

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-254572

(P2004-254572A)

(43) 公開日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	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	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/395 T	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-48181 (P2003-48181)

(22) 出願日 平成15年2月25日 (2003.2.25)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年8月25日 発行の「生化学 Vol. 74 No. 8」に発表

(71) 出願人 899000079

学校法人慶應義塾  
東京都港区三田2丁目15番45号

(74) 代理人 100071283

弁理士 一色 健輔

(74) 代理人 100084906

弁理士 原島 典孝

(74) 代理人 100098523

弁理士 黒川 恵

(72) 発明者 清水 信義

東京都新宿区信濃町35番 慶應義塾大学  
医学部内

(72) 発明者 伊藤 文昭

大阪府枚方市長尾峠町45番1号 摂南大  
学薬学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型タンパク質に対するヒト型一本鎖抗体

(57) 【要約】

【課題】遺伝子操作により変異を入れたり、他のタンパク質を融合させたりすることが容易にでき、抗原との親和性、抗原特異性、安定性および応用性が高い、変異型E-カドヘリンに特異的に反応するヒト型一本鎖抗体、それをコードするポリヌクレオチド、及びそれらを用いた腫瘍細胞の検出方法、腫瘍細胞の検出用キットなどを提供する。

【解決手段】イムノグロブリンcDNAのVH領域とVL領域とを有する一本鎖抗体を発現するベクターを構築した。このベクターを有する第二の宿主を培養して当該宿主に一本鎖抗体を提示させ、変異型E-カドヘリンの一部からなるペプチドに反応する一本鎖抗体を提示する宿主を回収した。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

変異型 E - カドヘリンに特異的に反応し、正常型 E - カドヘリンには反応しないことを特徴とするヒト型一本鎖抗体。

## 【請求項 2】

クローン化された免疫グロブリン遺伝子をインビトロで発現させることによって得られることを特徴とする請求項 1 に記載のヒト型一本鎖抗体。

## 【請求項 3】

前記免疫グロブリン遺伝子を含む DNA を宿主に導入した後、当該宿主を培地中で培養し、その培地中に放出された当該免疫グロブリンを回収することにより得られることを特徴とする請求項 2 に記載のヒト型一本鎖抗体。 10

## 【請求項 4】

変異型 E - カドヘリンは、欠失突然変異を有する変異型 E - カドヘリン遺伝子にコードされることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のうちいずれか 1 項に記載のヒト型一本鎖抗体。

## 【請求項 5】

変異型 E - カドヘリンは、正常型 E - カドヘリン遺伝子においてエクソン 9 が欠失した変異型 E - カドヘリン遺伝子にコードされることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のうちいずれか 1 項に記載のヒト型一本鎖抗体。

## 【請求項 6】

下記の ( a ) ~ ( n ) のステップを含む方法により得られうるヒト型一本鎖抗体。 20

( a ) c DNA ライブラリーに含まれるイムノグロブリン c DNA の V H 領域の C D R 1 及び C D R 2 領域を有する断片を、前記 c DNA を鋳型として P C R 法により増幅するステップ

( b ) 前記イムノグロブリン c DNA の V H 領域の C D R 3 領域を含む断片を、前記 c DNA を鋳型として P C R 法により増幅するステップ

( c ) イムノグロブリン c DNA の V H 領域の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 領域を有する断片を、( a ) のステップにより得られた前記 C D R 1 及び C D R 2 領域を含む断片と、( b ) のステップにより得られた前記 C D R 3 領域を含む断片とを鋳型として P C R 法により増幅するステップ

( d ) ( c ) のステップにより得られたイムノグロブリン c DNA の V H 領域をベクターに組み込むステップ 30

( e ) c DNA ライブラリーのイムノグロブリン c DNA の V L 領域の C D R 1 及び C D R 2 領域を含む断片を、前記 c DNA を鋳型として P C R 法により増幅するステップ

( f ) 前記イムノグロブリン c DNA の V L 領域の C D R 3 領域を含む断片を、前記 c DNA を鋳型として P C R 法により増幅するステップ

( g ) イムノグロブリン c DNA の V L 領域の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 領域を有する断片を、( e ) のステップにより得られた前記 C D R 1 及び C D R 2 領域を含む断片と、( f ) のステップにより得られた前記 C D R 3 領域を含む断片とを鋳型として P C R 法により増幅するステップ

( h ) ( g ) のステップにより得られたイムノグロブリン c DNA の V L 領域をベクターに組み込みステップ 40

( i ) ( d ) と ( h ) のステップにより作製されたベクターをともに第一の宿主に導入して宿主内でイムノグロブリン c DNA の V H 領域と V L 領域とを融合し、イムノグロブリン c DNA の V H 領域と V L 領域とを有する一本鎖抗体を発現するベクターを構築するステップ

( j ) ( i ) のステップにより作製された一本鎖抗体発現ベクターを有する第二の宿主を培養して当該宿主に一本鎖抗体を提示させるステップ

( k ) 前記一本鎖抗体を提示する第二の宿主と、変異型 E - カドヘリンの全部または一部からなるポリペプチドとを接触させるステップ

( l ) 前記変異型 E - カドヘリンに特異的に結合した一本鎖抗体を提示する宿主を回収す 50

るステップ

(m) 前記一本鎖抗体をコードするイムノグロブリン cDNA の V H 領域と V L 領域とを有する第三の宿主を培養し、一本鎖抗体の発現を誘導するステップ

(n) 前記一本鎖抗体を回収するステップ

【請求項 7】

配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 1 ~ 5 に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列、またはそれらアミノ酸配列の一部のアミノ酸配列を有し、変異型 E - カドヘリンに特異的に反応することを特徴とするポリペプチド。

10

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 10】

以下の塩基配列からなる群から選択される塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその一部を有するポリヌクレオチドであって、当該ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドが変異型 E - カドヘリンに特異的に反応することを特徴とするポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 6 ~ 10 に示される塩基配列からなる群から選択される塩基配列

(b) 配列番号 6 ~ 10 に示される塩基配列からなる群から選択される塩基配列において、1 個若しくは数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加された塩基配列

20

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 のうちいずれか 1 項に記載の一本鎖抗体、または請求項 7 若しくは 8 に記載のポリペプチド、または請求項 9 または 10 に記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする腫瘍細胞の検出方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 6 のうちいずれか 1 項に記載の一本鎖抗体、請求項 7 若しくは 8 に記載のポリペプチド、または請求項 9 または 10 に記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする腫瘍細胞の検出用キット。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 6 のうちいずれか 1 項に記載の一本鎖抗体、請求項 7 若しくは 8 に記載のポリペプチド、または請求項 9 または 10 に記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする癌の治療剤。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト型一本鎖抗体、腫瘍細胞の検出方法、腫瘍細胞の検出用キット、癌の治療剤などに関する。

【0002】

【用語の定義】

インビトロとは、試験管内あるいは生体外を意味し、多細胞生物などの高等生物の遺伝子またはタンパク質に対しては、試験管内だけでなく、バクテリア、酵母、培養細胞、組織培養などを用いることも含まれる。

40

【0003】

変異型 E - カドヘリンとは、正常型 E - カドヘリン遺伝子中に欠失突然変異、点突然変異、あるいはフレームシフト突然変異が起こることにより生じる変異型タンパク質において、正常型 E - カドヘリンが有さないエピトープ（抗原決定基）を有する E - カドヘリンをいう。

【0004】

シャッフリングとは、ある遺伝子領域とある遺伝子領域とを領域間で交換して遺伝子の多

50

様性を生み出すことをいう。本発明においては、V H領域とV L領域を領域間で交換して一本鎖抗体遺伝子の多様性を生み出すことをいう。

【0005】

変異型E - カドヘリン活性とは、癌細胞の浸潤又は転移を促進する活性をいうが、その機構は、正常型E - カドヘリンを欠損したことによる受動的なものであっても、変異型E - カドヘリンが積極的に癌細胞の浸潤又は転移を促進する能動的なものであっても構わない。通常、前者の場合は劣性突然変異、後者の場合は優性突然変異となると考えられるが、中間遺伝を示す場合もある。従って、変異型E - カドヘリン活性を抑制する物質は、その抑制の結果、癌細胞を死滅させたり、原発巣から遊離するのを防いだり、癌細胞を組織内に侵入させることを防いだりする。

10

【0006】

【従来の技術】

ヒトの腫瘍の九割は上皮組織に由来し、悪性化が進行すると、腫瘍細胞は上皮組織の基底膜を破り周辺組織に浸潤し、リンパ節などを介して転移する。転移は悪性腫瘍の一つの指標とされており、悪性腫瘍の治癒率は良性腫瘍の治癒率に比べかなり低い。

【0007】

近年の研究により、癌の浸潤・転移においてE - カドヘリン分子が深く関わっていることが明らかにされている。E - カドヘリンは、膜貫通型の糖タンパク質であり、細胞間の接着装置adherens junction (AJ)に局在して、上皮細胞間の接着や上皮組織の維持において中心的役割を果たす接着分子である。E - カドヘリンには、細胞間接着が低下した浸潤性のヒト胃癌など多数の癌において変異が生じており、そのため、変異型E - カドヘリンを特異的に認識する抗体は、癌の診断や、抗癌抗体医薬などの開発などの癌の治療に極めて有用であると考えられる。これまで、変異型E - カドヘリンを特異的に認識する抗体として、変異型E - カドヘリンを特異的に認識するモノクローナル抗体が知られている(例えば、特許文献1及び2)。

20

【0008】

【特許文献1】

特開平10 - 127283号公報

【0009】

【特許文献2】

特開平11 - 292900号公報

30

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記モノクローナル抗体はマウス由来であり、ヒト型モノクローナル抗体を作出するのは難しい。また、一般にモノクローナル抗体は遺伝子操作により変異を入れたり、他のタンパク質を融合させたりすることが困難なため、親和性、特異性、および応用性に乏しいという問題点があった。さらに、ハイブリドーマの継代によって、生成するモノクローナル抗体の機能の低下、特に結合能の低下が生じる場合が多いことも問題であった。

【0011】

そこで、本発明は、遺伝子操作により変異を入れたり、他のタンパク質を融合させたりすることが容易にでき、抗原との親和性、抗原特異性、安定性および応用性が高い、変異型E - カドヘリンに特異的に反応するヒト型一本鎖抗体、それをコードするポリヌクレオチド、及びそれらを用いた腫瘍細胞の検出方法、腫瘍細胞の検出用キットなどを提供することを目的とする。

40

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明にかかるヒト型一本鎖抗体は、変異型E - カドヘリンに特異的に反応し、正常型E - カドヘリンには反応しないことを特徴とする。また、クローン化された免疫グロブリン遺伝子をインビトロで発現させることによって得られることを特徴としてもよい。さらに

50

、前記免疫グロブリン遺伝子を含むDNAを大腸菌に導入した後、当該大腸菌を培地中で培養し、その培地中に放出された当該免疫グロブリンを回収することにより得られることを特徴としてもよいが、宿主内から免疫グロブリンを回収することにより得られるものも本発明の範囲内である。

【0013】

前記変異型E-カドヘリンは、欠失突然変異を有する変異型E-カドヘリン遺伝子にコードされることを特徴としてもよい。また、前記変異型E-カドヘリンは、正常型E-カドヘリン遺伝子においてエクソン9が欠失した変異型E-カドヘリン遺伝子にコードされることを特徴としてもよい。

【0014】

本発明のヒト型一本鎖抗体は、下記の(a)~(n)のステップを含む方法により得られることを特徴としてもよい。

(a) cDNAライブラリーに含まれるイムノグロブリンcDNAのVH領域のCDR1及びCDR2領域を有する断片を、前記cDNAを鋳型としてPCR法により増幅するステップ

(b) 前記イムノグロブリンcDNAのVH領域のCDR3領域を含む断片を、前記cDNAを鋳型としてPCR法により増幅するステップ

(c) イムノグロブリンcDNAのVH領域のCDR1、CDR2及びCDR3領域を有する断片を、(a)のステップにより得られた前記CDR1及びCDR2領域を含む断片と、(b)のステップにより得られた前記CDR3領域を含む断片とを鋳型としてPCR

法により増幅するステップ

(d) (c)のステップにより得られたイムノグロブリンcDNAのVH領域をベクターに組み込むステップ

(e) cDNAライブラリーのイムノグロブリンcDNAのVL領域のCDR1及びCDR2領域を含む断片を、前記cDNAを鋳型としてPCR法により増幅するステップ

(f) 前記イムノグロブリンcDNAのVL領域のCDR3領域を含む断片を、前記cDNAを鋳型としてPCRにより増幅するステップ

(g) イムノグロブリンcDNAのVL領域のCDR1、CDR2及びCDR3領域を有する断片を、(e)のステップにより得られた前記CDR1及びCDR2領域を含む断片と、(f)のステップにより得られた前記CDR3領域を含む断片とを鋳型としてPCR

により増幅するステップ

(h) (g)のステップにより得られたイムノグロブリンcDNAのVL領域をベクターに組み込みステップ

(i) (d)と(h)のステップにより作製されたベクターをともに第一の宿主に導入して宿主内でイムノグロブリンcDNAのVH領域とVL領域とを融合し、イムノグロブリンcDNAのVH領域とVL領域とを有する一本鎖抗体を発現するベクターを構築するステップ

(j) (i)のステップにより作製された一本鎖抗体発現ベクターを有する第二の宿主を培養して当該宿主に一本鎖抗体を提示させるステップ

(k) 前記一本鎖抗体を提示する第二の宿主と、変異型E-カドヘリンの全部または一部からなるポリペプチドとを接触させるステップ

(l) 前記変異型E-カドヘリンに特異的に結合した一本鎖抗体を提示する宿主を回収するステップ

(m) 前記一本鎖抗体をコードするイムノグロブリンcDNAのVH領域とVL領域とを有する第三の宿主を培養し、一本鎖抗体の発現を誘導するステップ

(n) 前記一本鎖抗体を回収するステップ

【0015】

本発明にかかるポリペプチドは、配列番号1~5に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することを特徴とする。また、配列番号1~5に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸

10

20

30

40

50

が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列、またはそれらアミノ酸配列の一部のアミノ酸配列を有し、変異型 E - カドヘリンに特異的に反応することを特徴としてもよい。

【0016】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、上記ポリペプチドをコードすることを特徴とする。また、以下の塩基配列からなる群から選択される塩基配列を有するポリヌクレオチド、またはその一部を有するポリヌクレオチドであって、当該ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドが変異型 E - カドヘリンに特異的に反応することを特徴としてもよい。

(a) 配列番号 6 ~ 10 に示される塩基配列からなる群から選択される塩基配列 (b) 配列番号 6 ~ 10 に示される塩基配列からなる群から選択される塩基配列において、1 個若しくは数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加された塩基配列

10

これらのポリヌクレオチドは、2 本鎖 DNA、1 本鎖 DNA、2 本鎖 RNA、1 本鎖 RNA、のいずれであってもよい。また、1 個若しくは数個の塩基の欠失、置換、または付加などの遺伝的多型 (genetic polymorphism) をもつが、アミノ酸配列が同じポリペプチドや、もとの塩基配列がコードするタンパク質と同等の機能、例えば、変異型 E - カドヘリンに特異的に反応し、正常型 E - カドヘリンには反応しない機能をもつポリヌクレオチドも本発明の範囲内である。

【0017】

本発明にかかる腫瘍細胞の検出方法は、上記の一本鎖抗体、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドを用いることを特徴とする。

【0018】

20

また、本発明にかかる腫瘍細胞の検出用キットは、上記の一本鎖抗体、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドを含有することを特徴とする。

【0019】

本発明にかかる治療剤は、上記一本鎖抗体、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドを含有することを特徴とする。

【0020】

【発明の実施の形態】

以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd. などの標準的なプロトコル集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコルを用いる。

30

40

【0021】

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【0022】

(1) 一本鎖抗体

50

本来のイムノグロブリンは、図5に示すように、2本のL鎖（軽鎖，light chain）と2本のH鎖（重鎖，heavy chain）から構成されており、H鎖及びL鎖（鎖と鎖がある）にはそれぞれ可変領域（V領域）と定常領域（C領域）が存在する。イムノグロブリンのH鎖は4つのドメイン（VH・CH1・CH2・CH3）、L鎖は2つのドメイン（VL・CL）から構成されている。

#### 【0023】

抗原との結合はイムノグロブリンのH鎖の可変領域（VH領域）とL鎖の可変領域（VL領域）とが関係しており、本発明の一本鎖抗体とは、イムノグロブリンのVH領域とVL領域とを有する最小単位で構成されている。

#### 【0024】

VH領域は相補性を決定する部位（超可変領域；CDR）とこれらの立体構造を保持するために働いている枠組み構造領域（FR）とがモザイク状に配置された構造を有している（図6中のA）。超可変領域においては特に多くのアミノ酸配列の変異が見つかっており、この領域の多様性が、特に抗体の多様性につながっている。一方、各イムノグロブリン遺伝子において、FR3は保存性が高いことが知られている。

#### 【0025】

本発明においては、この一本鎖抗体のライブラリーを用いて、変異型E-カドヘリンに特異的に反応し、正常型E-カドヘリンには反応しない一本鎖抗体をスクリーニングして得た。

#### 【0026】

変異型E-カドヘリンとしては、正常型E-カドヘリン遺伝子において突然変異が起こり、正常型E-カドヘリンの機能が欠損したものであればどのようなものでもよいが、変異型E-カドヘリンのみを特異的に認識する抗体を作製するためには、正常型E-カドヘリンには存在しないエピトープを有した変異型E-カドヘリンが好ましい。下記の実施例では、正常型E-カドヘリン遺伝子（GenBankアクセッション番号：Z13009）においてエクソン9（1232から1414番目の塩基配列）が欠失した変異型E-カドヘリン遺伝子にコードされる変異型E-カドヘリンを用いる（図8）が、正常型E-カドヘリン遺伝子のエクソン8（1103から1231番目の塩基配列）が欠失した変異型E-カドヘリン遺伝子にコードされる変異型E-カドヘリンなどを用いることもできる。また、欠失突然変異だけでなく、点突然変異やフレームシフト突然変異によって、新たなエピトープを獲得した変異型E-カドヘリンでも構わない。

#### 【0027】

正常型E-カドヘリン遺伝子においてエクソン9が欠失した変異型E-カドヘリン遺伝子にコードされる変異型E-カドヘリンに特異的に反応し、正常型E-カドヘリンには反応しない一本鎖抗体としては、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。また、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列、またはそれらアミノ酸配列の一部のアミノ酸配列を有し、変異型E-カドヘリンに特異的に反応するが、正常型E-カドヘリンに反応しないポリペプチドも本発明の範囲に含まれる。また、上記一本鎖抗体またはポリペプチドが、タグ分子などのポリペプチドと融合したポリペプチドも本発明の範囲に含まれる。さらに、本発明の一本鎖抗体は、タグなどのマーカー分子やフルオレセンやローダミンなどの蛍光分子と結合していても良い。

#### 【0028】

##### （2）一本鎖抗体の作製方法

本発明のヒト型一本鎖抗体は、変異型E-カドヘリンに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマからイムノグロブリンcDNAをクローニングし、遺伝子組み換えによって、ヒト型一本鎖抗体を作製する方法や、ファージ提示型ヒト型一本鎖抗体ライブラリーを用いた方法や、それを改良した特願2001-358602号に記載の超レパートリー人工抗体ライブラリーを用いた方法などにより得ることができる。中でも、発現不能

10

20

30

40

50

なレパートリーの混入や抗体ライブラリーの不安定性の問題がなく、また、抗体のレパートリーが多く、さらに、短時間でヒト型一本鎖抗体を得ることができる点で超レパートリー人工抗体ライブラリーを用いた方法が最も好ましい。

【0029】

本発明のヒト型一本鎖抗体は、下記の(a)~(n)のステップにより得られることができる。

(a) cDNAライブラリーに含まれるイムノグロブリンcDNAのVH領域のCDR1及びCDR2領域を有する断片を、前記cDNAを鋳型としてPCR法により増幅するステップ

(b) 前記イムノグロブリンcDNAのVH領域のCDR3領域を含む断片を、前記cDNAを鋳型としてPCR法により増幅するステップ 10

(c) イムノグロブリンcDNAのVH領域のCDR1、CDR2及びCDR3領域を有する断片を、(a)のステップにより得られた前記CDR1及びCDR2領域を含む断片と、(b)のステップにより得られた前記CDR3領域を含む断片とを鋳型としてPCR法により増幅するステップ

(d) (c)のステップにより得られたイムノグロブリンcDNAのVH領域をベクターに組み込むステップ

(e) cDNAライブラリーのイムノグロブリンcDNAのVL領域のCDR1及びCDR2領域を含む断片を、前記cDNAを鋳型としてPCR法により増幅するステップ

(f) 前記イムノグロブリンcDNAのVL領域のCDR3領域を含む断片を、前記cDNAを鋳型としてPCRにより増幅するステップ 20

(g) イムノグロブリンcDNAのVL領域のCDR1、CDR2及びCDR3領域を有する断片を、(d)のステップにより得られた前記CDR1及びCDR2領域を含む断片と、(e)のステップにより得られた前記CDR3領域を含む断片とを鋳型としてPCRにより増幅するステップ

(h) (g)のステップにより得られたイムノグロブリンcDNAのVL領域をベクターに組み込みステップ

(i) (d)と(h)のステップにより作製されたベクターをともに第一の宿主に導入して宿主内でイムノグロブリンcDNAのVH領域とVL領域とを融合し、イムノグロブリンcDNAのVH領域とVL領域とを有する一本鎖抗体を発現するベクターを構築するステップ 30

(j) (i)のステップにより作製された一本鎖抗体発現ベクターを有する第二の宿主を培養して当該宿主に一本鎖抗体を提示させるステップ

(k) 前記一本鎖抗体を提示する第二の宿主と、変異型E-カドヘリンの全部または一部からなるポリペプチドとを接触させるステップ

(l) 前記変異型E-カドヘリンに特異的に結合した一本鎖抗体を提示する宿主を回収するステップ

(m) 前記一本鎖抗体をコードするイムノグロブリンcDNAのVH領域とVL領域とを有する第三の宿主を培養し、一本鎖抗体の発現を誘導するステップ

(n) 前記一本鎖抗体を回収するステップ 40

【0030】

上記cDNAライブラリーは、イムノグロブリンcDNAを含むcDNAから作製され、例えば脾臓cDNA、末梢血cDNA、骨髄cDNA白血球などを用いて作製される。これらのcDNAライブラリーに含まれるイムノグロブリンcDNAのVH領域またはVL領域の、CDR1及びCDR2領域を有する断片は、PCR法によって得ることができる。PCRに用いるプライマーとしては、例えば、図6中のBに示されるFWR1の一部の塩基配列からなるフォワード1プライマーと、FWR3の一部の塩基配列に相補的な塩基配列からなるリバーズ2プライマーとを用いることができる。一方、これらのcDNAライブラリーに含まれるイムノグロブリンcDNAのVH領域またはVL領域の、CDR3領域を有する断片も、同様にPCRにより得ることができる。PCRに用いるプライマー 50

としては、例えば、図6中のCに示されるFWR3の一部の塩基配列からなるフォワード2プライマーと、FWR4の一部の塩基配列に相補的な塩基配列からなるリバーシ1プライマーとを用いることができる。

#### 【0031】

また、本発明の実施の形態において、イムノグロブリンcDNAのVH領域またはVL領域は、上記作製したCDR1及びCDR2領域を有する断片と、CDR3領域を有する断片とを鋳型として、PCRにより得ることができる。PCRに用いるプライマーとしては、例えば、上記フォワード1プライマーと、リバーシ1プライマーとを用いることができる。これらの操作により、一次ライブラリー(VHライブラリーとVLライブラリー)を作製することができる。さらに多様性を増やすために、上記各断片に変異を導入する場合にはインピット突然変異導入などの公知の方法により容易に行うことができる。

10

#### 【0032】

ベクターは、発現系ベクターまたは非発現系ベクターのいずれを用いてもよいが、VHライブラリーまたはVLライブラリーを安定に存在させ、これらのレパートリーの維持を容易に行うことができる点で非発現系ベクターを用いることが好ましい。

#### 【0033】

本実施例では非発現系ベクターとして、それ単独では宿主中で発現することはできないが、リコンビナーゼCreなどの作用により、一方のベクターにおける一部の領域を、他方のベクターにおける一部の領域に置換して当該ベクターに組み込むことにより、VH領域とVL領域とを有する一本鎖抗体を宿主中で初めて発現することができるものを用いる。例えば、リコンビナーゼCreが認識するloxP配列(変異型loxPも含む)を有し、プロモーターフリーのベクターと、リコンビナーゼCreが認識するloxP配列(変異型loxPも含む)を有し、SD配列フリーのベクターとを用いることができる。

20

#### 【0034】

リコンビナーゼCreが認識するloxP配列(変異型loxPも含む)を有し、プロモーターフリーのベクターは、例えば、pSABccB-VL2(図3)、pSABccB-VL2K(図4)等である。また、リコンビナーゼCreが認識するloxP配列(変異型loxPも含む)を有し、SD配列フリーのベクターは、例えば、pSABccB-VH2(図1)、pSABccB-VH3(図2)等であってもよいが、ピューロマイシン-R発現ユニットが組み込まれたpSABccB-VH3の方が好ましい。

30

#### 【0035】

VHライブラリーが組み込まれたベクターと、VLライブラリーが組み込まれたベクターとの大腸菌等の宿主への導入はトランスフェクションやエレクトロポレーション等の公知の方法により容易に行うことができる。好ましい実施の形態としては、VHライブラリーが組み込まれたpSABccB-VL2等のベクターと、VLライブラリーが組み込まれたpSABccB-VH2等のベクターとをそれぞれ大腸菌に導入し、これらの大腸菌にファージをそれぞれ感染させて、VHライブラリーとしてのファージとVLライブラリーとしてのファージを作製し、それらを共に宿主に感染させること(多重感染ともいう)により行うことができる。これにより、VH-VLシャッフリングが行われる。また、多重感染させた宿主にリコンビナーゼCreを作用させることにより、VH領域とVL領域とを有する一本鎖抗体を宿主において発現させるようにすることができる(図7)。

40

#### 【0036】

VH領域とVL領域を有する一本鎖抗体を提示する宿主は、例えば、大腸菌、サルモネラ菌、イースト菌、動物細胞、上皮系細胞などであってもよいが、鞭毛に一本鎖抗体を提示させることができる点でサルモネラ菌が好ましい。

#### 【0037】

一本鎖抗体を提示するファージまたは細胞に接触させる変異型E-カドヘリンは、変異型E-カドヘリンまたは変異型E-カドヘリンの一部からなるペプチドであってもよい。合成や調製、扱いやすさの面から変異型E-カドヘリンの一部からなるペプチドが好ましい。抗原性を増大させるために、変異型E-カドヘリンの一部からなるペプチドを結合させ

50

たMAPレジン（多抗原性ペプチド：リジン残基が放射状に分岐した構造で1分子のMAPに8個の反応性アミノ基をもつ）や、変異型E-カドヘリンの一部からなるペプチドを結合させた巨大タンパク質KLH（Keyhole limpet hemocyanin）などがより好ましい。また、取り扱いやすくするために、変異型E-カドヘリンの一部からなるペプチドにマグネチックビーズなどを結合させることが最も好ましい。

【0038】

一本鎖抗体の単離方法としては、一本鎖抗体を提示するファージを宿主に感染させて培養したり、又は前記一本鎖抗体を提示する宿主細胞を培養したりして、一本鎖抗体の発現を誘導し、培地中に放出された一本鎖抗体を回収する方法がある。ここで、一本鎖抗体の発現を誘導する宿主としては、例えば、大腸菌、ファージ、イースト菌、サルモネラ菌など

10

【0039】

また、一本鎖抗体の単離方法としては、適切なエンハンサー/プロモーターをもつ発現ベクターに、Hisタグなどをコードするヌクレオチドタグを融合した一本鎖抗体をコードするcDNAを挿入し、このタグ付き一本鎖抗体発現ベクターを、大腸菌、ファージ、イースト菌、サルモネラ菌、動物細胞などに導入して発現させたタンパク質をタグを利用して精製する方法や、インビトロ転写系で一本鎖抗体をコードするcDNAを転写させた転写物を翻訳させて得られ、ウサギ網状赤血球抽出液、大腸菌S30抽出液、麦芽抽出液、小麦胚抽出液などを用いたタンパク質をタグを利用して精製する方法などがある。タグは、最終段階で除去し、HPLCなどで、一本鎖抗体を有するポリペプチドだけを精製して

20

【0040】

(3) 腫瘍細胞の検出方法及びキット

本発明にかかる腫瘍細胞の検出方法には、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）、蛍光抗体法などがある。

【0041】

これらの方法において、アビジン（またはストレプトアビジン）- ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体法、アビジン（またはストレプトアビジン）- ビオチン複合体法（ABC法）、及び、ペルオキシダーゼ - 抗ペルオキシダーゼ法（PAP法）など様々なシグナル増幅法と組み合わせることができる。また、単独又は他の診断薬と組み合わせて使用することも可能である。また、本発明の一本鎖抗体、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドなどにおいて、これらを検出可能にするために、放射性同位元素、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ルシフェリン等の蛍光または化学ルミネッセンス化合物、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素などを用いることができる。

30

【0042】

本発明にかかる腫瘍細胞の検出用キットは、上記の一本鎖抗体、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドなどを含み、腫瘍細胞の検出方法に必要な試薬などが組み合わされたものである。

【0043】

(4) 治療剤

上述したように、E-カドヘリンは上皮細胞間の接着や上皮組織の維持において中心的役割を果たしているが、これに対して多くの浸潤性の腫瘍細胞には変異型E-カドヘリンが発現している。この事実を利用して、本発明の一本鎖抗体、またはポリペプチドを、抗ガン抗体医薬として利用できる可能性がある。例えば、本発明の一本鎖抗体と、ジフテリアトキシンやシュードモナスなどのポリペプチド毒素などの細胞毒性ペプチドの融合物は、腫瘍細胞を標的として腫瘍細胞特異的に細胞死を起こすことができると期待される。

40

【0044】

本発明のポリヌクレオチドの場合は、発現ベクターに組み込んで、体内に導入することにより、体内で一本鎖抗体を発現させる。導入方法としては、アデノウイルス、レトロウイ

50

ルス等のウイルスベクターなどを用いたウイルス感染法が好ましいが、これに限定されない。ポリヌクレオチドにコードされた一本鎖抗体を発現する発現ベクターを動物細胞などに導入し、その細胞を体内に導入して、体内で一本鎖抗体を発現させても良い。

【0045】

ポリペプチドの場合、個体への導入方法としては、前記調製した一本鎖抗体、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドを有効成分として含む治療剤を、ヒトまたはヒト以外の脊椎動物に対し、導入対象の腫瘍細胞の近傍に直接投与するか、治療剤によっては非経口、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、又は腹腔内に投与する方法であってもよい。この場合治療剤は、使用する部位又は目的に応じて、薬理的に許容された適切な賦形剤又は基剤をさらに含有してもよい。

10

【0046】

また、前記一本鎖抗体をコードするポリヌクレオチドと、細胞毒性ペプチドをコードするポリヌクレオチドとを有するポリヌクレオチドを導入した発現ベクターをリポソームの中に入れて腫瘍細胞と融合させ、当該プラスミドを細胞内に導入させることとしてもよい。また、TransIT In Vivo Gene Delivery System (Takaraの商品名)などを用いて、インピボ・トランスフェクションを行ってもよい。この場合、治療剤を、患部に直接注射することとしてもよく、また、静脈注射することとしてもよい。インピボの細胞培養系において治療剤を細胞内へ導入する際、調製した一本鎖抗体、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドなどの治療剤を、対象の腫瘍細胞に対し、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、

20

【0047】

以下、本発明の実施例について詳細に述べる。

実施例1から実施例5では、変異型E-カドヘリンに対する抗体をスクリーニングするため、一本鎖抗体ライブラリーを作製した。

【0048】

<実施例1：VHベクターの作製>

VHベクターの作製には、基本ベクターとしてAmp<sup>r</sup>-R部分に変異導入を加えたpBLUESCRIPT IISK(-)(stratagene社製)を用いた。すなわち、AflIII-SapI部位に合成したtHP(tHP:terminator (Gene, 1994, 145:145))を含む断片を、SapI-EcoRV部位にpCANTAB5E(pharmacia社製)のP-lac(lac promoter/operator)を含む断片を、EcoRV-XhoI部位に合成したloxP及びlox5171を含む断片を、XhoI-PvuII部位にPCR法で増幅したGateway Vector Conversion System(INVITROGEN社製)のXhoI-PvuII断片[ccdBを含む断片]を、PvuII-PvuII部位に合成した6xHis、E-tag、AmberSTOP79、及びg3タンパク質を含む断片をそれぞれ挿入し、VHベクターpSABccB-VH2を作製した(図1)。また、発現効率を上げるために、上記VHベクターpSABccB-VH2のEcoRV-XhoI部位に合成したloxP、rrnB terminator、及びlox5171を含む断片を、PvuII-PvuII部位に合成した6xHis、E-tag、アンバー翻訳終了コドン(AmberSTOP codon)、g3タンパク質、tTrp terminator、及びPuro-R(puromycin 耐性遺伝子) mammalian expression unitを含む断片を挿入し、VHベクターpSABccB-VH3を作製した(図2)。

30

40

【0049】

<実施例2：VLベクターの作製>

VLベクターの作製においても、基本ベクターとしてAmp<sup>r</sup>-R部分に変異導入を加えたpBLUESCRIPT IISK(-)(stratagene社製)を用いた。す

50

なわち、A f l I I I - H i n d I I I 部位に合成した t H P 及び l o x P を含む断片を、H i n d I I I - H i n d I I I 部位に P C R 法で増幅した B A C ( S I M 2 遺伝子を含む)由来の C h l o r m a p h e n i c o l 耐性遺伝子 ( S D 配列部位は改変してある)断片 [ e C A T ( p r o m o t e r - l e s s ) を含む断片] を、H i n d I I I - S f i I に H i n d I I I - S f i I 部位に p C A N T A B 5 E ( p h a r m a c i a 社製)の H i n d I I I - S f i I 断片 [ g 3 シグナル配列を含む断片] を、S f i I - S a l I 部位に P C R 法で増幅した G a t e w a y V e c t o r C o n v e r s i o n S y s t e m の S f i I - S a l I 断片 [ c c d B を含む断片] を、S a l I - N d e I 部位に合成した l o x 5 1 7 1 を含む断片を、N d e I - P v u I 部位に p C A N T A B 5 E ( p h a r m a c i a 社製)の N d e I - P v u I 断片をそれぞれ挿入し、V L ベクター p S A B c c B - V L 2 を作製した ( 図 3 ) 。また、以下の実施例において V H ベクターと V L ベクターとが大腸菌に組み込まれているか否かを確認するために、上記 V L ベクター p S A B c c B - V L 2 の P v u I / B s p E I - A f l I I I 部位を p E T 2 4 b ( N O V A G E N E 社製)の K a n - R を含む B s p E I - A f l I I I 断片に置換した V L ベクター p S A B c c B - V L 2 K を作製した ( 図 4 ) 。

#### 【 0 0 5 0 】

< 実施例 3 : V H ライブラリーの作製 >

ヒト脾臓 c D N A 又はヒト白血球 c D N A を鋳型としてイムノグロブリン ( 抗体 ) 遺伝子を V H ・ V L 領域 ( 図 5 ) を別個に増幅し、その際、生体内にないレパートリーを合成するため、抗原認識部位 ( 超可変領域 3 : C D R 3 ) のシャッフリングを行った。ヒト末梢血 c D N A 及びヒト脾臓 c D N A を鋳型にして、以下のプライマーの組み合わせで V H 遺伝子断片の増幅を P C R で行った。

#### 【 0 0 5 1 】

C D R 1 及び C D R 2 領域を含む遺伝子断片 ( 約 2 5 0 b p ) を増幅するためのプライマーとして、配列番号 1 1 ~ 1 7 に示される < V H - F o r w a r d 1 > 、及び配列番号 1 8 又は 1 9 に示される < V H - R e v e r s e 2 > を用い、C D R 3 領域を含む遺伝子断片 ( 1 0 0 b p ) を増幅するためのプライマーとして、配列番号 2 0 又は 2 1 に示される < V H - F o r w a r d 2 > 、及び配列番号 2 2 ~ 2 7 に示される < V H - R e v e r s e 1 > を用いて P C R を行い、約 2 5 0 b p の遺伝子断片 1 4 種類と、1 0 0 b p の遺伝子断片 1 2 種類を作製した。なお、P C R 反応は、9 4 2 分間後、9 4 3 0 秒間、6 0 3 0 秒間、7 2 3 0 秒間というサイクルを 3 0 サイクル行った。上記 P C R により得られた各増幅断片を個々にアガロースゲル電気泳動し、ゲルから切り出して D N A 断片を精製した。

#### 【 0 0 5 2 】

配列番号 2 0 を用いて P C R を行った精製 D N A 断片をそれぞれ混合し V H ( F W R 3 ) F o r 1 プールを作製した。配列番号 2 1 を用いて P C R を行った精製 D N A 断片をそれぞれ混合し V H ( F W R 3 ) F o r 2 プールを作製した。配列番号 1 8 を用いて P C R を行った精製 D N A 断片をそれぞれ混合し V H ( F W R 3 ) B a c k 1 プールを作製した。配列番号 1 9 を用いて P C R を行った精製 D N A 断片をそれぞれ混合し V H ( F W R 3 ) B a c k 2 プールを作製した。

#### 【 0 0 5 3 】

上記 V H ( F W R 3 ) F o r 1 プールと V H ( F W R 3 ) B a c k 1 プール、V H ( F W R 3 ) F o r 2 プールと V H ( F W R 3 ) B a c k 2 プールをそれぞれ混合し、V H 1 プール及び V H 2 プールを作製した。かかる V H 1 プール又は V H 2 プールを鋳型とし、プライマー対 < V H - F o r w a r d 1 > と < V H - R e v e r s e 1 > ( 7 x 6 = 4 2 通り) で完全長 V H 遺伝子断片を P C R 法で増幅し、8 4 種類 ( 4 2 種類 x 2 種類のプール) の増幅産物を個々にアガロースゲル電気泳動し、ゲルから切り出して精製した。なお、P C R 反応は、プライマーをいれないで 9 4 2 分間の後、9 4 1 分間、6 3 4 分間というサイクルを 7 サイクル行った後プライマーを添加し、9 4 1 分間、5 5 3 0 秒

間、72 1分間というサイクルを10サイクル行い、その後、94 15秒間、60 30秒間、72 45秒間というサイクルを10サイクル行い、72 で7分間延長させた。

#### 【0054】

上記精製した完全長VH遺伝子断片を混合した後、制限酵素XhoI及びNcoIで二重消化し、実施例1で作製したVHベクターpSABccB-VH2(図1)又はpSABccB-VH3(図2)でXhoI及びNcoIで二重消化し挿入・連結した。かかるVHベクターを大腸菌(XL1-Blue又はXL2-Blue)に遺伝子導入し、1%のグルコース及び50µg/mlのアンピシリンを含有した寒天培地でコロニーを形成させ、VHライブラリー(10<sup>6</sup>個以上)を作製した。かかるVHライブラリーを10%のグリセロールにより回収し、-80 で凍結保存した。

10

#### 【0055】

<実施例4：VLライブラリーの作製>

次に、VLライブラリーを作製するために、実施例3の方法と同様にV 遺伝子断片を作製した。ヒト脾臓cDNA又はヒト白血球cDNAを鋳型にして、V のCDR1及びCDR2領域を含む遺伝子断片(約250bp)を増幅するためのプライマーとして、配列番号28~31に示される<V kappa - Forward 1>、及び配列番号32又は33に示される<V kappa - Reverse 2>を用い、V のCDR3領域を含む遺伝子断片(100bp)を増幅するためのプライマーとして、配列番号34又は35に示される<V kappa - Forward 2>、及び配列番号36~39に示される<V kappa - Reverse 1>を用いてPCRを行い、約250bpの遺伝子断片8種類と、100bpの遺伝子断片8種類を作製した。なお、PCR反応は、94 2分間後、94 30秒間、60 30秒間、72 30秒間というサイクルを30サイクル行った。上記PCRにより得られた各増幅断片を個々にアガロースゲル電気泳動し、ゲルから切り出してDNA断片を精製した。

20

#### 【0056】

配列番号34を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVK(FWR3)For1プールを作製した。配列番号35を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVK(FWR3)For2プールを作製した。配列番号32を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVK(FWR3)Back1プールを作製した。配列番号33を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVK(FWR3)Back2プールを作製した。

30

#### 【0057】

上記VK(FWR3)For1プールとVK(FWR3)Back1プール、VK(FWR3)For2プールとVK(FWR3)Back2プールをそれぞれ混合し、V 1プール及びV 2プールを作製した。かかるV 1プール又はV 2プールを鋳型とし、プライマー対<V kappa - Forward 1>と<V kappa - Reverse 1>(4×4=16通り)で完全長VH遺伝子断片をPCR法で増幅し、32種類(16種類×2種類のプール)の増幅産物を個々にアガロースゲル電気泳動し、ゲルから切り出して精製した。

40

#### 【0058】

また、実施例3の方法と同様にV 遺伝子断片を作製した。ヒト脾臓cDNA又はヒト白血球cDNAを鋳型にして、V のCDR1及びCDR2領域を含む遺伝子断片(約250bp)を増幅するためのプライマーとして、配列番号40~48に示される<V lambda - Forward 1>、及び配列番号49~52に示される<V lambda - Reverse 2>を用い、V のCDR3領域を含む遺伝子断片(100bp)を増幅するためのプライマーとして、配列番号53~56に示される<V lambda - Forward 2>、及び配列番号57又は58に示される<V lambda - Reverse 1>を用いてPCRを行い、約250bpの遺伝子断片36種類と、100bpの遺伝子断片8種類を作製した。なお、PCR反応は、94 2分間後、94 30秒間、60 3

50

0秒間、72 30秒間というサイクルを30サイクル行った。上記PCRにより得られた各増幅断片を個々にアガロースゲル電気泳動し、ゲルから切り出してDNA断片を精製した。

#### 【0059】

配列番号53を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVL(FWR3) For 1プールを作製した。配列番号54を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVL(FWR3) For 2プールを作製した。配列番号55を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVL(FWR3) For 3プールを作製した。配列番号56を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVL(FWR3) For 4プールを作製した。配列番号49を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVL(FWR3) Back 1プールを作製した。配列番号50を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVL(FWR3) Back 2プールを作製した。配列番号51を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVL(FWR3) Back 3プールを作製した。配列番号52を用いてPCRを行った精製DNA断片をそれぞれ混合しVL(FWR3) Back 4プールを作製した。

10

#### 【0060】

上記VL(FWR3) For 1プールとVL(FWR3) Back 1プール、VL(FWR3) For 2プールとVL(FWR3) Back 2プール、VL(FWR3) For 3プールとVL(FWR3) Back 3プール、VL(FWR3) For 4プールとVL(FWR3) Back 4プールをそれぞれ混合し、V<sub>1</sub>プール、V<sub>2</sub>プール、V<sub>3</sub>プール、V<sub>4</sub>プールを作製した。かかるV<sub>1</sub>プール、V<sub>2</sub>プール、V<sub>3</sub>プール、又はV<sub>4</sub>プールを鋳型とし、プライマー対<V<sub>1</sub> lambda - Forward 1>と<V<sub>1</sub> lambda - Reverse 1>(9×2=18通り)で完全長VH遺伝子断片をPCR法で増幅し、72種類(18種類×4種類のプール)の増幅産物を個々にアガロースゲル電気泳動し、ゲルから切り出して精製した。なお、PCR反応は、プライマーをいれないうで94 2分間の後、94 1分間、63 4分間というサイクルを7サイクル行った後プライマーを添加し、94 1分間、55 30秒間、72 1分間というサイクルを10サイクル行い、その後、94 15秒間、60 30秒間、72 45秒間というサイクルを10サイクル行い、72 で7分間伸長させた。

20

#### 【0061】

上記作製した完全長V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>遺伝子断片を混合した後、制限酵素NcoI及びSalIで二重消化し、実施例2で作製したVLベクターpSABccB-VL2(図3)又はpSABccB-VL2K(図4)をNcoI及びSalIで二重消化し挿入・連結した。かかるVHベクターを大腸菌(XL1-Blue又はXL2-Blue)に遺伝子導入し、1%のグルコースと、50μg/mlのアンピシリン又は50μg/mlのカナマイシンを含有した寒天培地でコロニーを形成させ、VLライブラリー(10<sup>5</sup>以上)を作製した。かかるVLライブラリーを10%のグリセロールにより回収し、-80 で凍結保存した。

30

#### 【0062】

<実施例5：一本鎖抗体ライブラリーの作製>

実施例3で作製したVHの大腸菌を、50μg/mlのアンピシリンを含む25mL培地に植菌し、ヘルパーファージVCSM13(STRATAGENE社製)を多重感染力価(MOI)10で感染させ一晩培養した後ファージに変換し、培養上清を調製し上清中のファージ感染力価を測定した。同様に実施例4で作製したpSABccB-VL2K由来のVLファージを用いて50μg/mlのカナマイシンを含む25mL培地に植菌し、ファージに変換した。得られたVHおよびVLファージをMOI=10で組換え用大腸菌(Cre10F：自家製)を含む25mLの培地中で共感染させ、一時間後、50μg/mlのアンピシリンと50μg/mlのカナマイシンを加え一晩培養し、組換え酵素によるVH・VLベクター間の組換えを起こさせた(図7)。50μg/mlのアンピシリンを含む1Lの新しい培地に一晩培養液全量を加え、さらにヘルパーファージVCSM13を

40

50

MOI = 10 で感染させ一晩培養し、上清中に組換えファージを得、ファージ力価を測定した。その後、組換えファージを 8 L 培養液中の大腸菌 (X L 1 B l u e ) に MOI = 0 . 5 で感染させ、一時間 37 °C で培養後、50 μg / ml のアンピシリンおよび抗体ファージ融合タンパクの発現を誘導するための IPTG を 1 mM、およびヘルパーファージ V C S M 1 3 ( MOI = 10 ) を加えてさらに 37 °C で培養した。一時間後、V C S M 1 3 感染菌 (ファージ産生菌) の選別のための 50 μg / ml のカナマイシンと、組換え抗体発現菌の選別のための 12 . 5 μg / ml のクロラムフェニコールとを加え、培養温度を 30 °C に下げ一晩培養し、培養上清を回収した。上清に 1 / 6 量の 2 . 5 M の NaCl 及び 30 % の P E G 6 0 0 0 を含む溶液を加え、抗体提示ファージを沈殿させ遠心により回収した。沈殿したファージは SM 培地に懸濁し、DMSO を 7 % になるように加え、- 80 °C で凍結保存した。

#### 【0063】

<実施例 6 : 変異型 E - カドヘリンに特異的に反応する一本鎖抗体のスクリーニング>  
本願発明者らは、ヒト遺伝子の変異情報を体系的にデータベース化して構築したソフトウェア - Mutation view ( <http://mutview.dmb.med.keio.ac.jp> ) を用いて、ヒトの浸潤性胃ガン細胞株 ( H S C 4 5 - M 2 : s i g n e t r i n g - c e l l t y p e ) で見出されている E - カドヘリン遺伝子の変異を解析した。その結果、d i f f u s e - t y p e g a s t r i c c a r c i n o m a に分類される胃癌は、浸潤性のもの ( 転移などを起こし、悪性のもの ) に限ると半分近くが E - カドヘリン遺伝子のスプライシング異常のあることがわかった。また、このスプライシング異常のほとんどがエクソン 8 あるいはエクソン 9 の欠損であることもわかった。

#### 【0064】

そこで、本願発明者らは、エクソン 9 が欠損した変異型 E - カドヘリン遺伝子に着目し、この変異型 E - カドヘリン遺伝子にコードされる変異型 E - カドヘリンを特異的に認識する一本鎖抗体を作製することを試みた。なお、抗原としては、エクソン 8 とエクソン 10 との結合部における 13 アミノ酸 ( P I F N P T T G L D F E A : 配列番号 59 ) を用いた ( 図 8 ) 。この配列は正常型 E - カドヘリンに存在しないため、得られる抗体は癌細胞特異的であることが予想された。また、抗原性を増大させるために変異型 E - カドヘリンペプチドを M A P レジンに結合して抗原として用いた ( 図 9 ) 。

#### 【0065】

以下、この抗原を用いた一本鎖抗体のスクリーニング手順 ( パニング ) についてのフローを述べることにする。

- ( 1 ) 抗原をイムノチューブに 4 μg で一晩吸着させた。
- ( 2 ) P B S ( - ) で 3 回洗浄後、2 % スキムミルク / T B S を用いてブロッキングを室温で 3 時間行った。
- ( 3 ) P B S ( - ) で 3 回洗浄して、実施例 1 ~ 5 により作製した一本鎖抗体ライブラリーを加え、室温で 3 時間反応させた。
- ( 4 ) P B S ( - ) - 0 . 0 5 % t w e e n で 10 回洗浄して、非特異的に結合しているファージを除いた。100 mM トリエチルアミンを 1 ml 加え、10 分間よく回転させて吸着しているファージをはがした。
- ( 5 ) ファージ溶液に直ぐに 1 M T r i s / H C l ( p H 7 . 4 ) を 0 . 5 ml 加えて中和した。
- ( 6 ) ファージを大腸菌 X L 1 - B l u e に 37 °C で 30 分間感染させた。アンピシリン ( 最終濃度 50 μg / ml ) を添加後、吸光度が O D 6 0 0 = 0 . 8 になるまで培養した。
- ( 7 ) ヘルパーファージを加え 37 °C で 30 分間感染させた。その後、カナマイシン ( 最終濃度 50 μg / ml ) 、 I P T G ( 最終濃度 1 mM ) を添加し、37 °C で一晩振とう培養した。
- ( 8 ) 遠心チューブに移し、20 分間遠心し ( 4 °C 、 8000 r p m ) 、培地と沈殿物に

分けた。

(9) 培地に30% PEG 6000 / 1.6M NaClを1/4量加えてミキシングを行い、2時間氷中に置き、ファージを塩析した。

(10) 30分間遠心し(4、15000rpm)、上清と沈殿物に分けた。

(11) 沈殿をSM培地で溶解した。

(12) 上記溶解ファージを1回パニング操作が終了したライブラリーとして用い、(3)からのパニング操作をさらに4回繰り返した。なお、4回目のパニング操作では、ブロッキング剤として2% スキムミルクの代わりに3% BSAを用いることにより、スキムミルクに結合するファージを除去し、確実に目的とする抗原に吸着する一本鎖抗体だけを選択するようにした。

(13) 5回目のパニング操作の(6)のステップで、ファージ感染大腸菌をLB寒天培地(50µg/mlアンピシリン入り)に塗布し、37で一晚培養した。

(14) 形成されたコロニーをランダムに50個選択し、クローン1から50の番号を付け、それぞれのクローンをLB培地3ml用いて37で培養を行った。

(15) ヘルパーファージ、IPTG(最終濃度1mM)を添加し、37一晚培養を行った。

(16) それぞれの培養液を遠心し(15000rpm, 4)、その上清を使用して以下のELISAを行った。

(17) 96穴ELISAプレートに変異型E-カドヘリンペプチドを吸着させた。

(18) オブアルブミン(1mg/ml)を用いたブロッキングを37 2時間行った。

(19) TBS-tween(0.05%)で3回洗浄し、(16)で得られた上清を一次抗体として加え、37で1時間半反応させた。

(20) TBS-tween(0.05%)で5回洗浄し、二次抗体として、マウス抗M13ファージ抗体を加え、37で1時間半反応させた。

(21) TBS-tween(0.05%)で5回洗浄し、三次抗体として、ヤギ抗マウスIgG抗体/AP(アルカリフォスファターゼ)を加え、37で1時間半反応させた。

(22) TBS-tween(0.05%)で5回洗浄後、p-ニトロフェニルフォスフェートを加え、415nmで吸光度の測定を行った。

【0066】

クローンごとに測定した吸光度をグラフ化したところ(図10)、多数のファージで高い反応が見られ、変異型E-カドヘリンに反応すると思われるファージの存在が確認された。

【0067】

<実施例7:一本鎖抗体のDNAを保持しているクローンの選択>

実施例6により変異型E-カドヘリンに反応すると思われるファージ(ファージクローン2, 10, 15, 42, 49)において、実際に組み込んだ一本鎖抗体のDNAを保持しているかどうかについて、コロニーPCRを行った。その結果、一本鎖抗体のDNAのサイズに相当する約830bp前後に単一バンドが検出された。

【0068】

なお、PCR反応は、プライマー(5'-CGTGAAAAAATTAATTAATTCGC AATTC-3'(配列番号60)および5'-ACGCGGTTCAGCGGATCCGGATA-3'(配列番号61))1µMおよびKOD-Plus(TOYOBO社)を用いて、反応時間は(94 10分)(94 45秒-55 45秒-72 1分:10サイクル)(94 30秒-60 45秒-72 1分:20サイクル)72 7分を行った。

【0069】

<実施例8:ファージクローンの抗原に対する親和性および特異性>

ファージクローンの抗原に対する親和性および特異性を調べるために、上記5種類のファージクローンと、変異型E-カドヘリンペプチドまたはスキムミルクとを用いてELISA

10

20

30

40

50

Aを行った。以下に手順を示す。

【0070】

(1) 96穴ELISAプレートに変異型E-カドヘリンペプチドまたは2%スキムミルク/TBSを吸着させた。

(2) オブアルブミン(1mg/ml)を用いたブロッキングを37℃で2時間行った。

(3) TBS-tween(0.05%)で3回洗浄し、1wellあたり10<sup>11</sup>個となるように一次抗体としての各ファージクローンを加え、37℃で1時間半反応させた。

(4) TBS-tween(0.05%)で5回洗浄後、二次抗体としてマウス抗M13ファージ/HRP(西洋わさびパーオキシダーゼ)抗体を加え、37℃で1時間半反応させた。

(5) TBS-tween(0.05%)で5回洗浄し、o-フェニレンジアミン溶液を加え、450nmで吸光度の測定を行った。

【0071】

その結果、どのクローンもスキムミルクに比べ、変異型E-カドヘリンペプチドに対して高い反応を示したが、クローン10は特に高い反応を示した(図11)。また、クローン42、49においても1wellあたりのファージ数を増加させると、変異型E-カドヘリンペプチドに対する結合能は増加した。

【0072】

<実施例9: DNA配列およびアミノ酸配列の決定>

上記5種類のファージクローン(ファージクローン2, 10, 15, 42, 49)についてDNA配列を解析したところ、全てのクローンにおいて、完全長一本鎖抗体のDNA配列を保持していた。ファージクローン10、2、15、42、及び49から得られた一本鎖抗体のDNA配列をそれぞれ配列番号6~10に示す。また、上記DNA配列をもとにアミノ酸配列を決定した。ファージクローン10、2、15、42、及び49から得られた一本鎖抗体のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1~5に示す。

【0073】

<実施例10: 一本鎖抗体の単離>

実施例8により抗原に対して最も高い反応性を示したファージクローン10から一本鎖抗体の精製を試みた。以下にその手順を示す。

(1) アンバーストップコドンを読むことのできないアンバーサプレッサーマイナスの遺伝子型をもつ大腸菌HB2151を培養した。

(2) 大腸菌HB2151にファージクローン10を37℃で30分間感染させた。

(3) LB寒天培地(50µg/mlアンピシリン入り)に塗布し、37℃で一晩培養した。

(4) コロニーをLB培地(50µg/mlアンピシリン入り)に移し、37℃で一晩培養した。

(5) 上記大腸菌3mlを300mlのLB培地に加え、吸光度がOD<sub>600</sub>=1.0になるまで培養した。

(6) IPTG(最終濃度1mM)を添加し、30℃で3時間培養した。

(7) 30分間遠心(7000rpm, 4℃)し、沈殿(大腸菌)と上清(培地)に分けた。

(8) 沈殿画分に回収された大腸菌の菌膜をソニケーターで破碎し20分間遠心(15000rpm, 4℃)を行うことにより可溶性画分と不溶性画分(Inclusion body)に分けた。

(9) 大腸菌の不溶性画分を回収した。

(10) 不溶性画分にInclusion body solubilization kit(Pierce chem. co. ltd)を添加し、溶解させた。

(11) 20分間遠心(15000, 4℃)し、沈殿と上清に分けた。

(12) 上清にジチオトレイトール(最終濃度5mM)を添加し、以下の透析を行った。

1回目: 6M 尿素 / 25mM Tris / HCl 6時間

10

20

30

40

50

2回目：4 M 尿素 / 25 mM Tris / HCl 6時間

3回目：2 M 尿素 / 25 mM Tris / HCl 6時間

4回目：25 mM Tris / HCl + 135 mM NaCl 12時間

5回目：25 mM Tris / HCl + 135 mM NaCl 12時間

(13) 20分間遠心(15000rpm, 4 )を行い、上清を回収した。

(14)  $\text{Ni}^{2+}$  - A T Aカラムに通して、10 mM イミダゾール溶液(10 mM Imidazole / 25 mM Tris / HCl)にて洗浄し、その後、40 mM イミダゾール溶液(40 mM Imidazole / 25 mM Tris / HCl)を用いて溶出をした。(15) ポリアクリルアミド電気泳動を行った。

【0074】

その結果、可溶化し再生操作を行った一本鎖抗体は、 $\text{Ni}^{2+}$  - A T Aカラムから40 mM Imidazole / 25 mM Tris / HClを用いて溶出された。

【0075】

この精製した一本鎖抗体が、変異型E - カドヘリンに対して反応性を示すかどうかを確認するためにE L I S Aを行った。以下その手順を示す。

【0076】

(1) 96穴E L I S Aプレートに変異型E - カドヘリンペプチド、3%牛血清アルブミン / T B S、2%スキムミルク / T B Sを吸着させた。

(2) オブアルブミン(1 mg / ml)によるブロッキングを37 2時間行った。

(3) T B S - t w e e n (0.05%)で3回洗浄し、精製した一本鎖抗体(100倍希釈)を一次抗体として加え、37 で1時間半反応させた。

(4) T B S - t w e e n (0.05%)で5回洗浄し、二次抗体として、マウス抗E - t a g抗体を加え、37 で1時間半反応させた。

(5) T B S - t w e e n (0.05%)で5回洗浄し、三次抗体として、ヤギ抗マウスI g G抗体 / H R Pを加え、37 で1時間半反応させた。

(6) T B S - t w e e n (0.05%)で5回洗浄し、o - フェニレンジアミン溶液を加え、450 nmで吸光度の測定を行った。

【0077】

その結果、変異型E - カドヘリンペプチドを抗原に使用したとき、B S Aあるいはスキムミルクを用いたときに比べ、高い結合が見られ、精製した一本鎖抗体は変異型E - カドヘリンペプチドに対し高い親和性を示すことが明らかになった(図12)。

【0078】

なお、(7)の沈殿(大腸菌)及び上清(培地)、(8)の可溶性画分と不溶性画分をL a e m m l i変法によるS D S - S a m p l e b u f f e rに溶解し、S D S - ポリアクリルアミド電気泳動を行い、W e s t e r n B l o t t i n gにより発現確認を行った結果、培地中にも一本鎖抗体が存在することが確認された(図13)。

【0079】

【発明の効果】

以上のように、本発明によると、遺伝子操作により変異を入れたり、他のタンパク質を融合させたりすることが容易にでき、抗原との親和性、抗原特異性、安定性および応用性が高い、変異型E - カドヘリンに特異的に反応するヒト型一本鎖抗体、それをコードするポリヌクレオチド、及びそれらの利用方法を提供することができる。

【0080】

【配列表】

10

20

30

40

## SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> SINGLE CHAIN VARIABLE FRAGMENTS AGAINST MUTANT PROTEINS

<130> C0030073

10

<160> 61

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 275

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inventor: Shimizu Nobuyoshi

Inventor: Ito Fumiaki

30

<400> 1

Met Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser

1

5

10

15

Pro Gly Glu Arg Gly Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser

40

20

25

30

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

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

10

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

20

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr  
 85 90 95

Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Val Asp  
 100 105 110

30

Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Leu Glu Gln Val  
 115 120 125

Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Arg Pro Ser Glu Thr Leu  
 130 135 140

40



His Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro  
 260 265 270

Arg Ala Ala  
 275

10

<210> 2

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

20

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

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
 20 25 30

30

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

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

40

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

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Phe Ala Asn  
 85 90 95

10

Ser Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Val  
 100 105 110

20

Asp Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Leu Glu Gln  
 115 120 125

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

30

Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Gly  
 145 150 155 160

Ala Ala Trp Asn Trp Phe Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp  
 165 170 175

40

Leu Gly Arg Thr Tyr Phe Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Thr Ser  
 180 185 190

Ser Val Lys Ser Arg Ile Ala Ile Asn Pro Asp Thr Ser Thr Asn Gln  
 195 200 205

10

Phe Ser Leu His Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 210 215 220

Phe Cys Ala Arg Asp Gly Pro Ser Gly Val Asp His Tyr Asp Tyr Trp  
 225 230 235 240

20

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

30

<210> 3

<211> 247

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

40

Met Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser

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

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

Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Trp Ile  
 145 150 155 160

10

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

20

Thr Tyr Pro Arg Asn Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Ser Ser Phe Gln Gly  
 180 185 190

Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Phe Leu Gln  
 195 200 205

30

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 210 215 220

Arg Leu Tyr Tyr Gly Asp Asp Gln Thr Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
 225 230 235 240

40

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
245

<210> 4

<211> 249

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

10

20

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

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

30

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

40

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg



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

Thr Val Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 210 215 220

10

His Arg Ala Thr Thr Gln Thr Ala Thr Arg Thr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 225 230 235 240

20

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210> 5

<211> 243

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa=Ile or Phe

40

<400> 5

Met Ala Asp Xaa Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser 10  
 20 25 30

Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro His Leu  
 35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe 20  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu 30  
 65 70 75 80

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

Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Val Asp Ile 40  
 100 105 110

Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Leu Glu Gln Val Gln  
 115 120 125

Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Met Pro Ser Gln Thr Leu Ser  
 130 135 140

10

Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Ser Ser Ala Ala  
 145 150 155 160

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
 165 170 175

20

Arg Thr Phe Tyr Arg Ser Lys Trp His Asn Glu Tyr Ala Val Ser Val  
 180 185 190

30

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 195 200 205

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

40

Ala Arg Asp Ile Asp His Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 225                                    230                                    235                                    240

Val Ser Ser

10

<210> 6

<211> 828

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

aigggccgaaa tigtattgac gcagtcacca ggcacctgt cttgtctcc aggggaaaga    60

ggcacccctc cctgcagggc cagtcagagt gttagtggca actacttagc ctggtaccag    120

cagaaaccig gccaggctcc caggctctc atctatggtc cgtccagcag ggccactggc    180

atcccagaca ggctcagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga    240

ctggagccig aagattttgc aacgtattac tgcagcagt atggtacctc accgtggacg    300

ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa gtcgacataa cttcgtataa tgtatactat    360

acgaagtat ctctcgagca ggtgcagcta cagcagtggg gcgcaggcti gttgaggcct    420

tcggagacce tctccctcac ctgcctcttc tatgatgggt ccttcagtga ttaccactgg    480

30

40

agtggatcc gccagcccc aggaagggt ctggagtga ttgggaaat caatcatagt 540  
 ggaaccacct actacagtat gtcctgaag agtcgagtc ccatacagt agacacgtcc 600  
 aagaaccaat tctccctgaa ctgaaactct gtgaccgcc cggacacggc tgtatattat 660  
 tgtgtgagag gccccgtgac tgtgactcat gattitaact tctggggcca ggaaccctg 720  
 gtcaccgtct cctcaatctc ggctccatg gccaccacc accaccacca cgcggccgca 780  
 ggtgcgccgg tgccgtatcc ggatecgtg gaaccgctg ccgcatag 828

10

20

<210> 7

<211> 750

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atggccgaaa cgacactcac gcagtcicca ggcaccctgt cttgtctcc aggggaaaga 60  
 gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt attagcaca acttcitagc ctggtaccag 120  
 cagaaacctg gccaggctcc caggctctc atctataata catccaggag ggccactggc 180  
 atcccagaca ggcticagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240  
 ctggagcctg aagattitgc agtctattat tgcaccagt ttgctaactc acctccgtgg 300

30

40

acgttcggcc aaggaccaa ggtggaaatc aaagtcgaca taacttcgta taaigtatac 360  
 tatacgaagt tatctctcga gcaggacag ctgcagcagt caggtcagg actggigaag 420  
 cctcgcaga cctctcact cactgtgcc atctccgggg acagtgtctc tagcaacggt 480  
 gctgcttggg actggttcag gcagtcacca tcgcgagccc ttgagtggtt ggggaggaca 540  
 tacttcaggt ccaagtggta ttatgattac acatctctg tgaagagtcg aatagccatc 600  
 aaccagaca catccagaa ccagttctc ctgcactga actcggtagc tcccgaggac 660  
 acggctgctt attctgtgc aagagatggg ccgtcaggag ttgaccatta tgactactgg 720  
 ggccaggaa ccttggtcac cgtctctca 750

10

20

<210> 8

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 8

atggccgaaa ttgtattgac gcagtcacca ggcacctgt cttgtctcc aggggaaaga 60  
 ggcacctct cctgcagggc cagtcagagt gtiagtggca actacttagc ctggtaccag 120  
 cagaaacctg gccaggctcc caggctctc atctatggtc cgtccagcag ggccactggc 180

40

atcccagaca gggtcagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240  
 ctggagcctg aagattttgc aacgtattac tgcagcagc atggtacctc accgtggacg 300  
 ttccggccaag ggaccaaggi ggaaatcaaa gtcgacataa ctctgtataa tgtatactat 360  
 acgaagttat ctctcgagca ggtccagctt gtacagctcg gagcagaagt aaaaaagccg 420  
 ggggagcttc tgaagatctc ctgtaagggt tciggataca gctttagcga ctactggatc 480  
 ggctgggcgc gccagatgcc cgggaaaggc ctggagtgga tggggatcac ctatcctcgg 540  
 aactctgata ccaagtacag ttctctcttc caaggccagg tcaccatctc agccgacaag 600  
 tccatcagca ccgccttctt gcagtggagc agccigaagg cctcggacac cgccatctat 660  
 tattgtcga gacgcctcta ttatggtagc gaccagaccg ccggctactg gggccagga 720  
 accctggica ccgtctctc a 741

10

20

30

<210> 9

<211> 747

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atggccgaaa ttgtaatgac acagcticca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60

40

ggcacctct cctgcagggc cagtcagagt gtiagtggca actacttagc ctggtaccag 120  
 cagaaacctg gccaggtcc caggtctctc atctatggtc cgtccagcag ggcactggc 180  
 atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac cctcagcaga 240  
 ctggagcctg aagattttgc aacgtattac tgtcagcagt atggtacctc accgtggacg 300  
 ttccgccaag ggaccaaggi ggaaatcaaa gtcgacataa ctctgtataa tgtatactat 360  
 acgaagttat ctctcgagca gatcaccctg aaggagtctg gtctctacgt ggtgaaacct 420  
 acacagacct tcacgtgac ctgcacctc tcigggttct cactcagcag tagtgaagtg 480  
 gggtgggct ggaiccgta gccccagga aaggccttgg agtggcttgt actcatttac 540  
 ggggatgata ataagcgta cagtcctct ctgaagagca ggctcacctg caccaaggac 600  
 acctccaaa accaggtggc cttacagt accaactgg acctgtgga cacagccaca 660  
 tattactgtg cacacagagc cacaacacag acagcaactc ggacgttga ctactggggc 720  
 cagggaacct tggtcacctg ctctca 747

10

20

30

<210> 10

<211> 729

<212> DNA

40

<213> Homo sapiens

<400> 10

atggccgacw tccggatgac ccagtcacca tcttccgtgt ctgcatactgt tggagacaga	60	
gtcactatca ctgtcgggc gactcagggt attagcacct ggtagcctg gtaicagcag	120	
aaaccagga aagccctca cctctcacc tacgatgctt ccaactgga aacaggggtt	180	10
ccatcgaggt tcagtggag tggatctggg acagatttta cttaacct cagcaacctg	240	
cagccagaag atagtgaat atattactgt caacagtatg atgatgtccc tctaactttc	300	
ggcggggga ccaaggtaga gatcaaagtc gacataactt cgtataatgt atactatacg	360	20
aagttatctc tcgagcaggt acagctgcag cagtcaggtc caggactggt gatgccctcg	420	
cagaccctct cactcactg tgcctctcc ggtagacagt tctctagcag cagtgctgct	480	
tggaactgga tcaggcagtc cccatcgaga ggccctgagt ggctgggaag gacattctac	540	30
aggtccaagt ggcacaatga gtagcagta tctgtgaaa gtcgaataac catcaacca	600	
gacacatcca agaaccagtt ctccctgcac ctgaactctg tgactcccga ggacacggct	660	
gtgtattact gtgcaagaga tattgatcac gcctactggg gccagggaac cctggtcacc	720	
gtctcctca	729	40

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Forward1(VH4For)

10

<400> 11

acgaagttat ctctcgagca ggtgcagctg caggagtcsg 40

20

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Forward1(VH5For)

30

<400> 12

acgaagttat ctctcgagca ggtacagctg cagcagtca 39

<210> 13

<211> 40

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:VH-Forward1(VH6For)

<400> 13

acgaagttat ctctcgagca ggtgcagcta cagcagtggg 40

10

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:VH-Forward1(VH10For)

<400> 14

acgaagttat ctctcgagga ggtgcagctg ktggagwcy 39

30

<210> 15

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Forward1(VH12For)

<400> 15

acgaagttat ctctcgagca ggtccagctk gtrgagtcig g 41

10

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Forward1(VH14For)

20

<400> 16

acgaagttat ctctcgagca grtcaccttg aaggagtcig 40

30

<210> 17

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Forward1(VH22For)

40

<400> 17

acgaagtat ctctcgagca ggtgcagctg gtgsartctg g 41

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Reverse2(VH(FWR3)Back1)

<400> 18

acagtaatay acggccgtgt cc 22

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Reverse2(VH(FWR3)Back2)

<400> 19

acagtaatac atggccrtgt cc 22

10

20

30

40

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Forward2(VH(FWR3)For1)

<400> 20

ggacacggcc gtrtattact gt 22

20

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Forward2(VH(FWR3)For2)

<400> 21

ggacayggcc atgtattact gt 22

40

<210> 22

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Reversel(VH-1R(N))

10

<400> 22

gtctagccat ggaggccgag attgaggaga crgtgaccag ggtg 44

<210> 23

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:VH-Reversel(VH-2R(N))

30

<400> 23

gtctagccat ggaggccgag attgaggaga cggtagaccag gggt 44

<210> 24

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

VH-Reverse1(VH-3R(N))

<400> 24

gtctagccat ggaggccgag attgaagaga cggtgacat tgt 43

10

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

VH-Reverse1(VH-4R(N))

<400> 25

gtctagccat ggaggccgag attgaggaga cggtgaccgt ggtcc 45

30

<210> 26

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

40

**Sequence:VH-Reverse1(VH-5R(N))**

<400> 26

gtctagccat ggaggccgag atggttgggg cggatgcact cc 42

<210> 27

10

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:VH-Reverse1(VH-6R(N))

20

<400> 27

gtctagccat ggaggccgag atsgatgggc ccttgggtgga rgc 43

<210> 28

<211> 50

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vkappa-Forward1(Vkappa-1F)

40

<400> 28

ataagaatgg cccagccggc catggccgac atccrgdtga cccagtcctc 50

<210> 29

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vkappa-Forward1(Vkappa-2F)

<400> 29

ataagaatgg cccagccggc catggccgaa attgtrwtga cccagtcctc 50

20

<210> 30

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vkappa-Forward1(Vkappa-3F)

<400> 30

ataagaatgg cccagccggc catggccgat attgtgmtga cbcagwtctc 50

40

<210> 31

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vkappa-Forward1(Vkappa-4F)

10

<400> 31

ataagaaatgg cccagccggc caiggccgaa acgacactca cgcagcttc 49

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vkappa-Reverse2(VK(FWR3)Back1)

30

<400> 32

atcytcagsy tscasncwrc tgat 24

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vkappa-Reverse2(VK(FWR3)Back2)

<400> 33

atcytcagsy tscasncwat tgat 24

10

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vkappa-Forward2(VK(FWR3)For1)

<400> 34

atcagywgnstgsarsctga rgat 24

30

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Vkappa-Forward2(VK(FWR3)For2

<400> 35

atcaatwgnstgsarsctgargat 24

10

<210> 36

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vkappa-Reverse1(VK1Back)

20

<400> 36

acgaagttaatgtcgactttgatttccaccttgggtcc 36

30

<210> 37

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vkappa-Reverse1(VK2/4Back)

40

<400> 37

acgaagtat gtcgactitg atctccasct tgggcc 36

<210> 38

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vkappa-Reverse1(VK3Back)

<400> 38

acgaagtat gtcgactitg atatccactt tgggcc 36

20

<210> 39

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vkappa-Reverse1(VK5Back)

<400> 39

acgaagtat gtcgacttta atctccagtc gtgtcc 36

40

<210> 40

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Forward1(Vlambda-1F)

10

<400> 40

ataagaatgg cccagccggc catggcccag tctgtsbtga cgcagccgcc 50

20

<210> 41

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Vlambda-Forward1(Vlambda-2F)

30

<400> 41

ataagaatgg cccagccggc catggcctcc tatgwgctga cwcagccac 49

<210> 42

<211> 50

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Forward1(Vlambda-3F)

<400> 42

ataagaaatgg cccagccggc catggcctcc tatgagctga yrcagcyacc 50

10

<210> 43

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Forward1(Vlambda-4F)

<400> 43

ataagaaatgg cccagccggc catggcccag cctgtgctga ctcaryc 47

30

<210> 44

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Forward1(Vlambda-5F)

<400> 44

ataagaatgg cccagccggc catggcccag dctgtggtga ctcaggagcc 50

10

<210> 45

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Forward1(Vlambda-6F)

<400> 45

ataagaatgg cccagccggc catggcccag ccwgkgctga ctcagccmcc 50

30

<210> 46

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Forward1(Vlambda-7F)

40

<400> 46

ataagaatgg cccagccggc catggcctcc tctgagctga stcaggascc 50

<210> 47

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vlambda-Forward1(Vlambda-8F)

<400> 47

ataagaatgg cccagccggc catggcccag tctgyyctga ytcagcct 48

<210> 48

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vlambda-Forward1(Vlambda-9F)

<400> 48

ataagaatgg cccagccggc catggccaat tttatgctga ctcagcccc 49

10

20

30

40

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vlambda-Reverse2(VL(FWR3)Back1)

<400> 49

acagtaatag tcagcctcrt c 21

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
Vlambda-Reverse2(VL(FWR3)Back2)

<400> 50

acagtaataa tcagattcat c 21

<210> 51

10

20

30

40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Reverse2(VL(FWR3)Back3)

10

<400> 51

acaatgatac tcagcctcat c 21

<210> 52

<211> 21

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Reverse2(VL(FWR3)Back4)

30

<400> 52

acagtggtag tcactctcat c 21

<210> 53

<211> 21

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Forward2(VL(FWR3)For1)

<400> 53

gaygaggctg actattactg t 21

10

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Vlambda-Forward2(VL(FWR3)For2)

<400> 54

gatgaatctg attattactg t 21

30

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

40

**Sequence:Vlambda-Forward2(VL(FWR3)For3)**

<400> 55

gatgaggctg agtatcattg t 21

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

**Sequence:Vlambda-Forward2(VL(FWR3)For4)**

<400> 56

gatgagagtg actaccactg t 21

<210> 57

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

**Sequence:Vlambda-Reverse1(VL1/2Back)**

<400> 57

10

20

30

40

acgaagtat gtcgactagg acgtsasct tgggcc 36

<210> 58

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:Vlambda-Reverse1(VL7Back)

<400> 58

acgaagtat gtcgacgagg acggtcagct ggggtgc 36

20

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 59

Pro Ile Phe Asn Pro Thr Thr Gly Leu Asp Phe Glu Ala

1

5

10

<210> 60

40

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
an artificially synthesized primer sequence

10

<400> 60

cgigaaaaaa ttattattcg caattcc 27

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
an artificially synthesized primer sequence

<400> 61

30

acgcggttcc agcggatccg gata 24

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の実施の形態において、VHベクター p S A B c c B - V H 2 の構造を示す図である。

【図 2】本発明の実施の形態において、VHベクター p S A B c c B - V H 3 の構造を示す図である。

【図 3】本発明の実施の形態において、VLベクター p S A B c c B - V L 2 の構造を示す図である。

40

【図 4】本発明の実施の形態において、VLベクター p S A B c c B - V L 2 K の構造を示す図である。

【図 5】本発明の実施の形態において、一本鎖抗体の構造を示す図である。

【図 6】本発明の実施の形態において、免疫グロブリンの可変領域 (A)、CDR 1 及び CDR 2 の領域を含む断片 (B)、CDR 3 の領域を含む断片 (C) の構造を示す図である。

【図 7】本発明の実施の形態において、VHライブラリーとVLライブラリーとのシャッフリングによる一本鎖抗体発現ベクターの作製のイメージを示す図である。

【図 8】本発明の実施の形態において、正常型 E - カドヘリンの一部の構造 (上) と、変異型 E - カドヘリンの部分ペプチドの構造 (下) とを示す図である。

50

【図9】本発明の実施の形態において、変異型E-カドヘリンペプチドをMAPレジンに結合させた抗原の構造を示す図である。

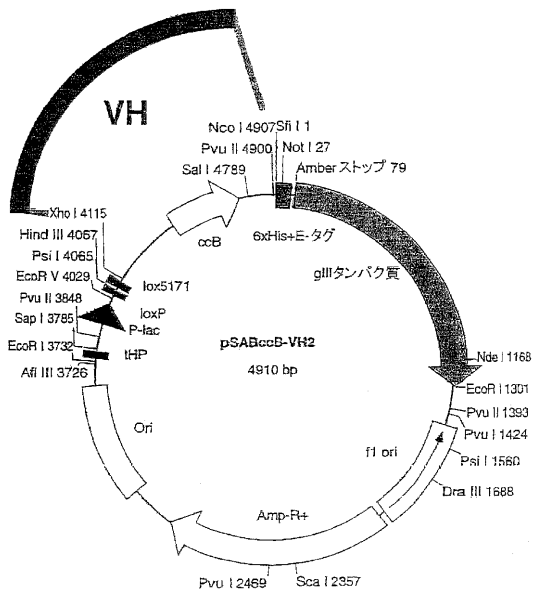
【図10】本発明の実施例6において、変異型E-カドヘリンの部分ペプチドに対する各ファージクローンの反応性をELISAにより測定した結果を示す図である。

【図11】本発明の実施例8において、変異型E-カドヘリンに反応すると思われるファージ（ファージクローン2, 10, 15, 42, 49）の抗原に対する親和性および特異性をELISAにより測定した結果を示す図である。

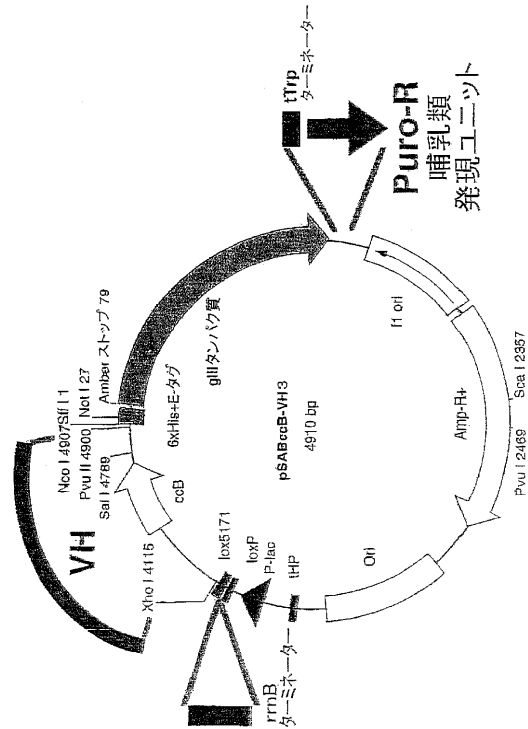
【図12】本発明の実施例10において、ファージクローン10から精製した一本鎖抗体の変異型E-カドヘリンに対する反応性をELISAにより測定した結果を示す図である。

【図13】本発明の実施例10において、Western Blottingにより発現確認を行った結果を示す図である。

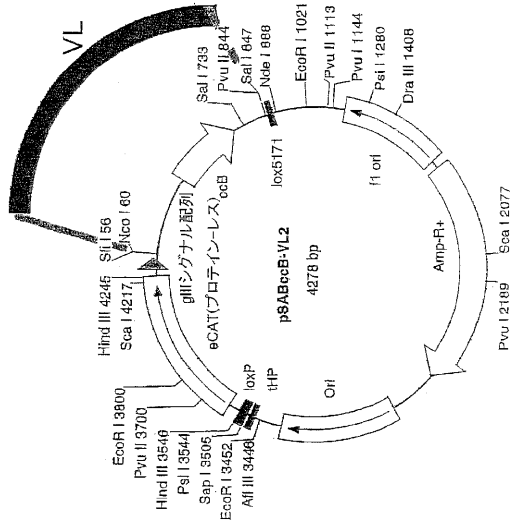
【図1】



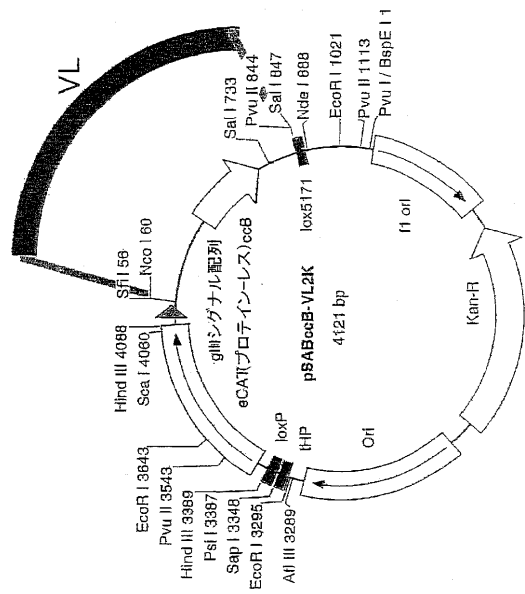
【図2】



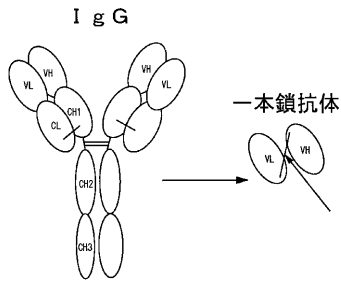
【 図 3 】



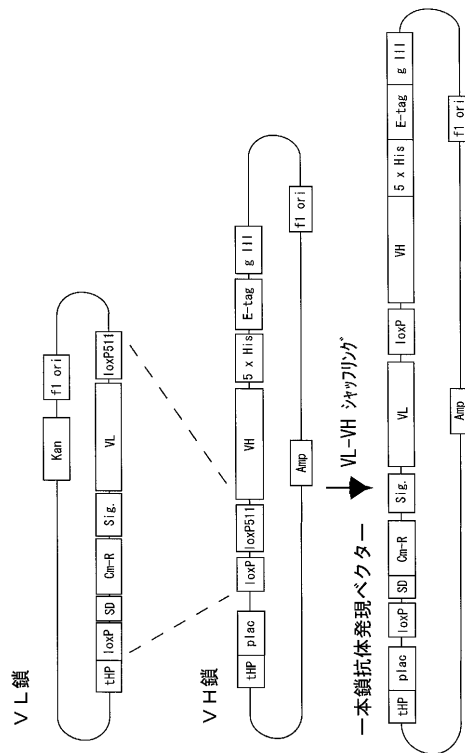
【 図 4 】



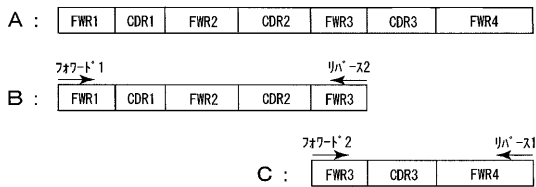
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】





## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/531	G 0 1 N 33/574	D
G 0 1 N 33/574	A 6 1 K 37/02	

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA43 CA04 HA14 HA17  
 4B063 QQ46 QR55 QS34  
 4C084 AA02 AA07 AA13 BA22 MA66 NA14 ZB26  
 4C085 AA03 AA14 BB11 CC08 CC21  
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA66 NA14 NA20 ZB26  
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 EA28 EA51

专利名称(译)	人类型突变型蛋白质单链抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004254572A</a>	公开(公告)日	2004-09-16
申请号	JP2003048181	申请日	2003-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
[标]发明人	清水信義 伊藤文昭		
发明人	清水 信義 伊藤 文昭		
IPC分类号	G01N33/531 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/574		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/00.H A61K39/395.T A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A G01N33/531.A G01N33/574.D A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00. A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QQ46 4B063 /QR55 4B063/QS34 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA22 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/CC21 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/NA20 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045 /EA28 4H045/EA51		
代理人(译)	黒川 恵		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：对突变的E-钙粘着蛋白具有特异性，它可以通过基因操作容易地突变或与另一种蛋白融合，并且对抗原，抗原特异性，稳定性和适用性具有很高的亲和力。本发明提供人反应性单链抗体，编码其的多核苷酸，使用其的肿瘤细胞的检测方法，肿瘤细胞的检测试剂盒等。构建表达具有免疫球蛋白cDNA的VH区和VL区的单链抗体的载体。培养具有该载体的第二宿主以向宿主呈递单链抗体，并回收呈递与由突变型E-钙粘蛋白的一部分组成的肽反应的呈单链抗体的宿主。

【 図 1 】

