

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500826

(P2005-500826A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 16/16	C 0 7 K 16/16	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-592352 (P2002-592352)	(71) 出願人	501374390
(86) (22) 出願日	平成14年5月17日 (2002. 5. 17)		バルティオン テクニリーネン トウトキ
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月18日 (2003. 11. 18)		ムスケクス
(86) 国際出願番号	PCT/FI2002/000423		フィンランド国、エフアイエヌー0215
(87) 国際公開番号	W02002/094878		0 エスポー、プオリミエヘンティエ 5
(87) 国際公開日	平成14年11月28日 (2002. 11. 28)	(74) 代理人	100116838
(31) 優先権主張番号	20011055		弁理士 渡邊 潤三
(32) 優先日	平成13年5月18日 (2001. 5. 18)	(72) 発明者	ラウッカネン, マルヤーレーナ
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		フィンランド国、エフアイエヌー0221
			0 エスポー、エリプシキヤ 3 デー
			26
		(72) 発明者	ソデルlund, ハンス
			フィンランド国、エフアイエヌー0294
			0 エスポー、サロンキティエ 19
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘベイン結合性モノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は抗体工学技術に関する。更に詳細には、本発明は、アレルゲン性ヘベインに対して高い親和性と特異性をもって結合する、ヒト I g E 抗体及びその誘導体に関する。また、本発明は、上記のヘベイン結合性モノクローナル抗体を作製したり改変したりするための方法、並びにこのような抗体やその誘導体を免疫学的診断の分野で使用するための方法を提供する。本発明によって、生物学的サンプル及び原料サンプル中のアレルゲン性ヘベインの定性的及び定量的測定と共に、免疫学的治療も可能となり、その結果、アレルギー患者におけるアレルゲン性ヘベインの活性阻害が可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体又はその誘導体からなる物質であって、該抗体はアレルギー性ヘベインに結合特異性を有するモノクローナル抗体又はその機能的フラグメントと定義される、ヘベイン結合性物質。

【請求項 2】

該機能的フラグメントが s c F v フラグメント又は F a b フラグメントであることを特徴とする、請求項 1 に記載のヘベイン結合性物質。

【請求項 3】

該 s c F v フラグメント又は F a b フラグメントが、I g E サブクラスに属する抗体から誘導されたものであることを特徴とする、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。 10

【請求項 4】

該 s c F v フラグメントが 1 A 4 又は 1 C 2 であることを特徴とする、請求項 2 に記載のヘベイン結合性物質。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質をコードする D N A であるか、該 D N A の断片であって、該ヘベイン結合性物質に含まれる抗体鎖の少なくとも 1 種をコードする D N A 断片である、単離された D N A 分子。

【請求項 6】

該抗体鎖が、V_L 及び / 又は V_H 領域の相補性決定部 (C D R) であることを特徴とする、請求項 5 に記載の単離された D N A 分子。 20

【請求項 7】

ベクターにクローニングしてなることを特徴とする、請求項 5 に記載の単離された D N A 分子。

【請求項 8】

該ベクターが、請求項 1 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質を発現可能なベクターであることを特徴とする、請求項 7 に記載の単離された D N A 分子。

【請求項 9】

請求項 5 ~ 8 のいずれかの D N A 分子を含む宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のヘベイン結合性物質、又は該物質に含まれる抗体鎖の少なくとも 1 種を発現することが可能な、請求項 9 に記載の宿主細胞。 30

【請求項 11】

該抗体鎖が、請求項 2 ~ 4 のいずれかで定義された s c F v フラグメントであることを特徴とする、請求項 10 に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質の製造方法であって、少なくとも 1 種の抗体鎖を発現しうる請求項 9 の宿主細胞を培養し、そして該細胞の産生したヘベイン結合性物質を回収することを包含する方法。 40

【請求項 13】

以下の工程を更に包含することを特徴とする、請求項 12 に記載の製造方法。
該ヘベイン結合性物質を回収した後、該ヘベイン結合性物質の抗体鎖を構成する複数のドメインを包含するドメイン複合体を調製する工程、
調製したドメイン複合体を二次宿主細胞に導入する工程、及び
ドメイン複合体を回収する工程。

【請求項 14】

更に、回収したヘベイン結合性物質を標識する工程を包含する、請求項 12 に記載の製造方法。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質の製造方法であって、該ヘベイン結合性物質の少なくとも一部を合成することを特徴とする製造方法。

【請求項 16】

請求項 2 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質を、表面タンパク質との融合タンパク質として提示するファージ又は微生物細胞。

【請求項 17】

ヘベイン結合性物質を提示する請求項 16 のファージ又は細胞からなるディスプレイライブラリーから、請求項 2 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質を選択する方法。

【請求項 18】

サンプル中のヘベインを検出する方法であって、
サンプルを提供し、そして

10

請求項 1 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質を用いてヘベインを検出することを包含する方法。

【請求項 19】

運搬及び保管に適した容器に入れられた、請求項 1 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質を包含する試験キット。

【請求項 20】

免疫学的診断に使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質。

【請求項 21】

20

免疫学的治療に使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかのヘベイン結合性物質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗体工学技術に関する。更に詳細には、本発明は、アレルギー性ヘベインに対して高い親和性と特異性をもって結合する、ヒト IgE 抗体及びその誘導体に関する。また、本発明は、上記のヘベイン結合性モノクローナル抗体を作製したり改変したりするための方法、並びにこのような抗体やその誘導体を免疫学的診断の分野で使用するための方法を提供する。本発明によって、生物学的サンプル及び原料サンプル中のアレルギー性ヘベインの定性的及び定量的測定と共に、免疫学的治療も可能となり、その結果、アレルギー患者におけるアレルギー性ヘベインの活性阻害が可能となる。

30

【背景技術】

【0002】

世界の人口のおよそ 20% がアレルギーに苦しんでいる。このため、アレルギーは深刻さの増している健康問題である。アレルギーとは、空気、食物又は水に存在する通常は害のない物質に対する過敏反応である (Corry and Kheradmand, 1999)。新規な外来の異質物が、それを体内から排除することを目的とする反応、つまりアレルギー反応を引き起こす。即時型又は I 型過敏反応とも呼ばれる IgE 仲介アレルギー反応においては、生体が外来物質であるアレルギーに初めて曝された時に、IgE 産生 B 細胞が可溶性 IgE 分子の産生を始める。そして可溶性 IgE 分子は、種々の細胞、最も重要なものとしてはマスト細胞の表面に存在する高親和性 IgE レセプターに結合する。生体が同じ外来物質に再び遭遇すると、レセプター結合 IgE 分子とアレルギーとの交差結合が生じ、その結果、細胞が活性化されて、アレルギー反応の徴候及び症状を誘発する毒性物質であるヒスタミンなどが放出される。

40

【0003】

ラテックスアレルギーは患者数が増加している深刻な医療問題である (Slater, 1994; Turjanmaa et al., 1996)。ラテックスは複合細胞内産物であり、ゴムの木である *Hevea brasiliensis* の乳細胞によって産生される乳液である。ラテックスは、例えば手袋、風船及びコンドームといった種々の日用品並びに医療用品の製造に用いられている。ラテックスア

50

レルギーは特に医療関係従事者、ゴム工業就労者及び数回の外科的処置を受けた患者の間で深刻な問題となっている。ラテックスアレルギーは、花粉アレルギー及び食物アレルギーとの関連が報告されている(Nel and Gujuluva, 1998)。ラテックスアレルギーと食物アレルギーの交差反応性は、ラテックス - 果物症候群として確立されており、これはヘベイン様タンパク質ドメイン又は類似のエピトープの反応性が原因であると考えられる(Brehler et al., 1997; Chen et al., 1998; Mikkola et al., 1998)。多くのラテックスタンパク質はアレルギーとして同定されている(Breiteneder and Scheiner, 1998)。主要なラテックスアレルギーの一つはヘベインであり、ヘベインは、例えば数種のキチン含有真菌の感染抑制に關与する防御タンパク質である(Lee et al., 1991; Alenius et al., 1996; Chen et al., 1997)。ヘベインは43個のアミノ酸からなり、4個のジスルフィド結合を有する小さなキチン結合性タンパク質である。その三次元構造はX線解析及びNMRによって決定されている(Rodriguez-Romero et al., 1991; Andersen et al., 1993)。

10

【0004】

IgE抗体はアレルギー性エピトープを特異的に認識するので、臨床又は免疫学的診断において複合材料のアレルギー濃度を検出及び決定するために有用である。さらに、アレルギー性エピトープは、通常、タンパク質の免疫原性エピトープとは異なる。このことは、ハイブリドーマ技術などの従来の方法による、アレルギー性エピトープに特異的な結合を示すモノクローナル抗体の産生の妨げとなっている。アレルギー特異的IgE抗体の開発がファージディスプレイ法によって可能なことが最近報告されている(Steinberger et al., 1996)。この方法は、臨床及び診断に使用するためのアレルギー特異的組み換え抗体を一定の質を保持しながら産生するための新たな手段を提供する。

20

【0005】

発明の概要

本発明においては、イムノアッセイや免疫学的治療のための試薬として用いることのできる、ヒトIgE抗体フラグメントの開発及び特徴づけを開示する。本発明のヒトIgE抗体フラグメントは、生物学的試料中のヘベインを定性的及び定量的に測定するために設計したイムノアッセイ用の試薬及びアレルギー患者の免疫学的治療に用いるのに十分な高い親和性及び特異性を有する。具体的には、本発明は、ヘベインに特異的なヒトIgE抗体のファージディスプレイ法による選択、及びE. coliを用いて産生した、改変された抗体断片の結合特性の特徴づけについて開示する。

30

【0006】

従って、本発明は、種々のイムノアッセイ法及びヒトの免疫学的治療に使用するための新規な試薬を提供する。また、本発明によって、均一な品質を保持する上記の特異的な試薬を継続的に供給することが保証され、ポリクローナル抗血清に固有のバッチ間の品質のばらつきという問題を排除した。これらの有用な効果によって、本発明は、均一な品質の、新規であり、特異的であり且つ経済的な免疫学的診断方法の製造を可能にする。

【0007】

上記から明かなように、本発明の特定の目的の一つは、ヒトIgEモノクローナル抗体、その機能的フラグメント又はそれらの誘導体(以下、屢々、「モノクローナル抗体、その機能的フラグメント又はそれらの誘導体」をまとめて「ヘベイン結合性物質」と称する)であって、生物学的サンプル中のヘベインの定性的及び定量的測定に使用するのに十分な高いヘベイン親和性及び特異性を有するものを提供する。さらに本発明は、免疫学的治療に使用することを特徴とする、上記のヘベイン結合性物質も提供する。本発明のモノクローナル抗体はアレルギー性ヘベインに特異的な結合性を示す。

40

【0008】

本発明の他の目的の一つは、ヘベイン特異的抗体鎖をコードするcDNAクローンのみならず、該クローンを発現させてヘベイン結合性物質を産生するための構築物や方法を提供することである。

【0009】

本発明の更なる目的の一つは、モノクローナル抗体、その機能的フラグメント又はそれら

50

の誘導体を単独又は組み合わせて用いることで、生物学的サンプル中のヘペインを定性的及び定量的に測定する方法を提供することである。更に、本発明は、アレルギー患者の免疫学的治療に使用するためのモノクローナル抗体、その機能的フラグメント又はそれらの誘導体およびそれらを組み合わせて得られるヘペイン結合性物質を提供する。

【0010】

本発明の諸目的、諸特徴及び諸利益は、添付の図面及び詳細な説明の記載から明らかになる。しかしながら、以下の詳細な説明及び実施例は本発明の好ましい態様を示すものの、あくまでもそれを例示しているに過ぎず、本発明の精神及び発明の範囲内で行われる種々の変更及び改良は、以下の詳細な説明より当業者には明らかであることを理解されたい。

【0011】

略称

cDNA	相補的デオキシリボ核酸	
CDR	相補性決定部	
DNA	デオキシリボ核酸	
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia coli</u>	
ELISA	酵素免疫測定法	
Fab	特異的抗原結合性を有するフラグメント	20
Fd	H鎖の可変ドメイン及び第一定常ドメイン	
Fv	特異的抗原結合性を有する抗体の可変領域	
GFP	緑蛍光タンパク質	
IgE	免疫グロブリンE	
mRNA	メッセンジャーリボ核酸	
NMR	核磁気共鳴	
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	30
RNA	リボ核酸	
scFv	一本鎖抗体	
<u>supE</u>	グルタミン挿入型アンバーコドンを抑制するサブプレッサー tRNA を保持する菌株の遺伝子型	
V _H	H鎖の可変領域	
V _L	L鎖の可変領域	

【0012】

発明の詳細の説明

本願明細書で使用した用語の一部について、その定義を提供する。「免疫グロブリン」、「H鎖」、「L鎖」及び「Fab」は欧州特許願第0125023号と同様に使用した。

【0013】

本願明細書において使用した種々の活用形の「抗体」という用語は集合名詞であり、免疫グロブリン分子及び/又は免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部位、即ち抗原結合部位又はパラトープ、の総称である。

【0014】

「抗原結合性部位」又は「パラトープ」とは、抗体分子において、抗原に特異的に結合する構造上の部位である。

10

20

30

40

50

【0015】

抗体の例としては、免疫グロブリン分子の一部であってパラトープを含む部分、例えば Fab や Fv が挙げられる。

【0016】

「Fab」(特異的抗原結合性を有するフラグメント)とは、公知の方法によって実質的に完全な抗体をパイニンによるタンパク質分解に付すことで得られる抗体の一部である。例えば、米国特許第4,342,566号を参照されたい。Fabフラグメントは遺伝子組換え法によって産生することもでき、このような方法は当業者にはよく知られている。例えば、米国特許第4,949,778号を参照されたい。

【0017】

「ドメイン」は、タンパク質の独立した折りたたみ部分を意味する。天然のタンパク質におけるドメイン間の境界に関する一般的な構造上の定義については、Argos, 1988を参照されたい。

【0018】

「可変ドメイン」又は「Fv」とは、免疫グロブリン分子中に存在し、抗原又はハプテンの結合を担う領域をである。通常この領域は、免疫グロブリン分子のL鎖及びH鎖のそれぞれのN末端から数えて約100個のアミノ酸からなる領域である。

【0019】

「一本鎖抗体」(scFv)とは、抗体のH鎖及びL鎖のそれぞれの可変ドメインがリンカーペプチドを介して結合した連続したアミノ酸鎖であって、一本のmRNA分子(転写物)から合成されたものである。

【0020】

「リンカー」又は「リンカーペプチド」とは、天然又は工学的に作られたタンパク質中の隣接する2つのドメインの間に存在するアミノ酸配列である。

【0021】

「ヘビン結合性抗体」とは、抗体の可変領域が仲介する相互作用によってヘビンを特異的に認識して結合する抗体である。

【0022】

上記抗体の機能的フラグメントであって、本発明の範囲に属するものの例として、scFvフラグメントである1A4及び1C2を図4及び図5に開示した。本発明の一つの好ましい態様においては、ヘビン結合性抗体の誘導体、例えばFabフラグメントやscFvフラグメント、を提供する。更に他の誘導体としては、CDR配列又は完全なVL及びVH配列の変異型であって、結合力に実質的に影響を与えない1つ以上の同類置換(conservative substitutions)を有するものを用いることもできる。

【0023】

イムノアッセイ、例えば生物学的サンプル中のヘビンを定性的又は定量的な検出、に使用する本発明のヘビン結合性物質を標識してもよい。この目的のためには、従来から抗体の標識に用いられているいかなる種類の標識も用いることができる。

【0024】

免疫学的治療、例えばアレルギー患者のアレルゲン性ヘビンの結合阻害、に使用するためにも、本発明のヘビン結合性物質を標識してもよい。この目的のためには、薬学的に許容され、従来から抗体の標識に用いられている標識が適当である。

【0025】

本発明の他の一つの態様においては、ヘビン結合性物質をコードするDNAであるか、該DNAの断片であって、VL及び/又はVH領域の相補性決定部(CDR)をコードするDNA断片である、DNA分子を提供する。本発明のDNA分子はベクター、具体的には、例えば、本発明の抗体の誘導体、少なくとも1つの抗体鎖又は抗体鎖の一部を発現可能なベクター、にクローニングされていてもよい。

【0026】

本発明の更なる一つの態様においては、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物

10

20

30

40

50

細胞及び哺乳類細胞からなる群より選ばれる細胞であって、本発明のDNA分子を含み、本発明のヘベイン結合性物質を発現することが可能な宿主細胞を提供する。したがって、本発明の抗体誘導体は、少なくとも1種の抗体鎖を発現しうる本発明の宿主細胞を培養し、そして宿主細胞の産生した目的タンパク質を回収することで製造するか、必要であれば、タンパク質を回収した後に、更に該タンパク質の抗体鎖を構成する複数のドメインを包含するドメイン複合体を調製することによって製造することもできる。

【0027】

上記のscFvフラグメントは、アレルゲン性組換えヘベインを用いてヒトIgE scFvファージライブラリーのバイオパニング (biopanning) によって得たものである。ヒトIgE scFvファージライブラリーは、ラテックスアレルギー患者のリンパ球から単離したmRNAから構築したものである。L鎖及びH鎖の可変領域のcDNAは、Fd cDNA用のヒトIgEに特異的なプライマーを用いて合成し、ヒトL鎖のカッパ()鎖及びラムダ()鎖はヒト鎖及び鎖に特異的なプライマーを用いて合成した。L鎖及びH鎖の可変領域は、VとV cDNA用のヒト鎖特異的プライマーと鎖特異的プライマー及びV_H cDNA用のヒトIgE特異的プライマーを用いてそれぞれPCRによって増幅した。これらのPCRプライマーに導入しておいた制限部位を利用して、scFvファージディスプレイベクターに可変領域のcDNAをクローニングし、ヒトIgE scFvライブラリーを構築した。

10

【0028】

パニング法を利用したファージディスプレイによってヒトIgE scFvライブラリーを選択した。ヒトIgE scFvファージライブラリーのスクリーニングを溶液中のピオチン化したアレルゲン性組換えヘベインで行い、結合物をストレプトアビジン上に捕捉した。ファージの溶出を100mM HCl (pH 2.2)で行い、次いで2Mトリス溶液で直ちに中和した。ファージ溶出液をE. coli細胞で増幅した。バイオパニングを5ラウンド繰り返した後、単離したファージから可溶性のscFvフラグメントを調製した。選択したscFvフラグメントの結合特異性をELISAで検出した。数種のヘベイン特異的scFvフラグメントクローンを得た。

20

【0029】

本願明細書に記載したように、ファージディスプレイ法は、診断及び治療に適用するためのヒトIgE組換え抗ヘベイン抗体を開発するための有効かつ簡便な方法である。

30

【0030】

本発明の抗体フラグメントを得るために有効な選択方法の一つを記載したが、本発明の抗体フラグメントを得ることが可能な多数の応用方法も当業者には明らかとなる。scFvフラグメント又はその誘導体のファージディスプレイライブラリー又は微生物ディスプレイライブラリーから本発明のscFvフラグメントを直接選択することが可能であることは明らかなはずである。本発明のscFvフラグメント又は他の抗体フラグメントを表面タンパク質との融合タンパク質として提示するファージ又は微生物細胞は、本発明の更なる態様の一つである。

【0031】

微生物細胞による本発明のヘベイン結合性物質の発現は、免疫診断アッセイ及び免疫学的治療に適した均一な品質の高特異性試薬を効率よく且つ経済的に製造するための手段を提供する一方で、このような試薬又はその少なくとも一部が合成可能であることを示している。従来 of 遺伝子工学的手法を適用することにより、初めに得られた本発明の抗体フラグメントをその結合特性を実質的に変えることなく改変する(例えば、新たな配列を連結する)ことができる。このような手法は、上記で定義したヘベインに対する親和性及び特異性の両方を保持する新規なヘベイン結合性ハイブリッドタンパク質の製造にも用いることができる。

40

【0032】

ヒトヘベイン結合性組換え抗体の開発及び特徴づけ、並びにイムノアッセイにおけるその有用性について、以下の実施例において詳細に説明する。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

実施例 1

ファージディスプレイ選択法による組換えヘベイン特異的 s c F v フラグメントの調製

本実施例においては、ヘベインに対する親和性及び特異性を有する s c F v フラグメントを単離するために、ヒト I g E s c F v ライブラリーを構築し、アレルゲン性ヘベインによる選択を行った。I g E F a b - ライブラリー及び I g E F a b - ライブラリーを初めに構築することによってヒト I g E ファージライブラリーを間接的に構築し、その後、特定のライブラリーの D N A を用いて H 鎖及び L 鎖の可変ドメインをコードする D N A を P C R で増幅した。

10

【0034】

I . ヒト I g E s c F v ファージライブラリーの構築

ヘパリンを加えた血液 1 0 0 m l をラテックスアレルギー患者から得た。リンパ球を I g - P r i m e K i t P r o t o c o l (N o v a g e n 社 製) に 従 っ て 次 の 手 順 で 単 離 し た 。 血 液 1 0 m l あ た り 3 0 m l の 溶 解 緩 衝 液 (1 5 5 m M の N H ₄ C l , 1 0 m M の N H ₄ H C O ₃ , 0 . 1 m M の E D T A , p H = 7 . 4) を 加 え 、 時 々 振 と う さ せ な が ら 氷 上 で 1 5 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 4 5 0 g で 1 0 分 間 遠 心 分 離 し た 後 、 リ ン パ 球 、 即 ち 白 血 球 ペ レ ッ ト 、 を 回 収 し た 。 回 収 し た ペ レ ッ ト を 溶 解 緩 衝 液 で 2 回 洗 浄 し 、 最 後 の 遠 心 分 離 の 後 に 得 ら れ た リ ン パ 球 ペ レ ッ ト を D - 溶 液 (D - s o l u t i o n) に 再 懸 濁 し た 。 リ ン パ 球 R N A を P r o m e g a 社 の R N A g e n t s T o t a l R N A I s o l a t i o n k i t を 用 い て 製 造 者 の マ ニ ュ ア ル に 従 っ て 単 離 し た 。 初 め の c D N A 合 成 は P r o m e g a 社 の R e v e r s e T r a n s c r i p t i o n s y s t e m k i t を 用 い て 行 っ た 。 F d フ ラ グ メ ン ト c D N A 及 び L 鎖 c D N A の 合 成 に は 、 イ プ シ ロ ン () 鎖 の 定 常 領 域 の プ ラ イ マ ー (C 1 及 び C 2) 、 並 び に カ ッ パ 鎖 の プ ラ イ マ ー (C 1) と ラ ム ダ 鎖 の プ ラ イ マ ー (C 1) を そ れ ぞ れ 用 い た 。 ヒ ト I g E F d 領 域 及 び L 鎖 の c D N A 合 成 及 び P C R 増 幅 に 用 い た プ ラ イ マ ー を 表 1 及 び 表 2 に 示 す 。

20

【0035】

P C R 増 幅 は 2 段 階 、 具 体 的 に は c D N A テ ン プ レ ー ト か ら F d 鎖 及 び L 鎖 を 増 幅 す る た め の 一 次 P C R と 、 一 次 P C R で 得 た D N A フ ラ グ メ ン ト の 5 ' 末 端 に 制 限 部 位 を 加 え る た め の 二 次 P C R で 行 っ た 。 ま ず 、 H 鎖 の 可 変 領 域 に 特 異 的 な プ ラ イ マ ー (V H 1 a - V H 7 a) 及 び C 1 N o t I プ ラ イ マ ー を 用 い て F d 領 域 を P C R で 増 幅 し た 。 次 に 、 L 鎖 である 鎖 及 び 鎖 を L 鎖 の 可 変 領 域 に 特 異 的 な プ ラ イ マ ー (そ れ ぞ れ V 1 a - V 6 b と V 1 a - V 1 0) 及 び C 1 N o t I プ ラ イ マ ー を 用 い て 増 幅 し た 。 二 次 P C R で は 、 F d 領 域 の P C R 増 幅 に は C 1 、 V / 1 及 び C 2 プ ラ イ マ ー を 用 い 、 鎖 の P C R 増 幅 に は V / 1 及 び C 1 プ ラ イ マ ー を 用 い 、 鎖 の P C R 増 幅 に は V 1 A 及 び C / 1 プ ラ イ マ ー を 用 い た 。 一 次 P C R は 以 下 の 条 件 で 行 っ た : 9 3 ° C で 3 分 間 の 変 性 を 1 サ イ ク ル ; 9 3 ° C で 1 分 間 、 6 3 ° C で 3 0 秒 及 び 5 8 ° C で 5 0 秒 の ア ニ ー リ ン グ 、 次 い で 7 2 ° C で 1 分 間 の 伸 長 を 7 サ イ ク ル ; 9 3 ° C で 1 分 間 、 6 3 ° C で 3 0 秒 及 び 7 2 ° C で 1 分 間 を 2 3 サ イ ク ル ; 最 後 に 7 2 ° C で 1 0 分 間 を 1 サ イ ク ル 。 二 次 P C R は 以 下 の 条 件 で 行 っ た : 9 5 ° C で 3 分 間 の 変 性 を 1 サ イ ク ル ; 9 4 ° C で 1 . 5 分 間 、 6 5 ° C で 1 分 間 の ア ニ ー リ ン グ 、 次 い で 7 2 ° C で 1 . 5 分 間 の 伸 長 を 2 5 サ イ ク ル ; 及 び 7 2 ° C で 1 0 分 間 を 1 サ イ ク ル 。 一 次 P C R と 二 次 P C R の 間 、 及 び 二 次 P C R の 後 に は 、 増 幅 し た D N A フ ラ グ メ ン ト を 精 製 し た 。

30

40

【0036】

種々の抗体フラグメントの D N A からなる最終 P C R 産物を集め、適切な制限酵素で消化した。消化した D N A フラグメントであり、I g E F d 領域や 鎖や 鎖をコードする D N A フラグメントをファージミドベクターに連結し、そのファージミドベクターで E . c o l i X L - 1 B l u e を 形 質 転 換 し て 1 0 ⁶ 個 の 独 立 し た ク ロ ー ン か ら なる F a b - ライブラリー及び F a b - ライブラリーを得た。ファージ粒子上の F a b フラグメントの発現に関わる問題を防止するために、s c F v 形式の抗体ライブラリーを構築した。ヒト I g E s c F v - 及び s c F v - ライブラリーを構築するために種々のライブラリ

50

ーからファージミドDNAを単離して、ヒトIgE H鎖及びヒトIgE L鎖の可変領域を増幅するための鋳型DNAとして用いた。

【0037】

H鎖の可変領域のPCR増幅をヒトV_H特異的プライマー(VH1 - VH4及びVH1A)を用いて行った。L鎖の可変領域の増幅を以下のプライマーペアを用いて行った：ヒト鎖の増幅にはV₁ - V₇, V₂ - V₈, V₃ - V₉, V₄ - V₁₀, V₅ - V₁₁及びV₆ - V₁₁を用い、ヒト鎖の増幅にはV₁ - V₈, V₂ - V₉, V₃ - V₉, V₄ - V₉, V₅ - V₁₀, V₆ - V₁₀及びV₇ - V₁₀を用いた(表3及び表4参照)。s c F vファージディスプレイベクター(図3)に連結するために、増幅したDNAフラグメントを精製し消化した。連結用混合物で*E. coli* X L - 1 Blueを形質転換し、約10⁵個の独立したクローンからなるヒトIgE s c F v - ライブラリー及びs c F v - ライブラリーを得た。

10

【0038】

II. ヒトs c F vライブラリーの選択

ヒトs c F v - ライブラリー及びs c F v - ライブラリーをファージディスプレイ法(McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991)により選択した。ヘベイン結合性抗体フラグメントを単離するために、バクテリオファージの表面に提示されたヒトIgE s c F v - ライブラリー及びs c F v - ライブラリーを集め、親和性パニング法(affinity panning procedure)(図2)を用いてパニングを行った。はじめにファージプールをピオチン化した免疫反応性のヘベイン又はピオチン化したコントロールタンパク質(バックグラウンド)と1.5時間反応させた。その後、ファージプールをピオチン結合性ストレプトアビジンでコートしたマイクロタイタープレートのウェルに移した。30分間インキュベートした後、ウェルを3回PBSで洗浄し、結合物を酸性緩衝液(100 mM HCl, pH 2.2)で溶出し、2 M トリス溶液で直ちに中和した。続くパニングラウンドのために、溶出したファージプールを*E. coli* X L - 1 Blueに感染させて増幅した。パニングは5ラウンド行った。

20

【0039】

III. ヘベイン結合性物質の特徴づけ

最後のパニングサイクル終了後、可溶性s c F vフラグメントを発現させるために、s c F vファージディスプレイDNAを単離し、単離したDNAで*E. coli* HB 2151 (supE⁻)の形質転換を行った。s c F vファージディスプレイベクターは、そのs c F v配列とファージ遺伝子III配列との間に、supE⁺遺伝子型の*E. coli*株ではグルタミン酸に翻訳され、supE⁻遺伝子型の*E. coli*株では終止コドンに翻訳されるTAGアンバー終止コドンを含む。62個の独立したクローンの小規模培養を実施し、予備的な特徴づけに用いる可溶性s c F vフラグメントを製造した。クローンは、ヘベイン特異的結合性物質物を捕捉するためのヘベインでコートしたウェルと非特異的な結合を検出するためのコントロールタンパク質でコートしたウェルを用いたELISAで分析した(データは示さない)。ほとんどのクローンは高い親和性でヘベインに結合した。最も見込みのあるクローンのうち19個の配列を決定し(Sanger *et al.*, 1977)、そのうちの2個のクローンを更なる特徴づけのために選択した(図4及び5)。

30

40

【0040】

実施例2

ヘベイン結合特異性を有するヒトFabフラグメントのクローニング及び特徴づけ

本実施例においては、ヘベイン結合特異性を有するヒトIgE s c F vをIgG1サブタイプに属するヒトFabフラグメントに変換した。多量体の形成が難しいことが知られていることから、s c F v抗体ライブラリーから得られたs c F vフラグメントの1A4 s c F v及び1C2 s c F vをクローニングし、細菌にFabフラグメントとして発現させた(Holliger *et al.*, 1993; Desplancq *et al.*, 1994)。得られた抗体フラグメントの更なる特徴づけを競合的ELISA法で行った。

【0041】

50

I . ヘベイン結合特異性を有するヒト F a b フラグメントのクローニング

F d 領域をオーバーラッピング P C R (overlapping PCR) で増幅した。P C R に用いたプライマーを表 5 に示す。

【 0 0 4 2 】

上記で得られた F d 領域 c D N A 及び L 鎖 c D N A をバクテリアの発現ベクターである p K K t a c にクローニングし、*E. coli* R V 3 0 8 を形質転換した。1 A 4 G 及び 1 C 2 G と命名した可溶性 F a b フラグメントが産生され、これらの F a b フラグメントはその C 末端に導入したヘキサヒスチジンタグを用いてニッケルを固定したセファロースカラムで実質的に純粋になるまで精製した (データは示さない) 。

【 0 0 4 3 】

I I . ヒト F a b フラグメントの特徴づけ

精製した 1 A 4 G 及び 1 C 2 G の特徴づけを競合的 E L I S A 法によって行った。始めに、ラテックスポリペプチド濃度の増加する系列を用いてサンプル (1 A 4 G 及び 1 C 2 G) とラテックスポリペプチドをインキュベートした。ラテックスポリペプチドはラテックス製の実験用手袋から Alenius と共同研究者ら (1996) に従って単離したものを使用した。インキュベートした反応混合物をアレルゲン性 G F P - ヘベイン融合タンパク質でコートしたマイクロタイプレートのウェルに添加した。使用したラテックスポリペプチドの調製物は高いラテックスアレルギー活性を有していた (データは示さない) 。図 6 は競合的 E L I S A の結果を示す。ヘベインに対する 1 A 4 G の結合 (図 6 a) 及び 1 C 2 G の結合 (図 6 b) は、天然ヘベインの添加量が増加することで阻害することができた。

【 0 0 4 4 】

I g E 抗体はアレルゲン性エピトープに特異的に結合する。1 A 4 G 抗体の結合特性を更に詳細に検討するために、アレルゲン性エピトープを包含するペプチドとの競合的 E L I S A を行った (図 7) 。Banerjee と共同研究者ら (1997) はヘベインのアレルゲン性エピトープについて研究し、重要なアレルゲン性エピトープであると考えられる 2 つのペプチド、6 量体と 1 3 量体、を見出した。競合的 E L I S A において、固定したヘベインに対する 1 A 4 G の結合はアレルゲン性エピトープであるペプチドによって阻害された。異なる競合的 E L I S A で得られたこれらの結果は、抗体ライブラリーから単離された抗体が天然ヘベインと同様に組換えヘベインに特異的に結合しうることを示す。更に、予備実験の結果は、1 A 4 G 抗体がヘベインのアレルゲン性エピトープに特異的に結合することを示す。

【 0 0 4 5 】

【 表 1 】

10

20

30

ヒト I g E F d 領域の c D N A 合成及び P C R 増幅に用いたプライマー

Cε1: 5'- GCTGAAGGTTTTGTTGTCGACCCAGTC -3'

Cε2: 5'- CACGGTGGGCGGGGTGAAGTCCC -3'

CεNotI: 5'- GAATGGTGCGGCCGCGCTGAAGGTTTTGTTGTCG -3'

VH1a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTKCAGCTGGTGCAG -3'

VH1b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTCCAGCTTGTGCAG -3'

10

VH1c: 5'- ATGGCCGCAGCTSAGGTCCAGCTGGTACAG -3'

VH1d: 5'- ATGGCCGCAGCTCARATGCAGCTGGTGCAG -3'

VH2a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGATCACCTTGAAGGAG -3'

VH2b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTACCTTGARGGAG -3'

VH3a: 5'- ATGGCCGCAGCTGARGTGCAGCTGGTGGAG -3'

VH3b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG -3'

20

VH3c: 5'- ATGGCCGCAGCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG -3'

VH4a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGSTGCAGCTGCAGGAG -3'

VH4b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTGCAGCTACAGCAG -3'

VH5a: 5'- ATGGCCGCAGCTGARGTGCAGCTGGTGCAG -3'

VH6a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTACAGCTGCAGCAG -3'

VH7a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTSCAGCTGGTGCAA -3'

VH1A: 5'- TTA CTCGCGGCC CAGCCGGCCATGGCCGCAGCT -3'

30

【 0 0 4 6 】

【 表 2 】

ヒト κ 鎖及びヒト λ 鎖の cDNA 合成及び PCR 増幅に用いたプライマー

C κ 1: 5'- AGGTAGGGCGCGCCTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC -3'

V κ 1a: 5'- ATGGCAGCGGCTRACATCCAGATGACCCAG -3'

V κ 1b: 5'- ATGGCAGCGGCTGMCATCCAGTTGACCCAG -3'

V κ 1c: 5'- ATGGCAGCGGCTGCCATCCRGATGACCCAG -3'

V κ 1d: 5'- ATGGCAGCGGCTGTCATCTGGATGACCCAG -3'

10

V κ 2a: 5'- ATGGCAGCGGCTGATATTGTGATGACCCAG -3'

V κ 2b: 5'- ATGGCAGCGGCTGATRTTGTGATGACTCAG -3'

V κ 3a: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATTGTGTTGACRCAG -3'

V κ 3b: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATAGTGATGACGCAG -3'

V κ 3c: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATTGTAATGACACAG -3'

V κ 4a: 5'- ATGGCAGCGGCTGACATCGTGATGACCCAG -3'

20

V κ 5a: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAACGACACTCACGCAG -3'

V κ 6a: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATTGTGCTGACTCAG -3'

V κ 6b: 5'- ATGGCAGCGGCTGATGTTGTGATGACACAG -3'

V κ/λ 1: 5'- TTGTTATTGCTAGCTGCACAACCAGCAATGGCAGCGGCT -3'

C λ 1: 5'- AGGTAGGGCGCGCCTTATGAACATTCYGYAGGGGC -3'

V λ 1a: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGTGCTGACTCAG -3'

V λ 1b: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGTGYTGACGCAG -3'

30

V λ 1c: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGTTCGTGACGCAG -3'

V λ 2 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGCCCTGACTCAG -3'

V λ 3a: 5'- ATGGCAGCGGCTTCCTATGWGCTGACTCAG -3'

V λ 3b: 5'- ATGGCAGCGGCTTCCTATGAGCTGACACAG -3'

V λ 3c: 5'- ATGGCAGCGGCTTCTTCTGAGCTGACTCAG -3'

V λ 3d: 5'- ATGGCAGCGGCTTCCTATGAGCTGATGCAG -3'

V λ 4 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGCYTGTGCTGACTCAA -3'

40

V λ 5 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGSCTGTGCTGACTCAG -3'

V λ 6 : 5'- ATGGCAGCGGCTAATTTTATGCTGACTCAG -3'

V λ 7 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGRCTGTGGTGACTCAG -3'

V λ 8 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGACTGTGGTGACCCAG -3'

V λ 4/9: 5'- ATGGCAGCGGCTCWGCCTGTGCTGACTCAG -3'

V λ 10: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGGCAGGGCTGACTCAG -3'

50

【 0 0 4 7 】

【 表 3 】

ヒトH鎖の可変領域のPCR増幅に用いたプライマー

VH1: 5'- ATTTACTCGAGTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC -3'

VH2: 5'- ATTTACTCGAGTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC -3'

VH3: 5'- ATTTACTCGAGTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC -3'

VH4: 5'- ATTTACTCGAGTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC -3'

VH1A: 5'- TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCAGCT -3'

10

【 0 0 4 8 】

【 表 4 】

ヒトL鎖の可変領域のPCR増幅に用いたプライマー

Vκ1: 5'- TTATAGAGCTCGACATCCAGATGACCCAGTCTCC -3'

Vκ2: 5'- TTATAGAGCTCGATGTTGTGATGACTCAGTCTCC -3'

Vκ3: 5'- TTATAGAGCTCGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC -3'

Vκ4: 5'- TTATAGAGCTCGACATCGTGATGACCCAGTCTCC -3'

Vκ5: 5'- TTATAGAGCTCGAAACGACACTCACGCAGTCTCC -3'

Vκ6: 5'- TTATAGAGCTCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC -3'

Vκ7: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC -3'

Vκ8: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC -3'

Vκ9: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTGATATCCACTTGGTCCC -3'

Vκ10: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC -3'

Vκ11: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC -3'

Vλ1: 5'- ATTTAGAGCTCCAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC -3'

Vλ2: 5'- ATTTAGAGCTCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC -3'

Vλ3: 5'- ATTTAGAGCTCTCCTATGTGCTGACTCAGCCACC -3'

Vλ4: 5'- ATTTAGAGCTCTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC -3'

Vλ5: 5'- ATTTAGAGCTCCACGTTATACTGACTCAACCGCC -3'

Vλ6: 5'- ATTTAGAGCTCCAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC -3'

Vλ7: 5'- ATTTAGAGCTCAATTTTATGCTGACTCAGCCCCA -3'

Vλ8: 5'- ATATTGCGGCCGCACCTAGGACGGTGACCTTGGTCCC -3'

Vλ9: 5'- ATATTGCGGCCGCACCTAGGACGGTCAGCTTGGTCCC -3'

Vλ10: 5'- ATATTGCGGCCGCACCTAAAACGGTGAGCTGGGTCCC -3'

10

20

30

【 0 0 4 9 】

【 表 5 】

I g Eに属するヒト F d 領域及び I g G 1 サブタイプに属する
ヒト F d 領域の P C R 増幅に用いたプライマー

5'Cε: 5'-GCTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACACAGAGCCCATCCG-3'

3'Cε: 5'-GCATTGCATTGCGGCCGCTTAATGGTGATGGTGATGATGGCTGAAGGT
TTTGTTGTCGACCC-3'

5'Cγ: 5'-GGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC-3'

3'Cγ: 5'-TTTAGTTTATGCGGCCGCTTAATGGTGATGATGATGGTGACAAGATTTG
GGCTCTGC-3'

5'Ve: 5'-TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCAGCT-3'

3'Ve: 5'-TGAGGAGACGGTGACC-3'

5'Cκ: 5'-GGGACACGACTGGAGATTA AAACTGTGGCTGCACCATCTGTC-3'

3'Cκ: 5'-AGGTAGGGCGCGCCTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'

5'Vk: 5'-ATGGCAGCGGCTGAAACGACACTCACGCAG-3' 及び

5'-TTGTTATTGCTAGCTGCACAACCAGCAATGGCAGCGGCT-3'

3'Vk: 5'-TTTAATCTCCAGTCGTGTCCC-3'.

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

参考文献

Alenius, H., Kalkkinen, N., Reunala, T., Turjanmaa, K., and Palosuo, T. (1996) J. Immunol. 156, 1618-1625.

Andersen, N.H., Cao, B., Rodriguez-Romero, A., and Arreguin, B. (1993) Biochemistry 32, 1407-1422.

Argos, P. (1988) Protein Engineering, 2, 101-113.

Banerjee, B., Wang, X., Kelly, K.J., Fink, J.N., Sussman, G.L., and Kurup, V.P. (1997) J. Immunol. 159, 5724-5732.

Barbas III, C.F., Kang, A.S., Lerner, R.A., and Benkovic, S.J. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 7978-7982.

Brehler, R., Theissen, U., Mohr, C., and Luger, T. (1997) Allergy 52, 404-410.

Breiteneder, H, and Scheiner, O. (1998) Int. Arch. Allergy Immunol. 116, 83-92.

Chen, Z., Posch, A., Lohaus, C., Raulf-Heimsoth, M., Meyer, H.E., and Baur, X. (1997) J. Allergy Clin. Immunol. 99, 402-409.

Chen, Z., Posch, A., Cremer, R., Raulf-Heimsoth, M., and Baur, X. (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102, 476-481.

Corry, D.B., and Kheradmand, F. (1999) Nature 402, B18-B23.

Desplancq, D., King, D.J., Lawson, A.D.G., and Mountain, A. (1994) Protein Eng. 7, 1027-1033.

Holliger, P., Prospero, T., and Winter, G. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6444-6448.

Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M., and Gottesman, K.S. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Dept. of Health a

nd Human Services, Bethesda, MD.

Lee, H-i, Broekaert, W.F., and Raikhel, N.V. (1991) J. Biol. Chem. 266, 15944-15948.

McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., and Chiswell, F.J. (1990) Nature 348, 552-554.

Mikkola, J.H., Alenius, H., Kalkkinen, N., Turjanmaa, K., Palosuo, T., and Reunala, T. (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102, 1005-1012.

Nel, A, and Gujuluva, C. (1998) Ann. Allergy Asthma Immunol. 81, 388-398.

Rodriguez-Romero, A., Ravichandran, K.G., and Soriano-Garcia, M. (1991) FEBS Lett. 291, 307-309.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467.

Slater, J.E. (1994) J. Allergy Clin. Immunol. 94, 139-149.

Steinberger, P., Kraft, D., and Valenta, R. (1996) J. Biol. Chem. 271, 10967-10972.

Turjanmaa, K., Alenius, H., Makinen-Kiljunen, S., Reunala, T, and Palosuo, T. (1996) Allergy 51, 593-602.

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】図1は、完全なヒトIgEサブクラス抗体、Fabフラグメント及び1本鎖抗体(scFv)の該略図であり、抗原結合部位は三角形で示す。以下、構造を示す図面はいずれも実寸ではない。

【図2】図2は、パニング法の概略図である。

【図3】図3は、scFvファージライブラリーの構築に使用したscFvファージディスプレイベクターの概略図である。

【図4】図4は、1A4抗体及び1C2抗体のH鎖の可変領域の推定されるアミノ酸配列である。相補的決定部(CDR)を下線で示した。アミノ酸番号はKabat (Kabat et al., 1991)のものに準じた。

【図5】図5は、1A4抗体及び1C2抗体のL鎖の可変領域の推定されるアミノ酸配列である。相補的決定部(CDR)を下線で示した。アミノ酸番号はKabat (Kabat et al., 1991)のものに準じた。

【図6a】図6aは、ヒトIgG1サブタイプに属する1A4Fabフラグメントの競合的ELISAで得られた曲線であり、ラテックスポリペプチドによるヘベイン結合阻害を示す。

【図6b】図6bは、ヒトIgG1サブタイプに属する1C2Fabフラグメントの競合的ELISAで得られた曲線であり、ラテックスポリペプチドによるヘベイン結合阻害を示す。

【図7】図7は、競合的ELISAの結果であって、ヒトIgG1サブタイプに属する1A4Fabフラグメントの有するヘベイン結合性は、ヘベインのアレルゲン性エピトープ(6量体と13量体)により阻害されることを示す。

【配列表フリーテキスト】

【0052】

配列番号 1	人工的な塩基配列の記載: オリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 2	人工的な塩基配列の記載: オリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 3	人工的な塩基配列の記載: オリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 4	人工的な塩基配列の記載: オリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 5	人工的な塩基配列の記載: オリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 6	人工的な塩基配列の記載: オリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 7	人工的な塩基配列の記載: オリゴヌクレオチドプライマー
配列番号 8	人工的な塩基配列の記載: オリゴヌクレオチドプライマー

10

20

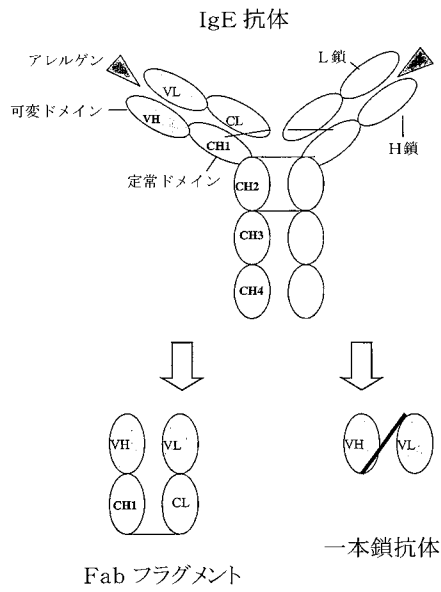
30

40

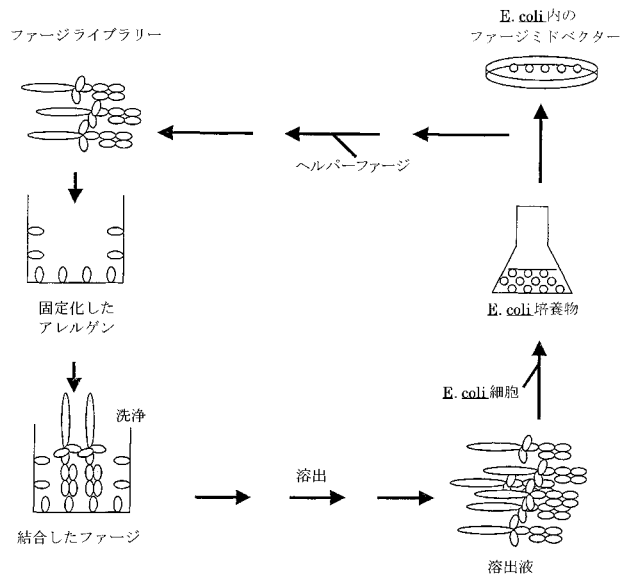
50

- 配列番号 59 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 60 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 61 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 62 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 63 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 64 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 65 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 66 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 67 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 68 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー 10
- 配列番号 69 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 70 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 71 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 72 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 73 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 74 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 75 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 76 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 77 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 78 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー 20
- 配列番号 79 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 80 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 81 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 82 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 83 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 84 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 85 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号 87 配列中の 31 ~ 37 番アミノ酸、52 ~ 67 番アミノ酸及び 101 ~ 117 番アミノ酸は C D R である。
- 配列番号 88 配列中の 31 ~ 37 番アミノ酸、52 ~ 67 番アミノ酸及び 101 ~ 119 番アミノ酸は C D R である。 30
- 配列番号 89 配列中の 24 ~ 35 番アミノ酸、51 ~ 57 番アミノ酸及び 90 ~ 98 番アミノ酸は C D R である。
- 配列番号 90 配列中の 24 ~ 34 番アミノ酸、50 ~ 56 番アミノ酸及び 89 ~ 97 番アミノ酸は C D R である。
- 配列番号 91 人工的な塩基配列の記載：オリゴヌクレオチドプライマー

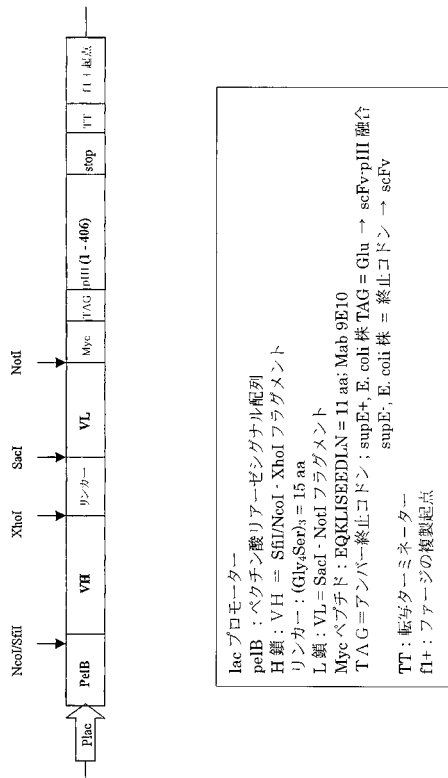
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



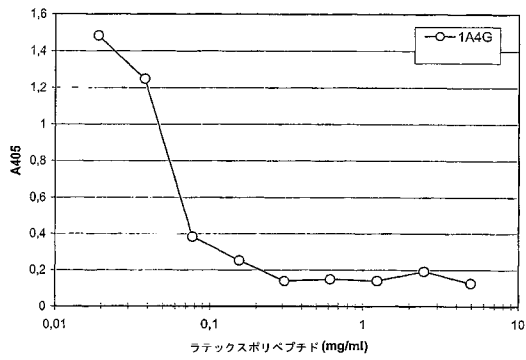
【 図 4 】

	10	20	30
1A4-VH	QITLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLST	TTGMGVAWIR	
1C2-VH	QITLKESGPVLVKPTQTLTLTCNLGSGFSLST	SGVGVGWIR	
	40	50	60
1A4-VH	QPPGKALEWLAL	LIYWDDDDTRYSPALKSR	LVTKDTSKNQV
1C2-VH	QPPGKALEWLAL	LIYWDDDDKRYSPSLRNRL	ITTKDTSKNQV
	80	90	100
1A4-VH	VLTMNMPVD	TATYYCAHTHCSNGVC	YSAH WFDSWG
1C2-VH	VLTMNMPVD	IGTYPCARSVNYDDVSGTYHSHNWFDFWG	
	110		
1A4-VH	QGTLVTVSS		
1C2-VH	QGTLVTVSS		

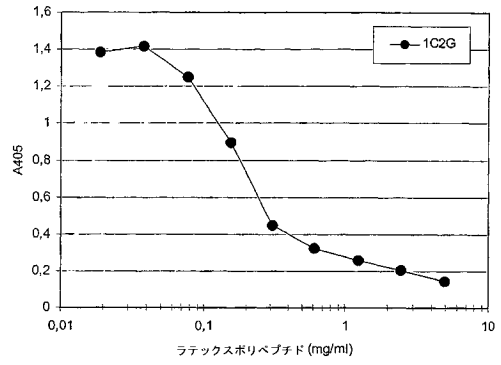
【 図 5 】

	10	20	30
1A4-Vk	ETTTLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK		
1C2-Vk	ETTTLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSI SSYLNWYQQK		
	40	50	60
1A4-Vk	PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE		
1C2-Vk	PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ		
	80	90	100
1A4-Vk	PEDFAVYYCQYQSSFLTFGQGTRLEIKR		
1C2-Vk	PEDFATYYCQSYSTPRTFGQGTRLEIKR		

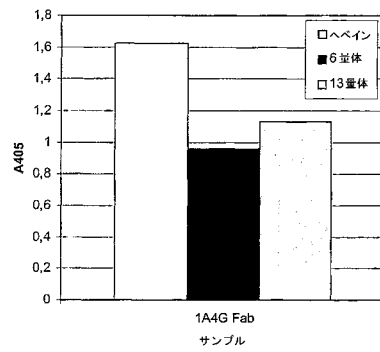
【 図 6 a 】



【 図 6 b 】



【 図 7 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 November 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/094878 A1

- (51) International Patent Classification: C07K 16/00. G01N 33/577
- (21) International Application Number: PCT/FI02/00423
- (22) International Filing Date: 17 May 2002 (17.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 20011055 18 May 2001 (18.05.2001) FI
- (71) Applicant (for all designated States except US): VALTION TEKILLINEN TUTKIMUSKESKUS [FI/FI]; Vuorimiehentie 5, FIN-02150 ESPOO (FI).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): LAUKKANEN, Marja-Leena [FI/FI]; Eliipsikujä 3 D 26, FIN-02210 ESPOO (FI); SÖDERLUND, Hans [FI/FI]; Salonkatie 19, FIN-02940 ESPOO (FI); MÄKINEN-KILJUNEN, Soili [FI/FI]; Granititie 7 as 28, FIN-00710 HELSINKI (FI); HAAHTELA, Tari [FI/FI]; Pajalabsentie 10 BD 34, FIN-00200 HELSINKI (FI); TAKKINEN, Kristiina [FI/FI]; Haltilantie 12 as 1, FIN-02200 ESPOO (FI).
- (74) Agent: OY JALO ANT-WUORINEN AB; Iso Roobertinkatu 4-6 A, FIN-00120 HELSINKI (FI).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GL, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/094878 A1

(54) Title: HEVEIN-BINDING MONOCLONAL ANTIBODIES

(57) Abstract: This invention relates to antibody engineering technology. More particularly, the present invention relates to human IgE antibodies and derivatives thereof, which bind allergenic hevein with high affinity and specificity. The present invention also relates to processes for making and engineering such hevein-binding monoclonal antibodies and to methods for using these antibodies and derivatives thereof in the field of immunodiagnosics, enabling qualitative and quantitative determination of allergenic hevein in biological and raw material samples, as well as in immunotherapy, enabling blocking of allergenic hevein in allergic patients.

WO 02/094878

PCT/JP02/00423

1

HEVEIN-BINDING MONOCLONAL ANTIBODIES**Field of the Invention**

5

This invention relates to antibody engineering technology. More particularly, the present invention relates to human IgE antibodies and derivatives thereof, which bind allergenic hevein with high affinity and specificity. The present invention also relates to processes for making and engineering such hevein-binding monoclonal antibodies and to methods for using these antibodies and derivatives thereof in the field of immunodiagnostics, enabling qualitative and quantitative determination of allergenic hevein in biological and raw material samples, as well as in immunotherapy, enabling blocking of allergenic hevein in allergic patients.

15 Background of the Invention

Almost 20% of the population world-wide are suffering from allergy. Consequently, it is a health problem of increasing seriousness. Allergy is a hypersensitivity reaction against substances in air, food or water, which are normally harmless (Corry and Kheradmand, 1999). A new and foreign external agent triggers an allergic reaction, which aims at disposal of that agent from the body. In IgE-mediated allergic reactions, also called immediate or type I hypersensitivity reactions, under the first exposure of a foreign substance, allergen, to the body, IgE-bearing B-cells begin to produce soluble IgE molecules which will then bind to high-affinity IgE receptors present on the surface of a wide variety of cells, most importantly to mast cells. If the same foreign substance is encountered again, the cross-linking of the receptor-bound IgE molecules by the allergen occurs, resulting in cellular activation followed by the release of toxic products such as histamines, which will elicit the signs and symptoms of an allergic reaction.

20 Latex allergy is a serious medical problem with an increasing number of patients (Slater, 1994, Turjanmaa *et al.*, 1996). Latex is a complex intracellular product, a milky sap, produced by the laticiferous cells of the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, which is used in a variety of everyday articles, e.g. for the production of gloves, balloons, and condoms, and in manufacturing of medical devices. Latex allergy is a serious problem especially with

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

2

health-care workers, rubber industry workers and patients having undergone several surgical procedures. Latex allergy has also been reported to be associated with pollen allergies and food allergies (Nel and Gujuluva, 1998). The cross-reactivity between latex and food allergens is established as the latex-fruit syndrome that might be the consequence of hevein-like protein domains or similar epitopes (Brehler *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 1998, Mikkola *et al.*, 1998). Many latex proteins have been identified as allergens (Breiteneder and Scheiner, 1998). One of the major latex allergens is hevein, which is a defence protein involved in, for instance, the inhibition of several chitin-containing fungi (Lee *et al.*, 1991, Alenius *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1997). Hevein is a small chitin-binding protein of 43 amino acids with four disulphide bonds. Its three-dimensional structure has been determined by X-ray diffraction and NMR (Rodriguez-Romero *et al.*, 1991; Andersen *et al.*, 1993).

IgE antibodies distinctively recognise allergenic epitopes, which would be useful in clinics or immunodiagnostics for detecting and determining allergen concentrations of complex materials. Further, allergenic epitopes are usually different from the immunogenic epitopes of proteins. This fact has hampered the production of monoclonal antibodies capable of specific binding of allergenic epitopes by conventional methodology such as hybridoma technology. It has been recently shown that the development of allergen-specific IgE antibodies is possible by the phage display technology (Steinberger *et al.*, 1996). This methodology is giving new tools to produce allergen-specific recombinant antibodies that can be produced in consistent quality for clinical and diagnostic applications.

Summary of the Invention

We describe in this application the development and characterisation of human IgE antibody fragments that bind allergenic hevein with affinity and specificity high enough to be utilised as reagents in immunoassays designed for the qualitative and quantitative measurement of hevein in biological samples and, in immunotherapy of allergic patients. Specifically, the present invention describes selection of human IgE antibodies specific to hevein by the phage display technique, and the characterisation of the binding properties of the engineered antibody fragments produced in *E.coli*.

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

3

This invention thus provides new reagents to be utilised in different kinds of immunoassay protocols, as well as human immunotherapy. The invention also permits guaranteed continuous supply of these specific reagents of uniform quality, eliminating inherent batch-to-batch variation of polyclonal antisera. These advantageous effects permit the manufacture
5 of new, specific and economical immunodiagnostic assays of uniform quality.

Consequently, one specific object of the present invention is to provide human IgE monoclonal antibodies, fragments thereof, or other derivatives of such antibodies, which bind hevein with affinity and specificity high enough to allow qualitative and quantitative measurement of hevein in biological samples, as well as their use in immunotherapy. The
10 monovalent antibodies of the present invention demonstrate a specific binding to allergenic hevein.

Another object of the present invention is to provide cDNA clones encoding hevein-specific antibody chains, as well as constructs and methods for expression of such clones to produce hevein-binding antibodies, fragments thereof or other derivatives of such antibodies.
15

A further object of this invention is to provide methods of using such hevein-binding antibodies, fragments thereof or other derivatives of such antibodies, or combinations of them for qualitative and quantitative measurement of hevein in biological samples. Additionally,
20 this invention provides hevein-binding antibodies, fragments thereof or other derivatives of such antibodies, or combinations of them for immunotherapy in allergic patients.

Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following drawings and detailed description. It should be understood, however,
25 that the detailed description and the specific examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given for illustration only, since various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this detailed description.

30

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

4

Brief Description of the Drawings

The figures of the constructions are not in scale.

5 **Figure 1** shows a schematic presentation of an intact human IgE subclass antibody, Fab fragment and single-chain antibody (scFv). The antigen-binding site is indicated by a triangle.

Figure 2 shows schematically the panning procedure.

10

Figure 3 shows a schematic presentation of the scFv phage display vector used for the construction of scFv phage libraries.

15 **Figure 4** shows the deduced amino acid sequence of the heavy chain variable region of the 1A4 and 1C2 antibodies. The Complementarity Determining Regions (CDRs) are underlined. Numbering is according to Kabat (Kabat *et al.*, 1991).

20 **Figure 5** shows the deduced amino acid sequence of the light chain variable region of the 1A4 and 1C2 antibodies. CDRs are underlined. Numbering is according to Kabat (Kabat *et al.*, 1991).

25 **Figure 6a** shows the curve obtained from the competitive ELISA of 1A4 Fab fragment with human IgG1 subtype whose binding to hevein has been inhibited by latex polypeptide.

25

Figure 6b shows the curve obtained from the competitive ELISA of 1C2 Fab fragment with human IgG1 subtype whose binding to hevein has been inhibited by latex polypeptide.

30 **Figure 7** shows the result of the competitive ELISA. The binding of 1A4 Fab fragments with human IgG1 subtype to hevein is inhibited by allergenic epitopes (6-mer and 13-mer) of the hevein.

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

5

Abbreviations

	cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
	CDR	complementarity determining region
5	DNA	deoxyribonucleic acid
	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
	Fab	fragment with specific antigen binding
	Fd	variable and first constant domain of a heavy chain
10	Fv	variable regions of an antibody with specific antigen binding
	GFP	green fluorescent protein
	IgE	immunoglobulin E
	mRNA	messenger ribonucleic acid
	NMR	nuclear magnetic resonance
15	PCR	polymerase chain reaction
	RNA	ribonucleic acid
	scFv	single-chain antibody
	<i>supE</i>	a genotype of bacterial strain carrying a glutamine-inserting amber suppressor tRNA
20	V _H	variable region of a heavy chain
	V _L	variable region of a light chain

Detailed Description of the Invention

25 The following definitions are provided for some terms used in this specification. The terms, "immunoglobulin", "heavy chain", "light chain" and "Fab" are used in the same way as in the European Patent Application No. 0125023.

30 "Antibody" in its various grammatical forms is used herein as a collective noun that refers to a population of immunoglobulin molecules and/or immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site or a paratope.

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

6

An "antigen-binding site", a "paratope", is the structural portion of an antibody molecule that specifically binds an antigen.

Exemplary antibodies are those portions of an immunoglobulin molecule that contain the paratope, including those portions known as Fab and Fv.

"Fab" (fragment with specific antigen binding), a portion of antibodies can be prepared by the proteolytic reaction of papain on substantially intact antibodies by methods that are well known. See for example, U.S. Patent No. 4,342,566. Fab fragments can also be produced by recombinant methods, which are well known to those skilled in the art. See, for example, U.S. Patent 4,949,778.

"Domain" is used to describe an independently folding part of a protein. General structural definitions for domain borders in natural proteins are given in Argos, 1988.

A "variable domain" or "Fv" is used to describe those regions of the immunoglobulin molecule, which are responsible for antigen or hapten binding. Usually these consist of approximately the first 100 amino acids of the N-termini of the light and the heavy chain of the immunoglobulin molecule.

"Single-chain antibody" (scFv) is used to define a molecule in which the variable domains of the heavy and light chain of an antibody are joined together via a linker peptide to form a continuous amino acid chain synthesised from a single mRNA molecule (transcript).

"Linker" or "linker peptide" is used to describe an amino acid sequence that extends between adjacent domains in a natural or engineered protein.

A "hevein-binding antibody" is an antibody, which specifically recognises hevein and binds to it, due to interaction mediated by its variable domains.

As examples of fragments of such antibodies falling within the scope of the invention we disclose here scFv fragments of 1A4 and 1C2 as shown in Figures 4 and 5. In one preferred embodiment, the present invention thus provides derivatives of hevein-binding antibodies, e.g. Fab fragments or scFv fragments. It will be appreciated that mutant versions of the

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

7

CDR sequences or complete V_L and V_H sequences having one or more conservative substitutions which do not substantially affect binding capability, may alternatively be employed.

- 5 For use in immunoassay, e.g. for qualitative or quantitative determination of hevein in biological samples, antibodies and antibody derivatives of the invention may be labelled. For these purposes, any type of label conventionally employed for antibody labelling is acceptable.
- 10 For use in immunotherapy, e.g. for blocking allergenic hevein in allergic patients, antibodies and antibody derivatives of the invention may be labelled. For these purposes, any pharmaceutically acceptable label conventionally employed for antibody labelling is appropriate.
- 15 In another aspect, the present invention also provides DNA molecules encoding an antibody or antibody derivative of the invention, and fragments of such DNAs, which encode the CDRs of the V_L and/or V_H region. Such a DNA may be cloned in a vector, more particularly, for example, an expression vector which is capable of directing expression of antibody derivatives of the invention, or at least one antibody chain or a part of one antibody
- 20 chain.

In a further aspect of the invention, host cells are provided, selected from bacterial cells, yeast cells, fungal cells, insect cells, plant cells and mammalian cells, containing a DNA molecule of the invention, including host cells capable of expressing an antibody or antibody derivative of the invention. Thus, antibody derivatives of the invention may be prepared by culturing host cells of the invention expressing the required antibody chain(s), and either directly recovering the desired protein or, if necessary, initially recovering and combining individual chains.

- 25
- 30 The above-indicated scFv fragments were obtained by biopanning of a human IgE scFv-phage library using allergenic recombinant hevein. The human IgE scFv-phage library was constructed from mRNAs isolated from lymphocytes of a latex-allergic patient. The variable region of the light and heavy chain cDNAs were synthesised using human IgE-specific primers for Fd cDNAs and human kappa (κ) and lambda (λ) light chains using human κ

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

8

and λ chain specific primers. The variable regions of the light and heavy chains were amplified by PCR using human κ and λ chain specific primers for V_{κ} and V_{λ} cDNAs and human IgE specific primers for V_H cDNAs, respectively. The human IgE scFv library was constructed by cloning the variable region cDNAs into a scFv phage display vector using restriction sites introduced into the PCR primers.

The human IgE scFv library was selected by phage display using a panning procedure. The human IgE scFv phage library was screened by a biotinylated allergenic recombinant hevein in solution and the binders were captured on streptavidin. The elution of phages was done with 100 mM HCl (pH 2.2) followed by immediate neutralisation with 2 M Tris solution. The phage eluate was amplified in *E. coli* cells. After 5 rounds of biopanning, soluble scFv fragments were produced from isolated phages. The binding specificity of the selected scFv fragments was analysed by ELISA. Several hevein-specific scFv fragment clones were obtained.

As described herein, the phage display technique is an efficient and feasible approach to develop human IgE recombinant anti-hevein antibodies for diagnostic and therapeutic applications.

While one successful selection strategy for obtaining antibody fragments of the invention has been described, numerous variations, by which antibody fragments of the invention may be obtained, will be apparent to those skilled in the art. It may prove possible to select scFv fragments of the invention directly from a phage or microbial display library of scFv fragment or its derivatives. A phage or microbial cell, which presents a scFv fragment or other antibody fragment of the invention as a fusion protein with a surface protein, represents a still further aspect of the invention.

While microbial expression of antibodies and antibody derivatives of the invention offers means for efficient and economical production of highly specific reagents of uniform quality suitable for use in immunodiagnostic assays and immunotherapy, alternatively it may prove possible to produce such a reagent, or at least a portion thereof, synthetically. By applying conventional genetic engineering techniques, initially obtained antibody fragments of the invention may be altered, e.g. new sequences linked, without substantially altering the binding characteristics. Such techniques may be employed to produce novel

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

9

hevein-binding hybrid proteins, which retain both affinity and specificity for hevein as defined hereinbefore.

The development and characterisation of the human hevein-binding recombinant antibodies and their usefulness in immunoassays is now described in more detail in the following examples.

EXAMPLE 1

10 THE RECOMBINANT HEVEIN-SPECIFIC scFv FRAGMENT BY PHAGE DISPLAY SELECTION

In this example the human IgE scFv library was constructed and selected by allergenic hevein in order to isolate scFv fragments with affinity and specificity to hevein. Construct-
15 ion of human IgE scFv phage library was prepared indirectly by constructing IgE Fab- κ and Fab- λ libraries first, and then the particular library DNAs were used for PCR amplification of variable domains of heavy and light chains.

I. Construction of the human IgE scFv phage libraries

20 100 ml of heparinised blood was obtained from a latex-allergic patient. Lymphocytes were isolated according to an Ig-Prime kit protocol (Novagen). Per 10 ml of blood 30 ml of lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM NH₄HCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) was added and incubated on ice for 15 min with shaking occasionally. After centrifugation at 450 g for 10 min
25 the lymphocytes, i.e. the white blood cell pellet, were collected. The pellet was washed twice with lysis buffer and after the final centrifugation the lymphocyte pellet was resuspended in D-solution. Lymphocyte RNAs were isolated using Promega's RNAagents Total RNA Isolation kit according to the manufacturer's protocol. The first strand cDNA synthesis was carried out using Promega's Reverse Transcription system kit. For the synthesis
30 of Fd-fragment cDNA and light chain cDNAs the primers of the constant region of the epsilon (ϵ) chain (C ϵ 1 and C ϵ 2) and the primer of the kappa (C κ 1) and lambda (C λ 1) chain were used, respectively. Primers used for the cDNA synthesis and PCR amplifications of human IgE Fd region and light chains are showed in Table I and Table II.

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

10

PCR amplifications were carried out in two steps: a primary PCR for amplifying Fd and light chains from cDNA templates and a secondary PCR for adding restriction sites to the 5'-end of the DNA fragments obtained after a primary PCR. First the Fd region was amplified by PCR using the primers specific for the variable region of the heavy chains (VH1a-VH7a) and Ce1NotI primer. Accordingly, the kappa and lambda light chains were amplified using specific primers for variable region of the light chains (Vκ1a-Vκ6b and Vλ1a-Vλ10) and Ce1NotI primer, respectively. Primers for the secondary PCR were Cκ1 and Vκ/λ1 and Ce2 for the Fd region, Vκ/λ1 and Cλ1 for the kappa light chain and Vλ1A and Cλ/λ1 for the lambda light chain. The primary PCR amplification was done at the following conditions: 1 cycle of 3 min at 93°C for denaturation, 7 cycles of 1 min at 93°C, 30 s at 63°C and 50 s at 58°C for annealing and 1 min at 72°C for elongation, 23 cycles of 1 min at 93°C, 30 s at 63°C and 1 min at 72°C followed by 1 cycle of 10 min at 72°C. For the secondary PCR the amplification conditions were as follows: 1 cycle of 3 min at 95°C for denaturation, 25 cycles of 1.5 min at 94°C, 1 min at 65°C for annealing and 1.5 min at 72°C for elongation followed by 1 cycle of 10 min at 72°C. Between the primary and the secondary PCR and after the secondary PCR the amplified DNA fragments were purified.

The final PCR products of the different antibody fragments were pooled and digested with appropriate restriction enzymes. Digested DNA fragments, encoding IgE Fd region and κ and λ light chains, were ligated into a phagemid vector and transformed into *E. coli* XL-1 Blue cells to yield an Fab-κ and Fab-λ libraries of 10⁶ independent clones. To avoid possible problems on the expression of Fab fragments on a phage particle an antibody library in scFv format was constructed. Phagemid DNAs from different libraries were isolated and used as template DNAs for amplifying the variable regions of the human IgE heavy and human light chains in order to construct human IgE scFv-κ and scFv-λ libraries.

PCR amplification of the variable region of the heavy chain was carried out using human V_H specific primers (VH1-VH4 and VH1A). Amplification of the variable region of the light chains was done using the following primer pairs: Vκ1-Vκ7, Vκ2-Vκ8, Vκ3-Vκ9, Vκ4-Vκ10, Vκ5-Vκ11 and Vκ6-Vκ11 for human kappa chain and Vλ1-Vλ8, Vλ2-Vλ9, Vλ3-Vλ9, Vλ4-Vλ9, Vλ5-Vλ10, Vλ6-Vλ10 and Vλ7-Vλ10 for human lambda chain (see

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

11

Tables III and IV). The amplified DNA fragments were purified and digested in order to ligate into a scFv phage display vector (Fig.3). Ligation mixtures were transformed into *E. coli* XL-1 Blue cells resulting in the human IgE scFv- κ and scFv- λ libraries with approximately 10^5 independent clones.

5

II. Selection of the human scFv-libraries

The human scFv- κ and scFv- λ libraries were selected by the phage display technique (McCafferty *et al.*, 1990, Barbas *et al.*, 1991). To isolate hevein-binding antibody fragments, the human IgE scFv- κ and scFv- λ libraries displayed on the surface of the bacteriophage were pooled and panned using an affinity panning procedure (Fig.2). First the phage pools were allowed to react either with biotinylated, immunoreactive hevein or with a biotinylated control protein (background) for 1.5 h. Thereafter, the phage pools were transferred to microtitre plate wells coated with biotin binding streptavidin. After a 30-min incubation, the wells were washed 3 times with PBS and the binders were eluted with acidic buffer (100 mM HCl, pH 2.2), and immediately neutralised with 2M Tris solution. For the next panning round the eluted phage pools were amplified by infecting *E. coli* XL-1 Blue cells. Five rounds of panning were performed.

III. Characterisation of the hevein-binders

After the last panning cycle scFv phage display DNA was isolated and transformed into *E. coli* HB2151 (*supE*) cells in order to express soluble scFv fragments. Between the scFv sequence and the phage gene III sequence the scFv phage display vector contains TAG-amber stop codon which will be translated as glutamate in *E. coli* strains with *supE*⁺ genotype but as a stop codon in *E. coli* strains with *supE*⁻ genotype. Sixty-two individual clones were grown in a small scale to produce soluble scFv fragments for preliminary characterisation. Clones were analysed on ELISA test using hevein-coated wells to catch the hevein-specific binders and control protein wells to see non-specific binding (data not shown). Most of the clones bound with high affinity to hevein. Nineteen of the most promising clones were sequenced (Sanger *et al.*, 1977) and two of them were selected for further characterisation (Figures 4 and 5).

30

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

12

EXAMPLE 2**CLONING AND CHARACTERISATION OF HUMAN Fab FRAGMENTS WITH HEVEIN-BINDING SPECIFICITY**

5

In this example the human IgE scFvs with hevein-binding specificity were converted to human Fab fragments with IgG1 subtype. Due to known difficulties in forming multimers, the 1A4 and 1C2 scFvs, obtained from the scFv antibody library, were cloned and bacterially expressed as Fab fragments (Holliger *et al.*, 1993, Desplancq *et al.*, 1994). The resulting antibody fragments were further characterised by a competitive ELISA.

10

I. Cloning of the human Fab fragments with hevein-binding specificity

The Fd regions were amplified by overlapping PCR. The primers used for the PCR are given in Table V.

15

The resulting cDNAs of the Fd region and light chains were cloned into the bacterial expression vector, pKKtac and then transformed into *E. coli* RV308. Soluble Fab fragments designated to 1A4G and 1C2G were produced and the Fab fragments were purified by an introduced C-terminal hexahistidiny! tag on a Sepharose column with immobilised nickel to a substantial purity (data not shown).

20

II. Characterisation of the human Fab fragments

The characterisation of the purified 1A4G and 1C2G was performed by competitive ELISA. First, increasing amounts of latex polypeptides, isolated from latex examination gloves according to Alenius and co-workers (1996), were incubated with the samples, 1A4G and 1C2G, and then the reaction mixtures were applied onto microtitre plate wells coated with allergenic GFP-hevein fusion protein. Preparation of latex polypeptides have been analysed to contain high latex allergenic activity (data not shown). Figure 6 shows the result of the competitive ELISA. The binding of the 1A4G (Figure 6a) and 1C2G (Figure 6b) to hevein could be inhibited by adding increasing amounts of native hevein.

30

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

13

IgE antibodies bind specifically to allergenic epitopes. To study the binding specificity of the 1A4G antibody in more detail a competitive ELISA with peptides comprising the allergenic epitopes was performed (Figure 7). Banerjee and co-workers (1997) have studied the allergenic epitopes of hevein, and they found two potential allergenic epitopes, 6-mer and 13-mer. In competitive ELISA the binding of the 1A4G to the immobilised hevein was inhibited by using the peptides of the allergenic epitopes. These results obtained in different competitive ELISAs indicate that the antibodies isolated from the antibody library can bind specifically to the recombinant hevein and the native hevein as well. In addition, the preliminary results demonstrate that the 1A4G antibody binds specifically to the allergenic epitopes of hevein.

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

14

TABLE I: Primers used for cDNA synthesis and PCR amplification of the human IgE Fd region.

Cε1: 5'- GCTGAAGGTTTTGTTGTCGACCCAGTC -3'
5 Cε2: 5'- CACGGTGGGCGGGTGAAGTCCC -3'
CεNotI: 5'- GAATGGTGGCGCCGCGCTGAAGGTTTTGTTGTCG -3'
VH1a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTCAGCTGGTGCAG -3'
VH1b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTCCAGCTTGTGCAG -3'
VH1c: 5'- ATGGCCGCAGCTSAGGTCCAGCTGGTACAG -3'
10 VH1d: 5'- ATGGCCGCAGCTCARATGCAGCTGGTGCAG -3'
VH2a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGATCACCTTGAAGGAG -3'
VH2b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTCACCTTGARGGAG -3'
VH3a: 5'- ATGGCCGCAGCTGARGTGCAGCTGGTGGAG -3'
VH3b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG -3'
15 VH3c: 5'- ATGGCCGCAGCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG -3'
VH4a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGSTGCAGCTGCAGGAG -3'
VH4b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTGCAGTACAGCAG -3'
VH5a: 5'- ATGGCCGCAGCTGARGTGCAGCTGGTGCAG -3'
VH6a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTACAGTGCAGCAG -3'
20 VH7a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTSCAGCTGGTGCAA -3'
VH1A: 5'- TTA CTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCAGCT -3'

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

15

TABLE II: Primers used for cDNA synthesis and PCR amplification of human kappa and lambda chains.

	Cκ1: 5'- AGGTAGGGCGCGCCTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC -3'
5	Vκ1a: 5'- ATGGCAGCGGCTRACATCCAGATGACCCAG -3'
	Vκ1b: 5'- ATGGCAGCGGCTGMCATCCAGTTGACCCAG -3'
	Vκ1c: 5'- ATGGCAGCGGCTGCCATCCRGATGACCCAG -3'
	Vκ1d: 5'- ATGGCAGCGGCTGCATCTGGATGACCCAG -3'
	Vκ2a: 5'- ATGGCAGCGGCTGATATTGTGATGACCCAG -3'
10	Vκ2b: 5'- ATGGCAGCGGCTGATRTTGTGATGACTCAG -3'
	Vκ3a: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATTGTGTTGACRCAG -3'
	Vκ3b: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATAGTGATGACGCAG -3'
	Vκ3c: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATTGTAATGACACAG -3'
	Vκ4a: 5'- ATGGCAGCGGCTGACATCGTGATGACCCAG -3'
15	Vκ5a: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAACGACACTACGCAG -3'
	Vκ6a: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATTGTGCTGACTCAG -3'
	Vκ6b: 5'- ATGGCAGCGGCTGATGTTGTGATGACACAG -3'
	Vκλ1: 5'- TTGTTATTGCTAGCTGCACAACCAGCAATGGCAGCGGCT -3'
	Cλ1: 5'- AGGTAGGGCGCGCCTTATGAACAATTCYGYAGGGGC -3'
20	Vλ1a: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGTGCTGACTCAG -3'
	Vλ1b: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGTGYTGACGCAG -3'
	Vλ1c: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGTCGTGACGCAG -3'
	Vλ2 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGCCCTGACTCAG -3'
	Vλ3a: 5'- ATGGCAGCGGCTTCCTATGWGCTGACTCAG -3'
25	Vλ3b: 5'- ATGGCAGCGGCTTCCTATGAGCTGACACAG -3'
	Vλ3e: 5'- ATGGCAGCGGCTTCTTCTGAGCTGACTCAG -3'
	Vλ3d: 5'- ATGGCAGCGGCTTCCTATGAGCTGATGCAG -3'
	Vλ4 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGCYTGTGCTGACTCAA -3'
	Vλ5 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGSCTGTGCTGACTCAG -3'
30	Vλ6 : 5'- ATGGCAGCGGCTAATTTATGCTGACTCAG -3'
	Vλ7 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGRCTGTGGTACTCAG -3'
	Vλ8 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGACTGTGGTGACCCAG -3'

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

16

Vλ4/9: 5'- ATGGCAGCGGCTCWCCTGTGCTGACTCAG -3'

Vλ10: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGGCAGGGCTGACTCAG -3'

5

TABLE III: Primers used for PCR amplification of the human variable regions of the heavy chain.

VH1: 5'- ATTTACTCGAGTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC -3'

10 VH2: 5'- ATTTACTCGAGTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC -3'

VH3: 5'- ATTTACTCGAGTGAGGAGACGGTGACCAGGGTCC -3'

VH4: 5'- ATTTACTCGAGTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC -3'

VH1A: 5'- TTTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCACT -3'

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

17

TABLE IV: Primers used for PCR amplification of the human variable regions of the light chains.

- V_κ1: 5'- TTATAGAGCTCGACATCCAGATGACCCAGTCTCC -3'
5 V_κ2: 5'- TTATAGAGCTCGATGTTGTGATGACTCAGTCTCC -3'
V_κ3: 5'- TTATAGAGCTCGAAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC -3'
V_κ4: 5'- TTATAGAGCTCGACATCGTGATGACCCAGTCTCC -3'
V_κ5: 5'- TTATAGAGCTCGAAAACGACACTCAGCAGTCTCC -3'
V_κ6: 5'- TTATAGAGCTCGAAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC -3'
10 V_κ7: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTGATTCCACCTTGGTCCC -3'
V_κ8: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC -3'
V_κ9: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTGATATCCACTTGGTCCC -3'
V_κ10: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC -3'
V_κ11: 5'- TATAAGCGGCCGCACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC -3'
15 V_λ1: 5'- ATTTAGAGCTCCAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC -3'
V_λ2: 5'- ATTTAGAGCTCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC -3'
V_λ3: 5'- ATTTAGAGCTCTCCTATGTGCTGACTCAGCCACC -3'
V_λ4: 5'- ATTTAGAGCTCTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC -3'
V_λ5: 5'- ATTTAGAGCTCCACGTTATACTGACTCAACCGCC -3'
20 V_λ6: 5'- ATTTAGAGCTCCAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC -3'
V_λ7: 5'- ATTTAGAGCTCAATTTATGCTGACTCAGCCCA -3'
V_λ8: 5'- ATATTGCGGCCGCACCTAGGACGGTGACCTTGGTCCC -3'
V_λ9: 5'- ATATTGCGGCCGCACCTAGGACGGTCAGCTTGGTCCC -3'
V_λ10: 5'- ATATTGCGGCCGCACCTAAAACGGTGAGCTGGTCCC -3'

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

18

TABLE V: Primers used for PCR amplification of the human Fd regions with IgE and IgG1 subtype.

- 5 5^{Cε}: 5'-GCTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACACAGAGCCCATCCG-3'
3^{Cε}: 5'-GCATTGCATTGCGGCCGCTTAATGGTGATGGTGATGATGGCTGAAGGT
TTTGTTCGACCC-3'
5^{Cγ}: 5'-GGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC-3'
3^{Cγ}: 5'-TTTAGTTTATGCGGCCGCTTAATGGTGATGATGATGGTGACAAGATTG
10 GGCTCTGC-3'
5^{Vε}: 5'-TFACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGACGT-3'
3^{Vε}: 5'-TGAGGAGACGGTGACC-3'
5^{Cκ}: 5'-GGGACACGACTGGAGATTAATACTGTGGCTGCACCATCTGTC-3'
3^{Cκ}: 5'-AGGTAGGGCGGCCTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'
15 5^{Vκ}: 5'-ATGGCAGCGGCTGAAACGACACTCACGCAG-3' and
5'-TTGTTATTGCTAGCTGCACAACCAGCAATGGCAGCGGCT-3'
3^{Vκ}: 5'-TTTAATCTCCAGTCGTGTCCC-3'.

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

19

References

- Alenius, H., Kalkkinen, N., Reunala, T., Turjanmaa, K., and Palosuo, T. (1996) J. Immunol. **156**, 1618-1625.
- 5 Andersen, N.H., Cao, B., Rodriguez-Romero, A., and Arreguin, B. (1993) Biochemistry **32**, 1407-1422.
- Argos, P. (1988) Protein Engineering, **2**, 101-113.
- 10 Banerjee, B., Wang, X., Kelly, K.J., Fink, J.N., Sussman, G.L., and Kurup, V.P. (1997) J. Immunol. **159**, 5724-5732.
- Barbas III, C.F., Kang, A.S., Lerner, R.A., and Benkovic, S.J. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**, 7978-7982.
- 15 Brehler, R., Theissen, U., Mohr, C., and Luger, T. (1997) Allergy **52**, 404-410.
- Breiteneder, H., and Scheiner, O. (1998) Int. Arch. Allergy Immunol. **116**, 83-92.
- 20 Chen, Z., Posch, A., Lohaus, C., Raulf-Heimsoth, M., Meyer, H.E., and Baur, X. (1997) J. Allergy Clin. Immunol. **99**, 402-409.
- Chen, Z., Posch, A., Cremer, R., Raulf-Heimsoth, M., and Baur, X. (1998) J. Allergy Clin. Immunol. **102**, 476-481.
- 25 Corry, D.B., and Kheradmand, F. (1999) Nature **402**, B18-B23.
- Desplancq, D., King, D.J., Lawson, A.D.G., and Mountain, A. (1994) Protein Eng. **7**, 1027-1033.
- 30 Holliger, P., Prospero, T., and Winter, G. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**, 6444-6448.
- 35 Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M., and Gottesman, K.S. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD.
- Lee, H-i, Broekaert, W.F., and Raikhel, N.V. (1991) J. Biol. Chem. **266**, 15944-15948.
- 40 McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., and Chiswell, F.J. (1990) Nature **348**, 552-554.
- Mikkola, J.H., Alenius, H., Kalkkinen, N., Turjanmaa, K., Palosuo, T., and Reunala, T. (1998) J. Allergy Clin. Immunol. **102**, 1005-1012.
- 45 Nel, A., and Gajulava, C. (1998) Ann. Allergy Asthma Immunol. **81**, 388-398.
- Rodriguez-Romero, A., Ravichandran, K.G., and Soriano-Garcia, M. (1991) FEBS Lett. **291**, 307-309.
- 50

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

20

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 5463-5467.

Slater, J.E. (1994) J. Allergy Clin. Immunol. **94**, 139-149.

5

Steinberger, P., Kraft, D., and Valenta, R. (1996) J. Biol. Chem. **271**, 10967-10972.

Turjanmaa, K., Alenius, H., Mäkinen-Kiljunen, S., Reunala, T., and Palosuo, T. (1996) Allergy **51**, 593-602.

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

21

Claims

1. A monoclonal antibody with binding specificity to allergenic hevein, or a functional fragment or derivative thereof.
5
2. The monoclonal antibody according to claim 1, wherein the fragment is a scFv fragment or a Fab fragment.
3. The monoclonal antibody according to claim 2, wherein the scFv fragment or the Fab
10 fragment are derived from an antibody belonging to an IgE subclass.
4. The monoclonal antibody according to claim 2, wherein the fragment is scFv fragment 1A4 or 1C2.
- 15 5. An isolated DNA molecule encoding the monoclonal antibody or a fragment or derivative thereof according to any one of the preceding claims, and fragments of such DNA, which encode at least one antibody chain of said antibody or antibody derivative.
6. The isolated DNA molecule according to claim 5, wherein the antibody chain is the
20 CDR of the V_L and/or V_H region.
7. The isolated DNA molecule according to claim 5 cloned into a vector.
8. The isolated DNA molecule according to claim 7, wherein said vector is an expression
25 vector capable of expressing antibodies, as well as fragments and derivatives thereof as claimed in any one of claims 1 to 4.
9. A host cell containing a DNA according to any one of claims 5 to 8.
- 30 10. The host cell according to claim 9, capable of expressing a monoclonal antibody or a fragment or derivative thereof as claimed in any one of claims 1 to 4 or at least one antibody chain of said antibody or antibody derivative.

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

22

11. The host cell according to claim 10, wherein the antibody chain is the scFv fragment as claimed in any one of claims 2 to 4.
- 5 12. A method of preparing a monoclonal antibody or a fragment or derivative thereof according to any one of claims 1 to 4, comprising the steps of
- culturing a host cell according to claim 9 capable of expressing at least one of the required antibody chains, and
 - recovering said antibody or antibody fragment or derivative.
- 10 13. The method according to claim 12, further comprising the steps of
- combining component chains after the recovery step,
 - introducing combined component chains into a second host cell, and
 - recovering said combined component chains.
- 15 14. The method according to claim 12, further comprising the step of labelling said antibody or antibody derivative.
- 20 15. A method of preparing a monoclonal antibody or a fragment or derivative thereof according to any one of claims 1 to 4, comprising the step of
- synthetically producing at least a portion of said antibody or antibody derivative.
- 25 16. A phage or microbial cell which presents an antibody fragment according to any one of claims 2 to 4 as a fusion protein with a surface protein.
- 30 17. A method of selecting an antibody fragment according to any one of claims 2 to 4, comprising the steps selecting said antibody fragment from a display library of antibody fragments containing a phage or cell according to claim 16.

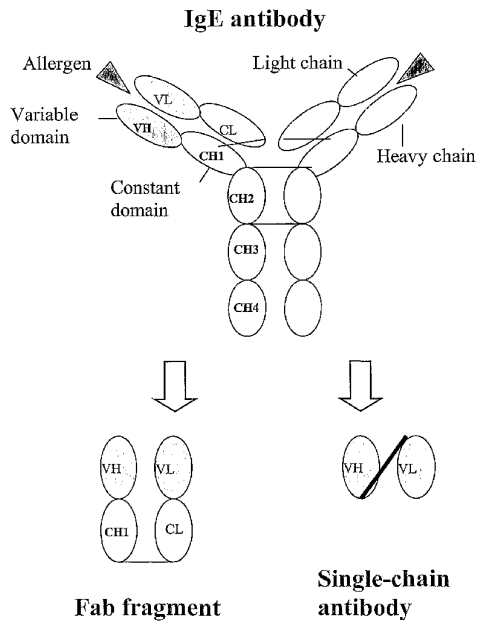
WO 02/094878

PCT/FI02/00423

23

18. A method of assaying hevein in a sample, comprising the steps of
- obtaining said sample, and
 - assaying for hevein by employing a monoclonal antibody or a fragment or derivative thereof according to any one of claims 1 to 4.
- 5
19. A test kit comprising an antibody or a fragment or derivative thereof according to any one of claims 1 to 4 in a suitable container for transport and storage.
20. A monoclonal antibody or a fragment or derivative thereof according to any one of
- 10 claims 1 to 4 for use in immunodiagnosics.
21. A monoclonal antibody or a fragment or derivative thereof according to any one of claims 1 to 4 for use in immunotherapy.

Figure 1



WO 02/094878

PCT/FI02/00423

2/8

Figure 2

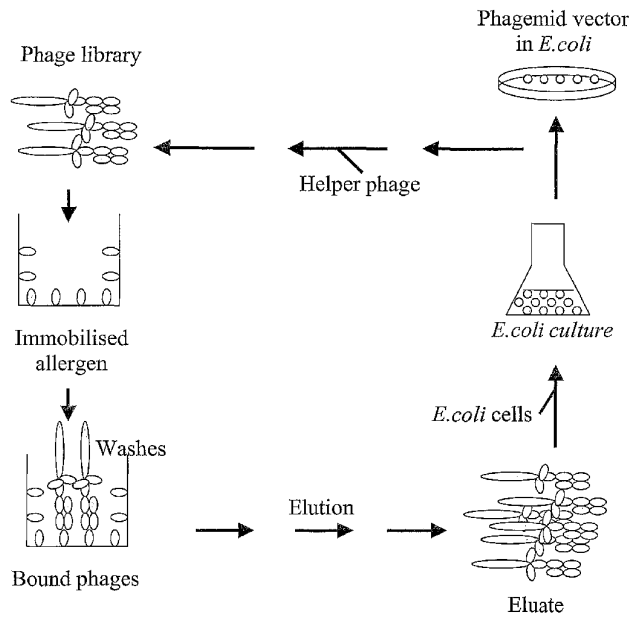
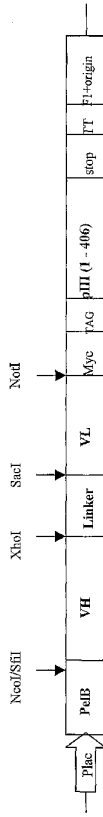


Figure 3



lac promoter
 pMB1, peccate lyase signal sequence
 Heavy chain: VH = SFI/NcoI - XhoI fragment
 Linker: (Gly₆Ser)₃ = 15 aa
 Light chain: VL = SacI - NotI fragment
 Myc peptide: EQKLISEEDLN = 11 aa; Mab 9E10
 TAG = Amber stop codon; supE⁺, E.coli strain TAG = Glu → srfV-pIII fusion
 supE⁻, E.coli strain = stop codon → srfV
 TT: transcription terminator
 fl⁺: phage origin of replication

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

4/8

Figure 4

	10	20	30	
1A4-VH	QITLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTTCMGVAVIR			
1C2-VH	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCNLSGFSLSTSGVGVGWIR			
	40	50	60	70
1A4-VH	QPPGKALEWLALIWDDDDTRYSPALKSRLTVTKDTSKNQV			
1C2-VH	QPPGKALEWLALIWDDDKRYSPSLRNRLTITKDTSKNOV			
	80	90	100	
1A4-VH	VLTMTNMDPVDATYYCAHTT H CSNGVC YSAH WFDSWG			
1C2-VH	VLTMTNMDPVDGTGYFCARSVNYDDVSGTYHSHNWFDEWG			
	110			
1A4-VH	QGTLVTVSS			
1C2-VH	QGTLVTVSS			

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

5/8

Figure 5

	10	20	30	
1A4 -Vk	ETTLTQSPGTL SL SPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK			
1C2 -Vk	ETTLTQSPSSLSASVGD RV TITCRASQSI SSYLNWYQQK			
	40	50	60	70
1A4 -Vk	PGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSGTDFLTISRLE			
1C2 -Vk	PGKAPKLLIYA <u>ASSLQ</u> GVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQ			
	80	90	100	
1A4 -Vk	PEDFAVYYCQYGS <u>SELT</u> FGQGTRLEIKR			
1C2 -Vk	PEDFATYYCQSYST <u>ERT</u> FGQGTRLEIKR			

Figure 6a

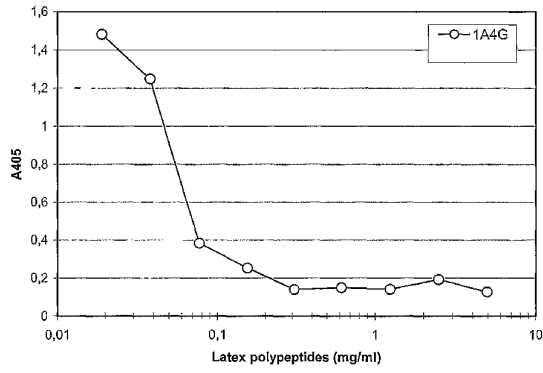


Figure 6b

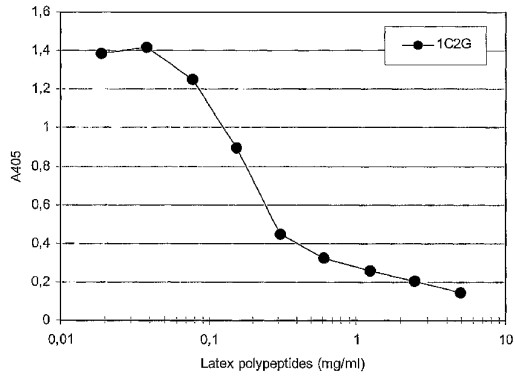
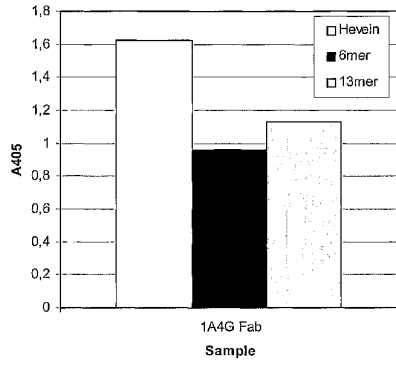


Figure 7



WO 02/094878

1/22

PCT/FI02/00423

SEQUENCE LISTING

<110> Valtion teknillinen tutkimuskeskus
<120> Hevein-binding monoclonal antibodies
<130> 38122
<140>
<141>
<160> 91
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 1
gctgaaggtt ttgtgtcga cccagtc 27
<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 2
cacggtgggc ggggtgaagt ccc 23
<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 3
atgcccgcag ctcaggtkca gctggtgcag 30
<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

WO 02/094878	2/22	PCT/FI02/00423
oligonucleotide primer		
<400> 4 atggccgcag ctcaggtcca gttgtgcag		30
<210> 5 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 5 atggccgcag ctsaggtcca gctggtacag		30
<210> 6 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 6 atggccgcag ctccaratgca gctggtgcag		30
<210> 7 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 7 atggccgcag ctcagatcac cttgaaggag		30
<210> 8 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 8 atggccgcag ctcaggtcac cttgargag		30
<210> 9 <211> 30 <212> DNA		

WO 02/094878	3/22	PCT/FI02/00423
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 9 atggccgcag ctgargtgca gctggtggag		30
<210> 10		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 10 atggccgcag ctcaggtgca gctggtggag		30
<210> 11		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 11 atggccgcag ctgaggtgca gctggtggag		30
<210> 12		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 12 atggccgcag ctcagstgca gctgcaggag		30
<210> 13		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 13 atggccgcag ctcaggtgca gctacagcag		30

WO 02/094878

4/22

PCT/FI02/00423

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 14
atggccgcag ctgargtgca gctggtgcag 30

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 15
atggccgcag ctcaggtaca gctgcagcag 30

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 16
atggccgcag ctcaggtaca gctggtgcaa 30

<210> 17
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 17
ttactcgcgg cccagccggc catggcgcga gct 33

<210> 18
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

WO 02/094878	5/22	PCT/FI02/00423
<400> 18 aggtaggcg cgcottaaca ctctcccctg ttgaagc		37
<210> 19 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 19 atggcagcgg ctracatcca gatgaccag		30
<210> 20 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 20 atggcagcgg ctgmcaccca gttgaccag		30
<210> 21 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 21 atggcagcgg ctgccatccr gatgaccag		30
<210> 22 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 22 atggcagcgg ctgtcatctg gatgaccag		30
<210> 23 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		

WO 02/094878

6/22

PCT/FI02/00423

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 23

atggcagcgg ctgatattgt gatgaccag

30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 24

atggcagcgg ctgatrttgt gatgactcag

30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 25

atggcagcgg ctgaaattgt gttgaorcag

30

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 26

atggcagcgg ctgaaatagt gatgacgcag

30

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 27

atggcagcgg ctgaaattgt aatgacacag

30

WO 02/094878

7/22

PCT/FI02/00423

<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 28
atggcagcgg ctgacatcgt gatgaccag 30

<210> 29
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 29
atggcagcgg ctgaaaagac actcagcag 30

<210> 30
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 30
atggcagcgg ctgaaattgt gctgactcag 30

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 31
atggcagcgg ctgatgttgt gatgacacag 30

<210> 32
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

WO 02/094878	8/22	PCT/FI02/00423
oligonucleotide primer		
<400> 32 ttgttattgc tagctgcaca accagcaatg gcagcggct		39
<210> 33 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 33 aggtagggcg cgccctatga acattcygga ggggc		35
<210> 34 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 34 atggcagcgg ctcagtctgt gctgactcag		30
<210> 35 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 35 atggcagcgg ctcagtctgt gytgacgcag		30
<210> 36 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 36 atggcagcgg ctcagtctgt cgtgacgcag		30
<210> 37 <211> 30 <212> DNA		

WO 02/094878	9/22	PCT/FI02/00423
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 37 atggcagcgg ctcagtctgc cctgactcag		30
<210> 38		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 38 atggcagcgg cttctctatgw gctgactcag		30
<210> 39		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 39 atggcagcgg cttctctatga gctgacacag		30
<210> 40		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 40 atggcagcgg cttctctctga gctgactcag		30
<210> 41		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 41 atggcagcgg cttctctatga gctgatgcag		30

WO 02/094878

10/22

PCT/FI02/00423

<210> 42
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
.
<400> 42
atggcagcgg ctcagcytgt gctgactcaa 30

<210> 43
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
.
<400> 43
atggcagcgg ctcagsctgt gctgactcag 30

<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
.
<400> 44
atggcagcgg ctaattttat gctgactcag 30

<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
.
<400> 45
atggcagcgg ctcagrctgt ggtgactcag 30

<210> 46
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

WO 02/094878	11/22	PCT/FI02/00423
oligonucleotide primer		
<400> 46 atggcagcgg ctcagactgt ggtgaccag		30
<210> 47 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 47 atggcagcgg ctcwgctgt gctgactcag		30
<210> 48 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 48 atggcagcgg ctcaggcagg gctgactcag		30
<210> 49 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 49 atttactcga gtgaggagac ggtgaccagg gtgcc		35
<210> 50 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 50 atttactcga gtgaagagac ggtgaccatt gtccc		35
<210> 51 <211> 35 <212> DNA		

WO 02/094878	12/22	PCT/FI02/00423
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 51 atttactcga gtgaggagac ggtgaccagg gttcc		35
<210> 52		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 52 atttactcga gtgaggagac ggtgaccgtg gtccc		35
<210> 53		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 53 atttactcga gtgaggagac ggtgaccgtg gtccc		35
<210> 54		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 54 ttatagagct cgacatccag atgacccagt ctcc		34
<210> 55		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 55 ttatagagct cgatgttctg atgactcagt ctcc		34

WO 02/094878

13/22

PCT/FI02/00423

<210> 56
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 56
ttatagagct cgaattgtg ttgacgcagt ctcc 34

<210> 57
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 57
ttatagagct cgacatcgtg atgacccagt ctcc 34

<210> 58
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 58
ttatagagct cgaacgaca ctcacgcagt ctcc 34

<210> 59
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 59
ttatagagct cgaattgtg ctgactcagt ctcc 34

<210> 60
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

WO 02/094878	14/22	PCT/FI02/00423
oligonucleotide primer		
<400> 60 tataagcggc cgcacgtttg atttccacct tggtcoc		37
<210> 61 <211> 37 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 61 tataagcggc cgcacgtttg atctccagct tggtcoc		37
<210> 62 <211> 37 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 62 tataagcggc cgcacgtttg atatccactt tggtcoc		37
<210> 63 <211> 37 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 63 tataagcggc cgcacgtttg atctccacct tggtcoc		37
<210> 64 <211> 37 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 64 tataagcggc cgcacgttta atctccagtc gtgbcoc		37
<210> 65 <211> 34 <212> DNA		

WO 02/094878	15/22	PCT/FI02/00423
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 65 atttagagct ccagtcctgtg ttgacgcagc cgcc		34
<210> 66		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 66 atttagagct ccagtcctgcc ctgactcagc ctgc		34
<210> 67		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 67 atttagagct ctccctatgtg ctgactcagc cacc		34
<210> 68		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 68 atttagagct ctctcttgag ctgactcagg accc		34
<210> 69		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 69 atttagagct ccacgttata ctgactcaac cgcc		34

WO 02/094878

16/22

PCT/FI02/00423

<210> 70
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 70
atttagagct ccaggctgtg ctccactcagc cgtc 34

<210> 71
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 71
atttagagct caattttatg ctgactcagc ccca 34

<210> 72
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 72
atattgcggc cgcacctagg acggtgacct tggtdcc 37

<210> 73
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer
<400> 73
atattgcggc cgcacctagg acggtcagct tggtdcc 37

<210> 74
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

WO 02/094878	17/22	PCT/FI02/00423
<400> 74 atattgcggc cgcacctaaa acggtgagct gggtcoc		37
<210> 75 <211> 38 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 75 gctcacgctc tctcagcct ccacacagag cccatccg		38
<210> 76 <211> 62 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 76 gcattgcatt gggccgctt aatggtgatg gtgatgatgg ctgaaggttt tgtttgcgac cc		60 62
<210> 77 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 77 ggtcacgctc tctcagcct ccaccaagg ccc		33
<210> 78 <211> 57 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 78 tttagtttat gggccgctt aatggtgatg atgatggga caagatttgg gctctgc		57
<210> 79 <211> 33 <212> DNA		

WO 02/094878	18/22	PCT/FI02/00423
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 79 ttactcggcg cccagccggc catggccgca gct		33
<210> 80		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 80 tgaggagacy gtgacc		16
<210> 81		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 81 gggacacgac tggagattaa aactgtggct gcaccatctg tc		42
<210> 82		
<211> 37		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 82 aggtagggcg cgccttaaca ctctcccctg ttgaagc		37
<210> 83		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide primer		
<400> 83 atggcagcgg ctgaaacgac actcaccgag		30

WO 02/094878

19/22

PCT/FI02/00423

<210> 84
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide primer

 <400> 84
 ttgttattgc tagctgcaca accagcaatg gcagcggct 39

 <210> 85
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide primer

 <400> 85
 tttaatctcc agtcgtgtcc c 21

 <210> 86
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Myc peptide

 <400> 86
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 1 5 10

 <210> 87
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> SITE
 <222> (31)..(37)
 <223> CDR

 <220>
 <221> SITE
 <222> (52)..(67)
 <223> CDR

 <220>
 <221> SITE
 <222> (101)..(117)
 <223> CDR

 <400> 87
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

20/22

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

<210> 88
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITE
 <222> (31)..(37)
 <223> CDR

<220>
 <221> SITE
 <222> (52)..(67)
 <223> CDR

<220>
 <221> SITE
 <222> (101)..(119)
 <223> CDR

<400> 88
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Asn Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60
 Leu Arg Asn Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Gly Thr Tyr Phe
 85 90 95

WO 02/094878

PCT/FI02/00423

21/22

Cys Ala Arg Ser Val Asn Tyr Asp Asp Val Ser Gly Thr Tyr His Ser
 100 105 110

His Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 89
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITE
 <222> (24)..(35)
 <223> CDR

<220>
 <221> SITE
 <222> (51)..(57)
 <223> CDR

<220>
 <221> SITE
 <222> (90)..(98)
 <223> CDR

<400> 89
 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 90
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITE
 <222> (24)..(34)

WO 02/094878

22/22

PCT/FI02/00423

<223> CDR

<220>

<221> SITE

<222> {50}..{56}

<223> CDR

<220>

<221> SITE

<222> {89}..{97}

<223> CDR

<400> 90

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 91

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide primer

<400> 84

gaatgggtgcg gccgcgctga aggttttggtt gtcg

34

【手続補正書】

【提出日】平成15年6月19日(2003.6.19)

【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】

抗体又はその誘導体からなる物質であって、該抗体はI g Eサブクラスに属し、且つ、アレルギー性ヘベインに結合特異性を有するモノクローナル抗体又はその機能的フラグメントと定義される、ヘベイン結合性物質。

【請求項2】

該機能的フラグメントがs c F vフラグメント又はF a bフラグメントであることを特徴とする、請求項1に記載のヘベイン結合性物質。

【請求項3】

該s c F vフラグメントが1 A 4又は1 C 2であることを特徴とする、請求項2に記載のヘベイン結合性物質。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかのヘベイン結合性物質をコードするDNAであるか、該DNAの断片であって、該ヘベイン結合性物質に含まれる抗体鎖の少なくとも1種をコードするDNA断片である、単離されたDNA分子。

【請求項5】

該抗体鎖が、V_L及び/又はV_H領域の相補性決定部(CDR)であることを特徴とする、請求項4に記載の単離されたDNA分子。

【請求項6】

ベクターにクローニングしてなることを特徴とする、請求項4に記載の単離されたDNA分子。

【請求項7】

該ベクターが、請求項1～3のいずれかのヘベイン結合性物質を発現可能なベクターであることを特徴とする、請求項6に記載の単離されたDNA分子。

【請求項8】

請求項4～7のいずれかのDNA分子を含む宿主細胞。

【請求項9】

請求項1～3のいずれかに記載のヘベイン結合性物質、又は該物質に含まれる抗体鎖の少なくとも1種を発現することが可能な、請求項8に記載の宿主細胞。

【請求項10】

該抗体鎖が、請求項2又は3で定義されたs c F vフラグメントであることを特徴とする、請求項9に記載の宿主細胞。

【請求項11】

請求項1～3のいずれかのヘベイン結合性物質の製造方法であって、少なくとも1種の抗体鎖を発現しうる請求項8の宿主細胞を培養し、そして該細胞の産生したヘベイン結合性物質を回収することを包含する方法。

【請求項12】

以下の工程を更に包含することを特徴とする、請求項11に記載の製造方法。
該ヘベイン結合性物質を回収した後、該ヘベイン結合性物質の抗体鎖を構成する複数のドメインを包含するドメイン複合体を調製する工程、
調製したドメイン複合体を二次宿主細胞に導入する工程、及び
ドメイン複合体を回収する工程。

【請求項 13】

更に、回収したヘベイン結合性物質を標識する工程を包含する、請求項 11 に記載の製造方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 3 のいずれかのヘベイン結合性物質の製造方法であって、該ヘベイン結合性物質の少なくとも一部を合成することを特徴とする製造方法。

【請求項 15】

請求項 2 又は 3 のヘベイン結合性物質を、表面タンパク質との融合タンパク質として提示するファージ又は微生物細胞。

【請求項 16】

ヘベイン結合性物質を提示する請求項 15 のファージ又は細胞からなるディスプレイライブラリーから、請求項 2 又は 3 のヘベイン結合性物質を選択する方法。

【請求項 17】

サンプル中のヘベインを検出する方法であって、

サンプルを提供し、そして

請求項 1 ~ 3 のいずれかのヘベイン結合性物質を用いてヘベインを検出することを包含する方法。

【請求項 18】

運搬及び保管に適した容器に入れられた、請求項 1 ~ 3 のいずれかのヘベイン結合性物質を包含する試験キット。

【請求項 19】

免疫学的診断に使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかのヘベイン結合性物質。

【請求項 20】

免疫学的治療に使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかのヘベイン結合性物質。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 02/00423
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C07K 16/00, G01N 33/577 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)		
IPC7: C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, WPI-DATA, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM. ABS DATA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WD 0161305 A2 (FINNISH IMMUNOTECHNOLOGY LTD.), 23 August 2001 (23.08.01), example 8 --	1-21
X	Int Arch Allergy Immunol, Volume 121, 2000, H. Chardin et al: "Identification of Hev b1 in Natural Latex Mattresses", page 211 - page 214, abstract; page 212, column 2, paragraph 3 --	1-21
X	Journal of Allergy and Clinical Immunology, Volume 105, no. 1 part 2, 2000, RG Hamilton et al: "248 Quantification of Hev-b 1/Hev-b 6 Levels in Prospective Latex Allergen Reference Preparations by Immunoenzymetric Assays (IEMAs)", page 82 - page 83, paragraph 2 --	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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 cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
23 Sept 2002	27-09-2002	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Terese Persson/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI 02/00423

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	The Journal of Biological Chemistry, Volume 266, no. 24, August 1991, Hyung-i Lee et al: "Co- and Post-translational Processing of the Hevein Preproprotein of Latex of the Rubber Tree (Hevea brasiliensis), page 15944 - page 15948, abstract; page 15945, column 2, paragraph 2 --	1-21
X	J Allergy Clin Immunol, Volume 99, 1997, Anton Posch et al: "Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing", page 385 - page 395, page 394, column 2 --	1-21
A	J Allergy Clin Immunol, Volume 99, 1997, Zhiping Chen et al: "Isolation and identification of hevein as a major IgE-binding polypeptide in Hevea latex", page 402 - page 409 --	1-21
A	Ann Allergy Asthma Immunol, Volume 81, 1998, André Nel et al: "Latex antigens: identification and use in clinical and experimental studies, including crossreactivity with food and pollen allergens", page 388 - page 398 -- -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

02/09/02

International application No.
PCT/FI 02/00423

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0161305 A2	23/08/01	AU 3747101 A	27/08/01
		FI 20000325 A,V	16/08/01
		FI 20002225 A	10/04/02

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 7/00	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Q
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 マキネン - キルユネン, ソイリ
フィンランド国、エフアイエヌ - 0 0 7 1 0 ヘルシンキ、グラニーッティエ 7 アス 2
8

(72) 発明者 ハーハテラ, タリ
フィンランド国、エフアイエヌ - 0 0 2 0 0 ヘルシンキ、パヤラハデンティエ 1 0 ベーデー
3 4

(72) 発明者 タッキネン, クリスティーナ
フィンランド国、エフアイエヌ - 0 2 2 0 0 エスポー、ハルティランティエ 1 2 アス 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA47 CA01 CA20 DA06 EA03 GA11 HA15
4B063 QA01 QQ79 QR32 QR62 QR75 QR80 QS17 QS25 QX01
4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 BB11 BB41 BB44 CC23 EE01
4H045 AA11 AA20 BA10 CA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	Hevein结合单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2005500826A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2002592352	申请日	2002-05-17
申请(专利权)人(译)	Barution Tekunirinen政党成员金计划扫描箱		
[标]发明人	ラウッカネンマルヤレーナ ソデルlundハンス マキネンキルユネンソイリ ハーハテラタリ タッキネンクリスティーナ		
发明人	ラウッカネン,マルヤ-レーナ ソデルlund,ハンス マキネン-キルユネン,ソイリ ハーハテラ,タリ タッキネン,クリスティーナ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P37/08 C07K16/16 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/70		
CPC分类号	C07K16/16 C07K2317/21 C07K2317/55 C07K2317/622 G01N2333/415		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.N A61P37/08 C07K16/16 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/53.D G01N33/53.Q C12N5/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA47 4B024/CA01 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024 /GA11 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QR80 4B063/QS17 4B063/QS25 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064 /DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB44 4C085/CC23 4C085 /EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2001001055 2001-05-18 FI		
其他公开文献	JP2005500826A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

抗体工程技术本发明涉及抗体工程技术。更具体地，本发明涉及以过敏性Hevein高亲和力和特异性结合的人IgE抗体及其衍生物。本发明还提供了制备或修饰上述Hevein结合单克隆抗体的方法，以及在免疫学诊断领域中这种抗体或其衍生物的方法。本发明中，与生物样品和原料样品中定性和定量测定过敏Hebein在一起，免疫治疗成为可能，作为结果，能够抑制过敏Hebein的活性过敏的患者。

