むプライマーによりPCRで増幅した。これによって、一本鎖抗体のアミノ末端側がH鎖となるものには、H鎖センスDNA 3'端側の配列をリンカーDNAの5'端側に、L鎖センスDNA 5'端側の配列をリンカーDNAの3'端側に付加した。また、一本鎖抗体のアミノ末端側がL鎖となるものには、L鎖センスDNA 3'端側の配列をリンカーDNAの5'端側に、H鎖センスDNA 5'端側の配列をリンカーDNAの3'端側に付加した。H鎖、L鎖およびリンカーDNAの増幅に用いたプライマーの組合せを表6および表7に示す。

表6 : scFv構築用PCRプライマー

<u>リンカー用オリゴ(センス)</u>		
GGA GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCC		(配列番号27)
<u>Dx3860 HL</u>		
・H鎖		
3860H 5' (Nco)	G ACC ATG GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GG	(配列番号28)
3860H 3' (Mro)	CC TCC GGA AGA GAC AGT GAC CAG GGT ACC TTG GC	(配列番号29)
・L鎖		
3860L 5' (Bam)	GC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号30)
3860L 3' (Not)	G AGC GGC CGC GCC TAG GAC AGT CAG TTT GGT	(配列番号31)
・リンカー延長		
リカー 5' (3860H)	GGT ACC CTG GTC ACT GTC TCT TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号32)
リカー 3' (3860L)	AGA TTC CTG AGT CAC AAC AGC CTG GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号33)
<u>Dx3860 LH</u>		
・L鎖		
3860L 5' (Nco)	G ACC ATG GCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号34)
3860L 3' (Mro)	CC TCC GGA GCC TAG GAC AGT CAG TTT GGT TCC TCC	(配列番号35)
・H鎖		
3860H 5' (Bam)	GC GGA TCC GAA GTG AAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GG	(配列番号36)
3860H 3' (Not)	G AGC GGC CGC TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT	(配列番号37)
・リンカー延長		
リカー 5' (3860L)	ACC AAA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号38)
リカー 3' (3860H)	CCC GGA CTC CAC CAG CTT CAC TTC GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号39)

10

20

30

40

表7 : scFv構築用PCRプライマー(続き)

<u>Dx3150 HL</u>		
・H鎖(5'側)		
3150H 5' (Nco)	G ACC ATG GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CC	(配列番号40)
3150H (128at)	CC TGG AAA CTG CCG AAT CCA GTT CCA GT	(配列番号41)
・H鎖(3'側)		
3150H (101sn)	AC TGG AAC TGG ATT CGG CAG TTT CCA GG	(配列番号42)
3150H 3' (Mro)	CC TCC GGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT ACC TTG GC	(配列番号43)
・L鎖		
3150L 5' (Bam)	GC GGA TCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号44)
3150L 3' (Not)	G AGC GGC CGC GCC TAG GAC AGT CAG TCT GGT	(配列番号45)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3150H)	GGT ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号46)
リンカー 3' (3150L)	AGA TTC CTG AGT CAC AAC AGC CTG GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号47)
<u>Dx3150 LH</u>		
・L鎖		
3150L 5' (Nco)	G ACC ATG GCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT	(配列番号48)
3150L 3' (Mro)	CC TCC GGA GCC TAG GAC AGT CAG TCT GGT TCC TCC	(配列番号49)
・H鎖(5'側)		
3150H 5' (Bam)	GC GGA TCC GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GG	(配列番号50)
3150H (128at)	CC TGG AAA CTG CCG AAT CCA GTT CCA GT	(配列番号51)
・H鎖(3'側)		
3150H (101sn)	AC TGG AAC TGG ATT CGG CAG TTT CCA GG	(配列番号52)
3150H 3' (Not)	G AGC GGC CGC TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT	(配列番号53)
・リンカー延長		
リンカー 5' (3150L)	ACC AGA CTG ACT GTC CTA GGC TCC GGA GGA GGC GGT TCA G	(配列番号54)
リンカー 3' (3150H)	TCC TGA CTC CTG AAG CTG TAC ATC GGA TCC GCC ACC GCC AG	(配列番号55)

10

20

30

40

50

PCR増幅を、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社)を使用し、rTaq DNAポリメラーゼ(東洋紡社)を用いて、次のように行った。即ち、94℃×1分間、58℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを5サイクル行い、さらに94℃×1分間、48℃×1分間、72℃×1分間の反応サイクルを20サイクル行った。PCR増幅の後、各PCR産物を3%アガロースゲル電気泳動により分離した。DNAフラグメントを含むゲルを切り出し、MagExtractor-PCR & Gel Clean Up(東洋紡社)を用いてDNAをゲルから抽出した。次いで、抽出したH鎖、L鎖およびリンカーDNAの3種類のDNAを混合し、rTaq DNAポリメラーゼ(東洋紡社)を用いて94℃×1.5分、65℃×3分の反応サイクルを20サイクル行うか、あるいは、Pfu DNAポリメラーゼ(STRATAGENE社)を用いて95℃×1.5分、65℃×6分の反応サイクルを20サイクル行うことにより、H鎖、L鎖およびリンカーDNAを連結した。

このように連結したscFvフラグメントを、それがコードするアミノ酸配列と共に、図5~8(配列番号56~59;アミノ酸配列のみは配列番号60~63)に示した。

図5(配列番号56)は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のH鎖可変領域、リンカー、Dx3860のL鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント(Dx3860HL)を示すものであり、そのアミノ酸配列の1~114位はH鎖可変領域を、115~129位はリンカーを、130~239位はL鎖可変領域を示す。

図6 (配列番号57) は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3860のL鎖可変領域、リンカー、Dx3860のH鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント (Dx3860LH) を示すものであり、そのアミノ酸配列の1~110位はL鎖可変領域を、112~126位はリンカーを、127~240位はH鎖可変領域を示す。

図7 (配列番号58) は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3150のH鎖可変領域、リンカー、Dx3150のL鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント (Dx3150HL) を示すものであり、そのアミノ酸配列の1~118位はH鎖可変領域を、119~133位はリンカーを、134~243位はL鎖可変領域を示す。

図8 (配列番号59) は、N末端側からモノクローナル抗体Dx3150のL鎖可変領域、リンカー、Dx3150のH鎖可変領域を、この順序で含むscFvフラグメント (Dx3150LH) を示すものであり、そのアミノ酸配列の1~110位はL鎖可変領域を、112~126位はリンカーを、127~244位はH鎖可変領域を示す。

さらに、得られたscFvフラグメントを増幅するために、反応溶液にscFvの両端 (NcoI-NotI) に対応するプライマーを加えてPCRを行った。Dx3860については、94℃×1分、67℃×1分、72℃×2分の反応サイクルを5サイクル行い、さらに94℃×1分、60℃×1分、72℃×2分の反応サイクルを20サイクル行った。Dx3150については、95℃×1分、62℃×1分、75℃×4分の反応サイクルを5サイクル行い、さらに95℃×1分、55℃×1分、75℃×4分の反応サイクルを20サイクル行った。PCR産物を、1.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、scFvのDNAフラグメント (730~740bp) を含むゲルを切り出し、DNAフラグメントをゲルから抽出した。次いで、このDNAフラグメントの末端を、制限酵素NcoI (New England BioLabs社) およびNotI (東洋紡社) により処理し、再度MagExtractorにより精製した。

scFv DNAフラグメントを、発現ベクターpET22ΔのNcoI-NotIサイトに挿入し、この発現ベクターで大腸菌XL1-Blueを形質転換した。ライゲーションにはDNA Ligetion Kit Ver. 2 (宝酒造社) を用い、コンピテントセルとしてXL1-Blue Competent Cells (STRATAGENE社) を使用した。サブクローニングしたクローンについて、scFv部分の配列を解析し、正しい配列を有するクローンを選択してscFvの発現に用いた。このようにして、scFvフラグメントDx3860HLを含む発現ベクターpET22Δ-Dx3860HLならびにscFvフラグメントDx3150HLを含む発現ベクターpET22Δ-Dx3150HLを得た。

発現ベクターpET22Δ-Dx3860HLは、大腸菌Bに導入し、大腸菌B (pET22Δ-Dx3860HL) として、また、発現ベクターpET22Δ-Dx3150HLは、大腸菌K-12に導入し、大腸菌K-12 (pET22Δ-Dx3150HL) として、平成15年2月27日に独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、それぞれ受託番号FERM BP-8305およびFERM BP-8306を取得した。

#### 大腸菌での発現

scFvフラグメントDx3860HLが組込まれた発現ベクターpET22Δ-Dx3860HLで形質転換した大腸菌Origami B (DE3) (Novagen社) を、LB培地300ml中、OD600が約0.5になるまで37℃で培養した。次いで、培養温度を25℃に下げて培養を続けた。OD600が約1.0になった時点で、IPTG (イソプロピルチオガラクトシド) を終濃度が1mMになるように添加し、終夜培養して、scFvの発現を誘導した。遠心により菌体約1gを回収した後、50mMトリス-HCl (pH8.0)、0.1M NaCl中に懸濁し、リゾチーム (終濃度0.2mg/ml) およびTriton X-100 (終濃度1%) を加えて溶菌した。遠心 (15,000xg、20分間) により沈殿を回収し、沈殿を1.0% Triton X-100を含む緩衝液で2回洗浄し、scFvを含む沈殿を約100mg得た。

#### scFvの再構成

10

20

30

40

50

封入体として得られた s c F v を、25 mM PB、350 mM NaCl、6 M グアニジン・HCl (pH 7.4) の緩衝液に加え、4℃で終夜静置して溶解した。遠心 (10,000 x g、15 分間) により残渣を除去した後、上記の緩衝液にて平衡化したニッケルキレートカラム (Qiagen 社) に適用した。カラム容積の約 5~10 倍量の緩衝液にてカラムを十分に洗浄した後、20%グリセロールおよび 400 mM アルギニンを含む上記緩衝液に交換した。6 M から 0 M までの グアニジン・HCl のグラジエントを用いて、キレートカラム上に結合した s c F v を再構成させた。25 mM PB、350 mM NaCl、20%グリセロール、50 mM イミダゾールの溶液 (pH 7.4) でカラムを洗浄した後、イミダゾール濃度を 300 mM に上げて s c F v を溶出させた。

抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF s c F v を用いた間接競合イムノアッセイによる 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の測定 10

マイクロタイタープレートに 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 誘導体-BSA コンジュゲート (1 μg/ml) 50 μl を加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween 20 含有 PBS (-) でマイクロタイタープレートの各ウェルを洗浄し、ブロッキング剤 (雪印社) を加え、室温で 2 時間静置してブロッキングを行った。マイクロタイタープレートを洗浄後、各濃度に調製した 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF (20% DMSO 溶液) 25 μl と抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF s c F v の溶液 25 μl を添加し、室温で 0.5~1 時間反応させた。再度マイクロタイタープレートを洗浄した後、2000 倍希釈した抗 tetra-His 抗体 (Qiagen 社) を加え室温で 1 時間反応させた。次いで、3000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (γ 鎖認識) 抗体 (KPL 社) 50 μl を添加し、室温で 1 時間反応させた。マイクロタイタープレートの各ウェルを十分に洗浄して未反応液を除去した後、基質溶液 (TMB 基質、KPL 社) を加え、室温で 15 分間静置した。50 μl の 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> を添加して反応を停止させ、プレートリーダー (Lab systems 社) により OD 450 (対照: OD 600) を測定した。この結果を図 9 にグラフで示す。このグラフから、抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF s c F v により、高感度に 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を測定できることが明らかである。 20

#### H鎖可変領域ポリペプチドの 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 結合活性の確認

発現ベクター pET22Δ-Dx3860HL の L 鎖可変領域を含む制限酵素サイト BamHI-NotI 間の配列を除去して作製した発現ベクター pET22Δ-Dx3860H を用いて大腸菌 Origami B (DE3) (Novagen 社) を形質転換した。この形質転換体を用いて、s c F v と同様に、H 鎖可変領域ポリペプチド (配列番号 5 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド) の発現を行った。 30

封入体として得られた H 鎖可変領域ポリペプチドを、上記と同様に、ニッケルキレートカラム上で再構成した後、イミダゾールを用いて単離および精製した。キレートカラムより溶出された画分について、吸光度 (280 nm) を測定してタンパク質濃度を求め、さらに、EIA 法により固相化した 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF-BSA コンジュゲートへの反応性を検討した。この結果、図 10 に示すように、H 鎖可変領域ポリペプチド画分に抗 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 活性を認め、H 鎖可変領域ポリペプチドが 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF に結合活性を有することを確認した。 40

#### H鎖への変異導入と変異体の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 結合活性の確認

モノクローナル抗体 Dx3860 の遺伝子配列をもとに、変異導入抗体遺伝子ライブラリーの作製を行った。抗体の H 鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) の遺伝子を鋳型とし、5' 側および 3' 側の配列に制限酵素サイトを付加したプライマーを設定し、error-prone PCR により変異を導入した。error-prone PCR は、Taq DNA ポリメラーゼが増幅中にしばしば読み間違いを起こす性質を利用し、さらに塩化マンガンの添加により PCR の際の読み間違いを意図的に誘発し、ランダムな変異を導入する方法である。この PCR 産物を、制限酵素による末端の処理と精製の後、その制限酵素サイトを利用して単鎖抗体発現ファージミドの H 鎖遺伝子と置き換え、これを用いて大腸菌 TG1 を形質転換した。 50

形質転換した大腸菌の培養液10mlに、アンピシリンを終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、また、M13K07ファージを終濃度 $4\times 10^9\text{ pfu}/\text{ml}$ となるよう添加し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間培養した。遠心分離により菌体を回収し、アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ とカナマイシン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む $2\times\text{YT}$ 培地10mlに再懸濁し、 $37^\circ\text{C}$ で終夜培養して培地中に単鎖抗体提示ファージを産生させた。培養液を遠心分離し、大腸菌菌体を除いた培養上清10mlに対し、 $2.5\text{M NaCl}$ 含有20%ポリエチレングリコール溶液2mlを加え、混和した。水上で1時間静置した後、冷却下、遠心分離( $10000\text{g}\times 20$ 分間)した。上清を完全に除去した後、得られた沈殿を10倍希釈ブロックエース(雪印社)1mlに溶解させ、単鎖抗体提示ファージ溶液とした。

調製した単鎖抗体提示ファージから、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体、2, 3, 7, 8-TCDF誘導体、およびクロロベンゼン誘導体に対する反応性の高いクローンを濃縮するため、バイオパニングを行った。調製したファージ溶液を、まずブロッキング剤のみを固相化したマイクロタイタープレート中でプレインキュベート( $100\mu\text{l}/$ ウェル、室温、1時間)することにより、非特異的結合を排除した。次いで、2, 3, 4, 7, 8-PeCDF誘導体、2, 3, 7, 8-TCDF誘導体、およびクロロベンゼン誘導体の各BSAコンジュゲートを固相化してブロックエースでブロッキングしたマイクロタイタープレートに移し( $100\mu\text{l}/$ ウェル)、8%DMSO存在下に室温で1時間反応させた。反応終了後、プレートの各ウェルに8%DMSOおよび0.1% Tween 20含有PBS(-)  $300\mu\text{l}$ を添加し、ピペッティングし、5分間静置した後、洗浄緩衝液を廃棄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、洗浄液を完全に除去し、0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH 2.2)  $100\mu\text{l}/$ ウェルを加え、10分間静置した。ピペッティングを行って、固相化抗原から遊離した単鎖抗体提示ファージを回収し、直ちにトリス溶液(pH 8.0)を加えて中和した。

$2\times\text{YT}$ 培地2.5ml中で培養した大腸菌TG1( $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.3$ )の培養液に、バイオパニングにより回収したファージ溶液を混和し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間培養してファージを再感染させた。次に、アンピシリン(終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )およびグルコース(終濃度2%)を含む培養液に、終濃度 $4\times 10^9\text{ pfu}/\text{ml}$ となるようM13K07ファージを添加し、さらに $37^\circ\text{C}$ で1時間培養を行った。遠心分離により菌体を回収した後、アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ とカナマイシン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む $2\times\text{YT}$ 培地10mlに再度懸濁し、 $37^\circ\text{C}$ で終夜培養した。これにより、単鎖抗体提示ファージを増幅し、培地中に産生させた(ファージレスキュー)。増幅したファージを、再びポリエチレングリコール沈殿により回収した。バイオパニングによる濃縮と再感染およびファージレスキューによる増幅を、3~5回繰り返した。

十分濃縮されたと考えられるファージクローンを、大腸菌TG1に感染させ、寒天平板培地にプレーティングし、 $30^\circ\text{C}$ で終夜培養して単一コロニー化した。スクリーニング条件ごとにTG1の単一コロニーから6クローンずつを無作為に選び、常法によりファージミドを調製し、これを鋳型としてBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0(Applied Biosystems社)によるシーケンス反応を行った。ジェネティックアナライザABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems社)により塩基配列を解析し、4種類の $V_H$ 鎖変異導入体(Dx3860HL-M#5、Dx3860LH-M#1、Dx3860LH-M#2、Dx3860LH-M#3)を得た。これら $V_H$ 鎖変異体のアミノ酸配列を、図11および配列番号64~67に示した。Dx3860野生型 $V_H$ (WT)と比較したところ、1~2個のアミノ酸の変異が見られた。また、変異導入箇所はCDR部位に特定されず、フレームワークにも認められた。

いずれの変異体も間接競合イムノアッセイにより2, 3, 4, 7, 8-PeCDFを認識することを確認した(図12)。また、抗体価やDMSO中での反応性には差が見られ、抗体価およびDMSO中での安定性はいずれも、変異体の方が野生型を上回る結果を示した(図13および図14)。さらに、この傾向は形質転換した大腸菌[Origami

B (DE 3) ]にて発現させた各 s c F vにおいても保持されていた。

**【産業上の利用の可能性】**

本発明により提供されるDNAを用いて宿主細胞内で発現させることにより、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを認識する組換抗体を大量に製造することができる。このように製造された組換抗体は、親モノクローナル抗体より安価であり、それを用いて2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fを免疫学的に捕獲することができ、免疫測定に応用することができる。また、変異を導入したDNAを用いることにより、さらに有利な特性を有する組換抗体、例えば、2, 3, 4, 7, 8-P e C D Fへの親和性が向上した組換抗体や安定性が改善された組換抗体などを製造することができ、生体成分である天然の抗体タンパク質が有する問題点の克服も可能となる。

10

**【配列表】**

## SEQUENCE LISTING

<110> Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd.

<120> Recombinant antibody recognizing dioxin  
and gene encoding said antibody

<130> 664413

<150> JP 2003-091663

<151> 2003-03-28 10

<160> 67

<210> 1

<211> 342

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Inventor: Sawadaishi, Kazuyuki  
Inventor: Higano, Keiichi  
Inventor: Kataoka, Chiwa 20

<220>

<223> DNA encoding polypeptide of H-chain variable region of  
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 1

gaa gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48  
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt tcc tat 96  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 30  
20 25 30

gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg gag tgg gtc 144  
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

gca tcc ttt agt aat ggt ggt atc acc tac tat cca gac agt gtg aag 192  
Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gat aat gcc agg aac atc ctg tac ctg 240 40  
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

caa atg acc agt ctg agg tct gag gac acg gcc att tat tac tgt gca 288  
Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

aga ggc tat ggt cct gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc 336  
 Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
                   100                                  105                                  110

tct gca 342  
 Ser Ala

<210> 2

<211> 330

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> DNA encoding polypeptide of L-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3860

10

<400> 2

cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa 48  
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu  
 1                                  5                                  10                                  15

aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act ctt 96  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu  
                   20                                  25                                  30

20

aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt 144  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
                   35                                  40                                  45

cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc 192  
 Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
                   50                                  55                                  60

tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca 240  
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65                                  70                                  75                                  80

30

cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc aac 288  
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
                                   85                                  90                                  95

cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc 330  
 His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
                   100                                  105                                  110

40

<210> 3

<211> 354

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> DNA encoding polypeptide of H-chain variable region of

## monoclonal antibody Dx 3150

&lt;400&gt; 3

gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct cag 48  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

tct ctg tct ctc acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt ggc 96  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30

ttt tac tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gaa tgg 144  
 Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45

10

atg ggc tac ata agc tac gac ggt tac aat aat tac aac cca ttt ctc 192  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu  
 50 55 60

aaa aat cga gtg tcc atc act cgt gac aca tct gag aac cag ttt ttc 240  
 Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

20

ctg aag ttg cat tct gtg act act gag gac aca gct aca tat tac tgt 288  
 Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gta agt tac ggt agt cgg agg gga gtt acc tac tgg ggc caa ggc acc 336  
 Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

act ctc aca gtc tcc tca 354  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

30

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Unknown

&lt;220&gt;

<223> DNA encoding polypeptide of L-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3150

&lt;400&gt; 4

cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa 48  
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

40

aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act agt 96  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30

aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt	144
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly	
35 40 45	
cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc	192
Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe	
50 55 60	
tct ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca	240
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	
65 70 75 80	10
cag act gag gat gag gog ata tat ttc tgt gct ctt tgg tac aac acc	288
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr	
85 90 95	
cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aga ctg act gtc cta ggc	330
His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly	
100 105 110	
<210> 5	
<211> 114	20
<212> PRT	
<213> Unknown	
<220>	
<223> Polypeptide of H-chain variable region of monoclonal antibody Dx 3860	
<400> 5	
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	30
20 25 30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys	
50 55 60	
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu	
65 70 75 80	
Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala	40
85 90 95	
Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
100 105 110	
Ser Ala	

<210> 6  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Polypeptide of L-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3860

<400> 6  
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu  
 1 5 10 15 10  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80 20  
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 7  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Polypeptide of H-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3150

<400> 7  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15 30  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30 40  
 Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu  
 50 55 60 40

Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

10

<210> 8  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Polypeptide of L-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3150

<400> 8  
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu  
 1 5 10 15 20

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
 35 40 45

Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr  
 85 90 95

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

20

30

<210> 9  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Peptide of CDR 1 in H-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3860

<400> 9

40

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 2 in H-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3860

10

<400> 10

Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 3 in H-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3860

20

<400> 11

Ala Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 1 in L-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3860

30

<400> 12

Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu Asn Tyr

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Peptide of CDR 3 in L-chain variable region of  
 monoclonal antibody Dx 3860

40

<400> 13

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Leu

1	5	
<210>	14	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	Unknown	
<220>		
<223>	Peptide of CDR 1 in H-chain variable region of monoclonal antibody Dx 3150	
<400>	14	10
	Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr	
	1 5	
<210>	15	
<211>	7	
<212>	PRT	
<213>	Unknown	
<220>		
<223>	Peptide of CDR 2 in H-chain variable region of monoclonal antibody Dx 3150	20
<400>	15	
	Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn	
	1 5	
<210>	16	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	Unknown	
<220>		
<223>	Peptide of CDR 3 in H-chain variable region of monoclonal antibody Dx 3150	30
<400>	16	
	Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr	
	1 5 10	
<210>	17	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	Unknown	
<220>		
<223>	Peptide of CDR 1 in L-chain variable region of monoclonal antibody Dx 3150	40
<400>	17	
	Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr	
	1 5	



<220>  
 <223> Primer

<400> 22  
 actagtcgac atgggatgga gctrtatcat sytctt 36

<210> 23  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence 10  
 <220>  
 <221> modified base  
 <222> (30)..(30)  
 <223> i

<400> 23  
 cccaagcttc caggrccar kggataracn grtgg 35

<210> 24  
 <211> 33  
 <212> DNA 20  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer

<400> 24  
 gggaattcat ggcttggayt ycwctywtmy tct 33

<210> 25  
 <211> 32  
 <212> DNA 30  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> modified base  
 <222> (24)..(24)  
 <223> i

<400> 25  
 cccaagctta gctcytcwgw gganggyggr aa 32

<210> 26  
 <211> 20 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer

<400> 26  
 taatagact cactataggg 20

<210> 27		
<211> 45		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Linker		
<400> 27		
ggaggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcc	45	
<210> 28		10
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 28		
gaccatggaa gtgaagctgg tggagtccgg ggg	33	
<210> 29		20
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 29		
cctccggaag agacagtgac cagggtacct tggc	34	
<210> 30		30
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 30		
gcggatccca ggctgttgatg actcaggaat ct	32	
<210> 31		40
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		

<400> 31		
gagcggccgc gcctaggaca gtcagtttgg t	31	
<210> 32		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 32		10
ggtaccctgg tcactgtctc ttccggagga ggcggttcag	40	
<210> 33		
<211> 41		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 33		20
agattcctga gtcacaacag cctgggatcc gccaccgcca g	41	
<210> 34		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 34		30
gaccatggcc caggetgttg tgactcagga atct	34	
<210> 35		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 35		40
cctccggagc ctaggacagt cagtttggtt cctcc	35	
<210> 36		
<211> 37		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		

<223> Primer  
 <400> 36  
 gcggatccga agtgaagctg gtggagtccg ggggagg 37  
 <210> 37  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer 10  
 <400> 37  
 gagcggccgc tgcagagaca gtgaccagag t 31  
 <210> 38  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer 20  
 <400> 38  
 accaaactga ctgtcctagg ctccggagga ggcggttcag 40  
 <210> 39  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer 30  
 <400> 39  
 cccggactcc accagettca cttcggatcc gccaccgcca g 41  
 <210> 40  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer 40  
 <400> 40  
 gaccatggat gtacagcttc aggagtcagg acc 33  
 <210> 41  
 <211> 28  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 <400> 41  
 cctggaaact gccgaatcca gttccagt 28  
  
 <210> 42  
 <211> 28  
 <212> DNA 10  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 <400> 42  
 actggaactg gattcggcag tttccagg 28  
  
 <210> 43  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence 20  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 <400> 43  
 cctccggagg agactgtgag agtggtagct tggc 34  
  
 <210> 44  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence 30  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 <400> 44  
 gcggatccca ggctggttg actcaggaat ct 32  
  
 <210> 45  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220> 40  
 <223> Primer  
  
 <400> 45  
 gagcggccgc gcctaggaca gtcagtctgg t 31  
  
 <210> 46

<211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer

<400> 46  
 ggtaccactc tcacagtctc ctccggagga ggcggttcag 40

<210> 47 10  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer

<400> 47  
 agattcctga gtcacaacag cctgggatcc gccaccgcca g 41

<210> 48 20  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer

<400> 48  
 gaccatggcc caggctgttg tgactcagga atct 34

<210> 49 30  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer

<400> 49  
 cctccggagc ctaggacagt cagtctggtt cctcc 35

<210> 50 40  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer

<400> 50  
 gcggatccga tgtacagett caggagtcag gacctgg 37

<210> 51		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 51		
cctggaaact gccgaatcca gttccagt	28	
		10
<210> 52		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 52		
actggaactg gattcggcag tttccagg	28	
		20
<210> 53		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 53		
gagcggccgc tgaggagact gtgagagtgg t	31	
		30
<210> 54		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 54		
accagactga ctgtcctagg ctccggagga ggcggttcag	40	
		40
<210> 55		
<211> 41		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 55		

tcctgactcc tgaagctgta catcggatcc gccaccgcca g

41

<210> 56

<211> 717

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> scFv fragment Dx3860HL

<400> 56

gaa gtg aag ctg gtg gag tcc ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48 10  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt tcc tat 96  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg gag tgg gtc 144  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

gca tcc ttt agt aat ggt ggt atc acc tac tat cca gac agt gtg aag 192 20  
 Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gat aat gcc agg aac atc ctg tac ctg 240  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

caa atg acc agt ctg agg tct gag gac acg gcc att tat tac tgt gca 288  
 Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

aga ggc tat ggt cct gct tac tgg ggc caa ggt acc ctg gtc act gtc 336  
 Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

tct tcc gga gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga 384  
 Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

tcc cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt 432  
 Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly  
 130 135 140

gaa aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act 480  
 Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr  
 145 150 155 160

ctt aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa oca gat cat tta ttc act 528  
 Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr

	165	170	175		
ggt cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga				576	
Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg					
	180	185	190		
ttc tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg				624	
Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly					
	195	200	205		
gca cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc				672	10
Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser					
	210	215	220		
aac cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc				717	
Asn His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly					
	225	230	235		
<210> 57					
<211> 720					
<212> DNA					
<213> Unknown					20
<220>					
<223> scFv fragment Dx3860LH					
<400> 57					
cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa				48	
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu					
	1	5	10	15	
aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act ctt				96	
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu					
	20	25	30		30
aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt				144	
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly					
	35	40	45		
cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc				192	
Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe					
	50	55	60		
tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca				240	
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala					
	65	70	75	80	40
cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc aac				288	
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn					
	85	90	95		
cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc tcc gga				336	
His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly					

100	105	110		
gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc gaa gtg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val			384	
115	120	125		
aag ctg gtg gag tcc ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg tcc ctg Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu			432	
130	135	140		
aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt tcc tat gcc atg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met			480	10
145	150	155		
tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg gag tgg gtc gca tcc Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser			528	
165	170	175		
ttt agt aat ggt ggt atc acc tac tat cca gac agt gtg aag ggc cga Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg			576	
180	185	190		
ttc acc atc tcc aga gat aat gcc agg aac atc ctg tac ctg caa atg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu Gln Met			624	20
195	200	205		
acc agt ctg agg tct gag gac acg gcc att tat tac tgt gca aga ggc Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly			672	
210	215	220		
tat ggt cct gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			720	
225	230	235		
				30
<210> 58				
<211> 729				
<212> DNA				
<213> Unknown				
<220>				
<223> scFv fragment Dx3150HL				
<400> 58				
gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct cag Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln			48	
1	5	10	15	40
tct ctg tct ctc acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt ggc Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly			96	
20	25	30		
ttt tac tgg aac tgg att cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gaa tgg Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp			144	

35	40	45		
atg ggc tac ata agc tac gac ggt tac aat aat tac aac cca ttt ctc Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu 50 55 60			192	
aaa aat cga gtg tcc atc act cgt gac aca tct gag aac cag ttt ttc Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe 65 70 75 80			240	
ctg aag ttg cat tct gtg act act gag gac aca gct aca tat tac tgt Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys 85 90 95			288	10
gta agt tac ggt agt cgg agg gga gtt acc tac tgg ggc caa ggt acc Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110			336	
act ctc aca gtc tcc tcc gga gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 115 120 125			384	
ggc ggt ggc gga tcc cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr 130 135 140			432	20
aca tca cct ggt gaa aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly 145 150 155 160			480	
gct gtt aca act agt aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp 165 170 175			528	
cat tta ttc act ggt cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly 180 185 190			576	30
gtt cct gcc aga ttc tct ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu 195 200 205			624	
acc atc aca ggg gca cag act gag gat gag gcg ata tat ttc tgt gct Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala 210 215 220			672	
ctt tgg tac aac acc cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aga ctg act Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr 225 230 235 240			720	40
gtc cta ggc Val Leu Gly			729	

<210> 59  
 <211> 732  
 <212> DNA  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> scFv fragment Dx3150LH

<400> 59

cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa	48	
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu		
1 5 10 15		10
aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct gtt aca act agt	96	
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser		
20 25 30		
aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt	144	
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly		
35 40 45		
cta ata ggt aat acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc	192	
Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe		
50 55 60		20
tct ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca	240	
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
65 70 75 80		
cag act gag gat gag gcg ata tat ttc tgt gct ctt tgg tac aac acc	288	
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr		
85 90 95		
cat ttg gtg ttc ggt gga gga acc aga ctg act gtc cta ggc tcc gga	336	
His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly		
100 105 110		30
gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc gat gta	384	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val		
115 120 125		
cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct cag tct ctg	432	
Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu		
130 135 140		
tct ctc acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt ggc ttt tac	480	
Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr		
145 150 155 160		40
tgg aac tgg att cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gaa tgg atg ggc	528	
Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly		
165 170 175		



130	135	140	
Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr 145	150	155	160
Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr 165	170	175	
Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg 180	185	190	
Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly 195	200	205	10
Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser 210	215	220	
Asn His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly 225	230	235	
<210> 61			
<211> 240			20
<212> PRT			
<213> Unknown			
<220>			
<223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3860LH			
<400> 61			
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu 1	5	10	15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu 20	25	30	30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly 35	40	45	
Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe 50	55	60	
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala 65	70	75	80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn 85	90	95	40
His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly 100	105	110	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val 115	120	125	

Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu  
 130 135 140  
 Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser  
 165 170 175  
 Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg  
 180 185 190

10

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu Gln Met  
 195 200 205  
 Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly  
 210 215 220  
 Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 225 230 235 240

<210> 62  
 <211> 243  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3150HL

20

<400> 62  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30  
 Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu  
 50 55 60  
 Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125

40

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr  
 130 135 140

Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly  
 145 150 155 160

Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp  
 165 170 175

His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly  
 180 185 190

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu  
 195 200 205

Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala  
 210 215 220

Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr  
 225 230 235 240

Val Leu Gly

<210> 63  
 <211> 244  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Polypeptide encoded by scFv fragment Dx3150LH

<400> 63  
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
 35 40 45

Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr  
 85 90 95

His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val  
 115 120 125

Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu  
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr  
 145 150 155 160

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly  
 165 170 175

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Asn  
 180 185 190

Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe Phe Leu Lys  
 195 200 205

Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ser  
 210 215 220

Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

10

20

<210> 64  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Polypeptide of V<sub>H</sub>-chain variant (HL-M#5) of  
 monoclonal antibody Dx 3860

30

<400> 64  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

40

85

90

95

Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser

<210> 65

<211> 114

<212> PRT

<213> Unknown

10

<220>

<223> Polypeptide of V<sub>H</sub>-chain variant (LH-M#1) of  
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 65

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

20

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ser Leu Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

30

Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ala

<210> 66

<211> 114

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

40

<223> Polypeptide of V<sub>H</sub>-chain variant (LH-M#2) of  
monoclonal antibody Dx 3860

<400> 66

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ser Val Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

10

Ser Ala

<210> 67  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220>  
 <223> Polypeptide of V<sub>H</sub>-chain variant (LH-M#3) of  
 monoclonal antibody Dx 3860

20

<400> 67  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ser Leu Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Val Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Gly Tyr Gly Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

30

40

Ser Ala

【 図 1 】

第 1 図

Dx3860 Vh

1 GAA GTG AAG CTG GTC GAG TCC GGC GGA GGC TTA GTG AAG CTT GGA GGG TCC CTG AAA CTC 60  
 1 Gln Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu 20

61 TCC TGT GCA GCC TGT GAA TTA ACT TTC AGT TCC TAT GGC ATG TCT TGG TTT CCG CAG ACT 120  
 21 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Glu Thr 40

121 GCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT GAT ATC ACC TAC TMT GCA 180  
 41 Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Trp Pro 60

181 GAC AGT GTG AAG GGC GAA TTA ACC ATC TCC AGA GAT AAT GGC AGG AAC ATC CTG TAC CTG 240  
 61 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu 80

241 GAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG CAG AGC GGC ATT TAT TAC TGT GCA AGA GGC TAT GGT 300  
 81 Glu Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Trp Cys Ala Arg Gly Tyr Gly 100

301 CCT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT GTC GCT ACT GTC TCT GCA 342  
 101 Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 114

【 図 2 】

第 2 図

Dx3860 Vh

1 CAG GCT GGT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC 60  
 1 Gln Ala Val Val Thr Glu Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu 20

61 ACT TGT GGC TCA AGT ACT GGG GCT GTC ACA ACT CTT AAG TAT GCA AAC TGG GTC CAA GAA 120  
 21 Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu Asn Tyr Ala Asn Trp Val Glu Glu 40

121 AAA CCA GAT GAT TTA TTT ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CCA GCT CCA GGT GGT 180  
 41 Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val 60

181 CCT GGC AGA TTT TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAG AAG GGT GGC CTC ACC ATC ACA GGG GCA 240  
 61 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala 80

241 CAG ACT GAG GAT GAG GGG ATA TAT TTC TGT GCT CTA TGG TAC AGC AAC CAT TTG GTC TTC 300  
 81 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Leu Val Phe 100

301 GGT GGA GGA ACC AAA GTC ACT GTC CTA GGC 330  
 101 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly 110

【 図 5 】

第 5 図

Dx3860HL scFv

1 GAA GTG AAG CTG GTC GAG TCC GGC GGA GGC TTA GTG AAG CTT GGA GGG TCC CTG AAA CTC 60  
 1 Gln Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu 20

61 TCC TGT GCA GCC TGT GAA TTA ACT TTC AGT TCC TAT GGC ATG TCT TGG TTT CCG CAG ACT 120  
 21 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Glu Thr 40

121 GCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT GAT ATC ACC TAC TMT GCA 180  
 41 Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Trp Pro 60

181 GAC AGT GTG AAG GGC GAA TTA ACC ATC TCC AGA GAT AAT GGC AGG AAC ATC CTG TAC CTG 240  
 61 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu 80

241 GAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG CAG AGC GGC ATT TAT TAC TGT GCA AGA GGC TAT GGT 300  
 81 Glu Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Trp Cys Ala Arg Gly Tyr Gly 100

301 CCT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT GTC GCT ACT GTC TCT GCA 342  
 101 Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 114

【 図 3 】

第 3 図

Dx3150 Vh

1 GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GGA CCT GGC CTC GTC AAA CCT TCT CAG TCT CTG TCT CTC 60  
 1 Asp Val Glu Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Ser Leu Ser Leu 20

61 ACC TGT TCT GCT ACT GGC TAC TCC ATC ACC ACT GGC TTT TAC TGG AAC TGG ATC GCG CAG 120  
 21 Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Glu 40

121 TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG GGC TAC AAA AGC TAC CAG GGT TAC AAT AAT TAC 180  
 41 Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Asn Tyr 60

181 AAC CCA TTT CTC AAA AAT GGA GTG TCC ATC ACT GGT GAC ACA TCT GAG AAC CAG TTT TCT 240  
 61 Asn Pro Phe Leu Lys Asn Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Glu Phe Phe 80

241 CTG AAG TTG CAT TCT GTG ACT ACF GAG GAC ACA GCT ACA TAT TAC TGT GTA AAT TAC TGT 300  
 81 Leu Lys Leu His Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ser Tyr Gly 100

301 AGT CCG AGG GGA GGT ACT TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA 354  
 118 Thr Arg Arg Gly Val Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

【 図 4 】

第 4 図

Dx3150 Vh

1 CAG GCT GGT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC 60  
 1 Gln Ala Val Val Thr Glu Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu 20

61 ACT TGT GGC TCA AGT ACT GGG GCT GTC ACA ACT CTT AAG TAT GCA AAC TGG GTC CAA GAA 120  
 21 Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Glu Glu 40

121 AAA CCA GAT GAT TTA TTT ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACC AAC AAC CCA GCT CCA GGT GGT 180  
 41 Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Asn Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val 60

181 CCT GGC AGA TTT TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAG AAG GGT GGC CTC ACC ATC ACA GGG GCA 240  
 61 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala 80

241 CAG ACT GAG GAT GAG GGG ATA TAT TTC TGT GCT CTA TGG TAC AGC AAC CAT TTG GTC TTC 300  
 81 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr His Leu Val Phe 100

301 GGT GGA GGA ACC AAA GTC ACT GTC CTA GGC 330  
 101 Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly 110

【 図 6 】

第 6 図

Dx3860LH scFv

1 GAA GTG AAG CTG GTC GAG TCC GGC GGA GGC TTA GTG AAG CTT GGA GGG TCC CTG AAA CTC 60  
 1 Gln Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu 20

61 TCC TGT GCA GCC TGT GAA TTA ACT TTC AGT TCC TAT GGC ATG TCT TGG TTT CCG CAG ACT 120  
 21 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Glu Thr 40

121 GCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TCC TTT AGT AAT GGT GAT ATC ACC TAC TMT GCA 180  
 41 Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser Phe Ser Asn Gly Gly Ile Thr Tyr Trp Pro 60

181 GAC AGT GTG AAG GGC GAA TTA ACC ATC TCC AGA GAT AAT GGC AGG AAC ATC CTG TAC CTG 240  
 61 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu 80

241 GAA ATG ACC AGT CTG AGG TCT GAG CAG AGC GGC ATT TAT TAC TGT GCA AGA GGC TAT GGT 300  
 81 Glu Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Trp Cys Ala Arg Gly Tyr Gly 100

301 CCT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT GTC GCT ACT GTC TCT GCA 342  
 101 Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 114

【図7】

第7図

D x3150HL spFv

1 GAT GAA CAG CTT CAG CAG TCA GGA CCG CCG CTT GTC AAA COT TGT CAG TCT CAG TTT CFC 66  
 CTA CAT GTC GAA GCG CTC APT CCG GGA CCG CAG GAG GAT GTC AAA GAG GAG GAG 67  
 2 Asp-Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Leu 70  
 Linker  
 61 ACC TGT TGT GTC ACC GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGC TTT TAC TGG AAC TGG ATG CCG CAG 120  
 TGG ACC GGA GAG TGA CCG ATC AGC GTC TGG TGA GAA ATG ACC TTT ACC TGA GTC GTC 121  
 21 Thr-Cys-Ser-Val-Thr-Gly-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ser-Gly-Thr-Ser-Tyr-Asp-Tyr-Ile-Arg-Gln 40  
 Linker  
 121 TTT CCA GGA AAC AAA CCG GAA TGG ATG GGC TAC ATA ACC TAC GAC GGT TAC AAT AAT TAC 160  
 AAA GCG COT TGT TTT GGC CTT ACC TGC CCG AGT GAT TGC ATG CCG CCA ACC TTA TTA ATG 161  
 19b-Phe-Gly-Asn-Lys-Leu-Glu-Trp-Met-Gly-Tyr-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Tyr-Asn-Asn-Tyr 160  
 Linker  
 181 AAC CCA TTT CTC AAA AAT CCA GGC TCC ATC ACT GGT GGC AGA TCT GAG AAC CAG TTT TTC 240  
 TTS GGT AAA GAG TTT TTT GCT CAG ACC TGC TGA GCA CTT TGT AGA CAC TTC TTC GTC AAA GAG 241  
 61 Asp-Phe-Phe-Leu-Lys-Asn-Arg-Val-Ser-Ile-Thr-Ala-Ser-Thr-Ser-Glu-Asn-Gln-Phe-Phe 80  
 Linker  
 241 CTA GAT TTT CAT TCT GTC ACT ACT GAG GAG ACA GGT ACA TAT TAC TGT GTA AGT TAC GGT 300  
 GAC TTC ACC GTA AGA GAG TGA TGA CTT CCG TGG TGT GTC TGT AGA CAC TTC TTC GTC AAA GAG 301  
 14a-Lys-Leu-His-Leu-Ser-Val-Thr-Gly-Val-Glu-Arg-Thr-Ala-Ser-Thr-Tyr-Cys-Val-Ser-Ser-Gly 300  
 Linker  
 301 AGT CCG AGG GGA GTF ACC TAC TGG GGC CAA GGT ACC CTC ACA GTC TCC TCC GGA GGA 360  
 TCA ACC TCC CCT CAA TGG ATG ACC CCG CTT CAA TGG TGA GAG TGT CAG AGG AGG CTT CCG 361  
 101 Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr-Trp-Gly-Glu-Gly-Thr-Thr-Leu-Thr-Val-Ser-Ser-Ser-Gly 360  
 Linker  
 361 GGC GGT TCA GCG GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCC CAG GCT CTT CTC AAT CAG GAA 420  
 CCG CCA AAT CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG 421  
 121 His-Ile-Gly-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser 420  
 Linker  
 421 TCT CCA CTC ACC ACA TCA CTT GAT GAA GAA GTC ACA CTC ACT TGT CCG TCA AGT ACT GGG 480  
 AGA CPT CAG TGT TAT AGT GAA CCA CTT CTT CAG TGT GAG TGA ACA CCG AAT TCA TGA CCC 481  
 141 Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Ser-Thr-Ser-Asp-Arg-Ile-Thr-Val-Thr-Thr-Leu-Thr-Val-Ser-Ser-Thr-Gly 480  
 Linker  
 481 GCT GAT ACA ACT AGT AGC TAT GCG AAC TGG GGC CCA GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT 540  
 CCA CAA TGT TGA TCA TTA ATG ACC TIG ACC CAG GTC CTT TTT GGT CTA GTA AAT AAT TGA 541  
 161 His-Val-Thr-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ala-Asn-Trp-Val-Gln-Gln-Lys-Pro-Asp-Gln-Ser-Phe-Thr-Tyr 540  
 Linker  
 541 GGT CTA ATG GCT AAT ACC TAC AAC CCA GGT CCA GGT GTC GGC AGA TCT TCT GGC TCC 600  
 CCA GAT TAT CCA TTA TGG TGG TTT GCT CCA GGT CCA GAA GGA GAG TCT AAG AGA CCG AGS 601  
 181 Gly-Leu-Ile-Gly-Asn-Val-Thr-Ser-Asp-Arg-Ile-Phe-Gly-Val-Pro-Ala-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser 600  
 Linker  
 601 CTS AIT GGA GAG AAC GGT GGC CTT ACC ATC ACA GGG CCA CAA ACT GAG GAT GAG GGC ATA 660  
 GAC TAA COT CCG TTC CCA CCG GAG TGG TGG TGT CCG CCG TGT GCA CFC TTA CTC CCG TAT 661  
 201 Leu-Ile-Gly-Asp-Lys-Ala-Ile-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Ile 660  
 Linker  
 661 TAT TTC TGT GCT CTT TGG AAC ACC CAA TTS GGT TCT GGT GGA GGA ACC AGA CTT ACT 720  
 ACA AAG ACA CCA GAA ACC AIG TTS TGG GTA AAC GAG AAC CCA GGT COT TGT TGT GGT TGA 721  
 221 Tyr-Thr-Cys-Ala-Leu-Trp-Tyr-Asn-Thr-Ile-Leu-Val-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Arg-Leu-Tar 720  
 Linker  
 721 CTT CTA GGC 729  
 CAG GAG CCG  
 241 Val-Leu-Gly 243

【図8】

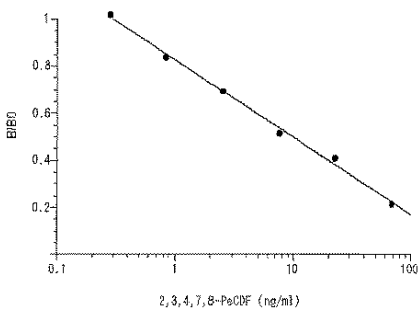
第8図

D x3150LH spFv

1 CAG GCT GTT GTC ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA CTC ACA CTC 60  
 GTC CCA CAA CAC TGA CTT CTA GAT GAT TGG TGG AGT GGA CCA CTT TGT GAT TGT GAG 61  
 2 His-Ile-Val-Val-Thr-Gln-Glu-Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Ser-Pro-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Leu 60  
 Linker  
 61 ACC TGT CCG TCA AGT ACT GGG GCT GGT ACA ACT AGT TAT GCG AAC TGG GTC CAA GAA 120  
 TGA ACA CCG ACT TCA TGA DCC CCA GAA TGT TGA TCA TTA GGA CCG TTT ACC CAG CTT GTC 121  
 21 Thr-Cys-Arg-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Val-Thr-Thr-Ser-Asn-Tyr-Ile-Asn-Trp-Val-Gln-Glu 40  
 Linker  
 121 AAA GCA GAT GAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT AAT ACT AAC AAC ACA GCT CCA GGT GGT 180  
 TTT GGT CTA GTA AAT AAG TGA CCA GAT TAT CCA TTT TGG TGT TTT GCT GCA GGT CCA GAA 181  
 41 Lys-Pro-Asp-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Leu-Ile-Gly-Asn-Thr-Asn-Asn-Arg-Ala-Pro-Gly-Val 60  
 Linker  
 181 CCG GCG ACA TTT TGT GGC TCC CAG ACT GGA GAG AAC GCT GGC ACC AGC ACA GGG GCA 240  
 GGA GCG COT AAG AGA CCG AGG CAG TGA GCT CTS TTC GAA CCG GAG TGG TGT CTT CCG COT 241  
 61 Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Leu-Ile-Gly-Asp-Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala 80  
 Linker  
 241 CAG ACP GAG GAT GRS GCG AFA TAT TTC TGT GCT CTT TGG TAC AAC ACC CTT TTT GTC TTC 300  
 GTC TGG CTT CTA TTC CCG TTT TGA TAC GAG ACA GCA ACC AAT TTT TGG TTA AAC CAG CAG 301  
 81 Glu-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Ile-Tyr-Phe-Lys-Ala-Leu-Tyr-Tyr-Asp-Thr-His-Leu-Val-Phe 100  
 Linker  
 301 GGT GGA GAG ACC AGA CCG ACT CFC GTA GGC TCC GGA GGA GAG GGT TCA GCG GAA GGT GGC 360  
 CTA CPT CTT TGT TGT CAG TGA CAG GAT CCG AGG GCT CCG GCG CCA APT CCG CCG CCA CCG 361  
 101 Gly-Gly-Thr-Arg-Leu-Thr-Val-Leu-Gly-Ser-Lys-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Thr-Gly-Ala 120  
 Linker  
 361 TCT GGC GGC GGC GGA TCC GAT GTA CAG CTT CAG GAG TCA GCA CCG CCG GCG CTC TTC AAA CCG 420  
 AGA CCG CCA CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG 421  
 121 His-Ile-Gly-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser-Val-Thr-Ser 420  
 Linker  
 421 TCT CAG TCT CAG TCT CAG TCT CAG TCT CAG TCT CAG TCT CAG TCT CAG TCT CAG TCT CAG 480  
 TGA GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT 481  
 161 Ser-Glu-Ser-Thr-Ser-Leu-Thr-Cys-Ser-Val-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr 480  
 Linker  
 481 TGG AAC TGG AAT CCG CAG TTT CCA GGA AAC AAA CTS CAA TGG ATG GCG TAC ATA AGC TAC 540  
 ACC TTC AGC TAA GCT CFC AAA GGT CCI TTT TTT GGT GGT ACC TAC GGT AAG TAT TCG AAT 541  
 161 Trp-Asp-Trp-Ile-Arg-Gln-Phe-Pro-Gly-Asn-Lys-Leu-Glu-Thr-Met-Gly-Tyr-Ile-Ser-Tyr 540  
 Linker  
 541 GAG GAG TAC AAT AAT TAC AAC CCA TTT CTC AAA AAT CCA GAT GAT TCC ACC ACT CPT GAC 600  
 CAG CCA HIS TTA TTA ATG TTT GGT AAA GAT TTT TTA GCT CAG AGG TGG TGG TCG CCA CTT TGT 601  
 181 Asp-Gly-Thr-Ser-Asn-Arg-Ile-Thr-Leu-Lys-Leu-His-Ser-Val-Thr-Thr-Glu-Ser-Thr-Ile-Thr-Tyr 600  
 Linker  
 601 TCT GAG AAC CAG TTT TTC CTT GAG TGG TGG CAG TCT CTT GTC ACT GAG GAG ACA GCT ACA TAT 660  
 AGA CTT TTS GIG AAA GAG GAG TTC AAC GTA GGA CAG TGA TGA CTC CTT TCT CCA TGT ATA 661  
 201 Ser-Glu-Ser-Gln-Phe-Thr-Leu-Lys-Leu-His-Ser-Val-Thr-Thr-Glu-Ser-Thr-Ile-Thr-Tyr 660  
 Linker  
 661 TAC TGT GTA AGT TAC GGT AGT GCG AGG GGA GTT ACC TAT TGG GCG CAA GCG ACC ACT CTC 720  
 ATG ACP CAT TCA ATG CCA TCA GGC TCC COT CAA TGG AYS AAC CCG GGT CCG TGG TGA CAG 721  
 221 Tyr-Thr-Val-Ser-Tyr-Gly-Ser-Arg-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr-Trp-Gly-Glu-Gly-Thr-Thr-Leu 720  
 Linker  
 721 ACA GAT TCC TCA 732  
 TGT CAG AGS AGT  
 241 Thr-Val-Ser-Ser 244

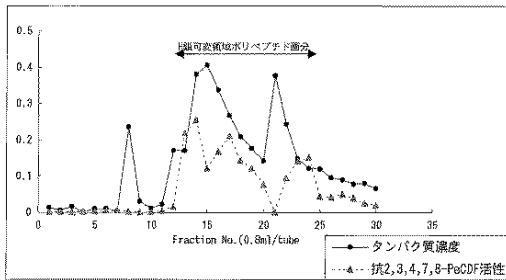
【図9】

第9図



【図10】

第10図



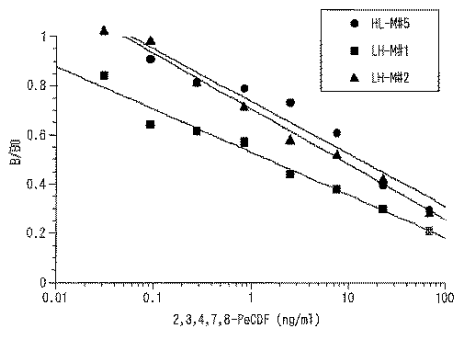
【図11】

第11図



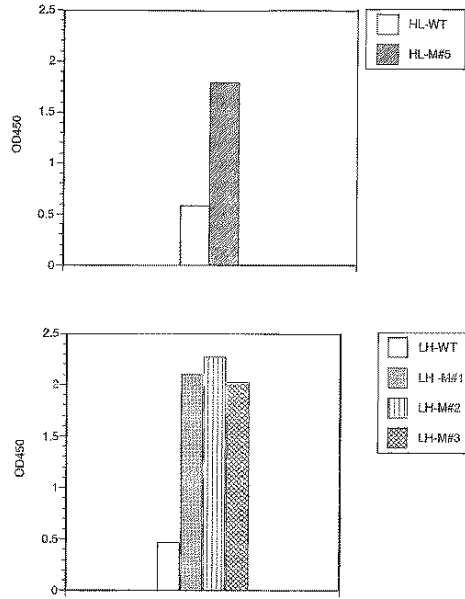
【図 1 2】

第 1 2 図



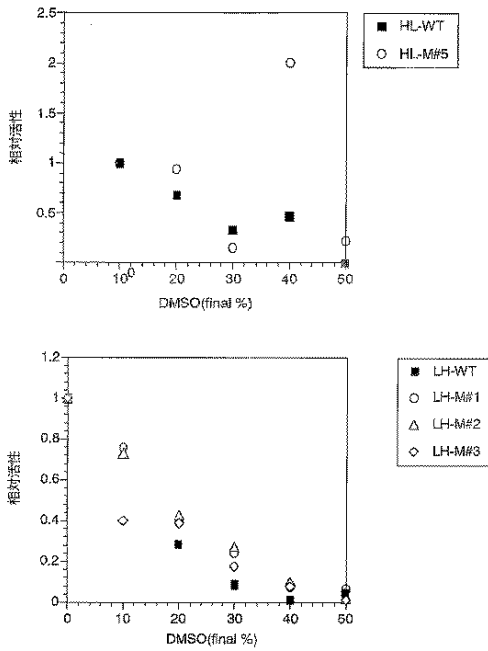
【図 1 3】

第 1 3 図



【図 1 4】

第 1 4 図



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2004/004355
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C07K16/44, C12N15/13, C12N1/21, C12N1/19, C12N1/15, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C07K16/44, C12N15/13, C12N1/21, C12N1/19, C12N1/15, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN), CA (STN), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-119279 A (Zaidan Hojin Shokuhin Yakuhin Anzen Center), 23 April, 2002 (23.04.02), (Family: none)	1-10
X	STANKER, L.H. et al., Monoclonal antibodies for dioxin: antibody characterization and assay development. Toxicology 1987, Vol.45, No.3, pages 229 to 243	1-10
X	Naoya OMURA et al, "Dioxin-rui no Jinsoku Kan'i Sokutei Men'eki Sokutei (Immunoassay)-ho, Environmental Management, 10 March, 2003 (10.03.03), Vol.39, No.3, pages 251 to 256	1-10
<input 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 June, 2004 (08.06.04)		Date of mailing of the international search report 22 June, 2004 (22.06.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/004355
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>2</sup> C07K 16/44, C12N 15/13, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12N 5/10, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577		
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 <sup>1</sup> C07K 16/44, C12N 15/13, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12N 5/10, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577		
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		
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)		
REGISTRY (STN), CA (STN), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/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 請求の範囲の番号
X	JP 2002-119279 A (財団法人食品薬品安全センター) 2002.04.23 (ファミリーなし)	1-10
X	STANKER, L. H. et al. Monoclonal antibodies for dioxin: antibody characterization and assay development. Toxicology 1987, Vol. 45, No. 3, p. 229-243	1-10
X	大村 直也 他, ダイオキシン類の迅速・簡易測定 免疫測定 (イム ノアッセイ) 法 環境管理 2003. Mar. 10, Vol. 39, No. 3, p. 251-256	1-10
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 の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	08.06.2004	国際調査報告の発送日 22.6.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 高堀 栄二	4B 9281
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 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 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/00	D
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	S

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 片岡 千和

京都府京都市南区吉祥院新田二ノ段町6 8 京都電子工業株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA53 CA04 DA06 EA04 HA15

4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA13

4B065 AA26X AA91Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA46

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)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)	识别二恶英的重组抗体和编码所述抗体的基因		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2004087764A1</a>	公开(公告)日	2006-06-29
申请号	JP2005504305	申请日	2004-03-26
申请(专利权)人(译)	京都电子工业株式会社		
[标]发明人	澤田石一之 日向野桂一 片岡千和		
发明人	澤田石 一之 日向野 桂一 片岡 千和		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/00 G01N33/53 C07K16/44 C12N15/13		
CPC分类号	G01N33/5308 C07K16/44		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/08 G01N33/00.D G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA46		
代理人(译)	柴田康夫		
优先权	2003091663 2003-03-28 JP		
其他公开文献	JP4077481B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及对2,3,4,7,8-五氯二苯并呋喃(2,3,4,7,8-PeCDF)具有结合活性的新型重组抗体, 编码其氨基酸序列的基因, 整合载体所述基因, 用所述载体转化的转化体, 制备所述重组抗体的方法, 以及使用所述重组抗体免疫捕获和测定2,3,4,7,8-PeCDF的方法。使用根据本发明的重组抗体, 有可能通过免疫学技术以快速, 方便和高度敏感的方式捕获和测定二氧ins类, 特别是2,3,4,7,8-PeCDF。

表1: Dx3860のH鎖可変領域中の超可変領域のアミノ酸配列

CDR 1	Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Tyr-Ala	配列番号9
CDR 2	Phe-Ser-Asn-Gly-Gly-Ile-Thr	配列番号10
CDR 3	Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly-Pro-Ala-Tyr	配列番号11