

(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2018-507254

(P2018-507254A)

(43) 公表日 平成30年3月15日(2018.3.15)

(51) Int.Cl.

**C07K 16/42** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)

F 1

C07K 16/42  
G01N 33/53  
C12N 15/00

Z N A  
D  
A

テーマコード(参考)

4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2017-558627 (P2017-558627)  
(86) (22) 出願日 平成28年1月27日 (2016.1.27)  
(85) 翻訳文提出日 平成29年9月27日 (2017.9.27)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2016/015166  
(87) 國際公開番号 WO2016/126488  
(87) 國際公開日 平成28年8月11日 (2016.8.11)  
(31) 優先権主張番号 62/111,018  
(32) 優先日 平成27年2月2日 (2015.2.2)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 517269460  
イツー ファーマシューティカルズ,  
インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国 コロラド 80301,  
ボルダー, ノーチラス コート ノ  
ース 4909, スイート 208  
(74) 代理人 110002077  
園田・小林特許業務法人  
(72) 発明者 ホロヴィッツ, ローレンス  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 940  
27, アザートン, セルビー レーン  
362  
F ターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76  
EA50 FA74

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗代替軽鎖抗体

## (57) 【要約】

本発明は、抗代替軽鎖抗体及びそれらの使用に関する。具体的には、本発明は、抗V<sub>p</sub>r<sub>e</sub>B<sub>1</sub>抗体及びそれらの使用に関する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

代替軽鎖（S L C）に特異的に結合する単離抗体、またはその抗原結合断片。

**【請求項 2】**

前記抗体が、前記S L CのV p r e Bサブユニットに特異的に結合する、請求項1に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 3】**

前記V p r e Bサブユニットが、配列番号1のヒトV p r e B 1である、請求項2に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 4】**

前記V p r e Bサブユニットが、配列番号2または配列番号3のマウスV p r e B 2である、請求項2に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 5】**

前記V p r e Bサブユニットが、配列番号4のヒトV p r e B 3である、請求項2に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 6】**

前記抗体が、前記S L Cの 5サブユニットに特異的に結合する、請求項1に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 7】**

前記 5サブユニットが、配列番号7のヒト 5である、請求項6に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 8】**

前記 5サブユニットが、配列番号9のヒト 5 d T a i lである、請求項6に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 9】**

前記抗体が、配列番号3 6 ~ 5 1からなる群から選択される軽鎖可変領域配列を含む、請求項3に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 10】**

前記抗体が、配列番号5 2 ~ 6 7からなる群から選択される重鎖可変領域配列を含む、請求項3に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 11】**

前記抗体が、配列番号5 2 ~ 6 7からなる群から選択される重鎖可変領域配列を含む、請求項9に記載の抗体、または抗原結合断片。

**【請求項 12】**

前記抗原結合断片が、F a b、F a b 、F ( a b )<sub>2</sub>、s c F v、及び(s c F v)<sub>2</sub>断片からなる群から選択される、請求項2に記載の抗体。

**【請求項 13】**

請求項1 ~ 1 2のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片を含む、組成物。

**【請求項 14】**

診断用組成物である、請求項1 3に記載の組成物。

**【請求項 15】**

ヒト対象におけるリウマチ性関節炎の診断のための方法であって、前記対象に由来する生物試料を、ヒト代替軽鎖（S L C）に特異的に結合する抗体と接触させることと、S L Cの発現レベルを決定することと、を含む、方法。

**【請求項 16】**

異常なS L C発現に関連付けられる白血病または自己免疫疾患の診断のための方法であって、対象に由来する生物試料を、ヒト代替軽鎖（S L C）に特異的に結合する抗体と接触させることと、S L Cの発現レベルを決定することと、を含む、方法。

**【発明の詳細な説明】**

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0001】

Bリンパ球によって産生される抗体(Ig)分子は、重(H)鎖及び軽(L)鎖から作られる。H鎖及びL鎖のアミノ末端ドメインのアミノ酸配列は、特に抗原結合部位を形成する3つの超可変領域(CDR1、CDR2、CDR3)において、可変的である( $V_H$ 及び $V_L$ )。H鎖及びL鎖の組み立て物は、L鎖( $C_L$ )の定常領域と重鎖( $C_{H1}$ )の第1の定常領域との間のジスルフィド結合によって、及び $V_H$ ドメインと $V_L$ ドメインとの間の非共有的な相互作用によって安定される。

## 【0002】

ヒト及びマウス等の多くの動物において、抗体H鎖及びL鎖をコードする遺伝子は、V領域の一部をコードする遺伝子断片の段階的な体細胞再配列によって組み立てられる。Bリンパ球の発達の種々の段階は、Ig遺伝子座の再配列の状態によって特徴付けられる(例えば、Melchers, F. & Rolink, A., B-Lymphocyte Development and Biology, Paul, W. E., ed., 1999, Lippincott, Philadelphiaを参照)。

10

## 【0003】

B細胞の前駆体(プレB細胞)が、完全に成長した軽鎖の代わりにVpreB(1~3)及び5と呼ばれる一組の遺伝子のそれらの產生、ならびにμ重鎖の共発現によって、骨髄内で確認されている。

20

## 【0004】

ヒトVpreB1(CAG30495)の主要アイソフォームは、145aa長のポリペプチド(配列番号1)である。それは、IgVドメイン様構造を有するが、典型的なVドメインの最後の鎖(7)を欠き、また他のいずれのタンパク質に対しても配列相同性を示さないカルボキシル末端部を有する。VpreB2は複数のアイソフォームを有し、142-アミノ酸マウスVpreB2ポリペプチド(P13373;配列番号2)、及びマウスVpreB2配列の171アミノ酸長スプライスバリエント(CAA019641、配列番号3)が挙げられる。VpreB1及びVpreB2配列は、EP0269127及び米国特許第5,182,205号;Collins et al., Genome Biol. 5(10):R84(2004);ならびにHolliins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(14):5552-5556(1989)に開示されている。ヒトVpreB3(配列番号4)の主要アイソフォームは、123aa長のタンパク質(CAG30496)であり、Collins et al., Genome Biol. 5(10):R84(2004)に開示されている。

30

## 【0005】

VpreB(1~3)は、別のタンパク質、5に非共有的に会合される。ヒト5は、抗体軽鎖に対する強い相同性と、そのアミノ末端部に向かって、そのうちの1つがVドメインの7鎖に対する強い相同性を示す2つの機能的に別個の領域を有するIgCDドメイン様構造を持つ209-アミノ酸ポリペプチド(CAA01962;配列番号7)である。ヒト5様タンパク質は、213個のアミノ酸(NP\_064455;配列番号8)を有し、抗体軽鎖定常領域に対して約84%の配列同一性を示す。

40

## 【0006】

さらなる詳細については、以下のreview paperを参照されたい: Karasuyama et al., Adv. Immunol. 63:1-41(1996); Melchers et al., Immunology Today 14:60-68(1993);及びMelchers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2571-2573(1999)。

## 【0007】

VpreB及び5ポリペプチドは、非共有的に会合されたIg軽鎖様構造を共に形成し、これは、代替軽鎖または偽軽鎖と呼ばれる。初期のプレB細胞の表面上で、代替軽鎖

50

は、シグナル変換器 C D 7 9 a / C D 7 9 b へテロ二量体と関連して、膜結合 Ig μ 重鎖にジスルフィド連結されて、B 細胞受容体様構造、いわゆるプレ B 細胞受容体（プレ B C R ）を形成する。

#### 【0008】

Surrobody は、プレ B 細胞受容体（プレ B C R ）に基づき、これは、抗体レパートリーの正常な発達中に產生される。抗体とは異なり、プレ B C R は三量体であり、2つの代替軽鎖成分 V p r e B 及び 5 と対になった抗体重鎖から構成される。V p r e B 及び 5 はどちらも、遺伝子再配列を受けない遺伝子によってコードされ、V (D) J 組み換えが開始する前に初期のプレ B 細胞中で発現される。プレ B C R は、それが重鎖と2つの非共有的に会合されたタンパク質：V p r e B 及び 5 とから構成される、すなわち、抗体体内に2つとは対照的に3つの成分を有するという点で、成熟免疫グロブリンとは構造的に異なる。さらに、V p r e B は抗体の V Ig ドメインに相同であり、5 は C

ドメインに相同ではあるが、それらは各々、非標準的なペプチド伸長を有する。V p r e B 1 は、追加的な21個の残基をそのC末端に有し、5 は、50アミノ酸伸長をそのN末端に有する。

#### 【0009】

様 B 細胞受容体（様 B C R ）は、様代替軽鎖（様 S L C ）を利用して同定されてきた（Frances et al. , EMBO J 13 : 5937 - 43 (1994) ; Thompson et al. , Immunogenetics 48 : 305 - 11 (1998) ; Rangel et al. , J Biol Chem 280 : 17807 - 14 (2005) ）。 20

#### 【0010】

Rangel et al. , J Biol Chem 280 (18) : 17807 - 17814 (2005) は、再配列されていないV 遺伝子の産生物であるV 様タンパク質の同定及び分子的特徴付けを報告しており、それは、Thompson et al. , Immunogenetics 48 : 305 - 311 (1998) によって先に報告されたcDNA配列と同一であることが分かった。一方、Frances et al. , EMBO J 13 : 5937 - 43 (1994) は、B 細胞前駆体の表面において μ 重鎖に会合する能力を有し、それによってB 細胞の発達のための 5 経路の代替物を提供する再配列された生殖細胞系 J C K の同定及び特徴付けを報告した。 30

#### 【0011】

様及び様プレ B C R は、軽鎖の再配列を促進し、B 細胞の先祖の成熟を確実にするように協働することが提唱してきた。概要に関しては、McKeller and Martinez-Valdez Seminars in Immunology 18 : 4043 (2006) を参照されたい。

#### 【0012】

Surrobody の設計及び製造のさらなる詳細は、Xu et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008, 105 (31) : 10756 - 61 、2008年10月2日に公開されたPCT公開第WO 2008 / 118970号、2008年7月11日に出願された米国仮出願第61 / 134, 929号、及びXu et al. , J. Mol. Biol. 2010, 397, 352 - 360 に提供されており、それらの全体の開示は参考により本明細書に明白に援用される。 40

#### 【0013】

繊維状ファージに基づく組み合わせ抗体ライブラリの多様性は、重及び軽鎖遺伝子のシャッフリングによって（Kang et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 88 : 11120 - 11123, (1991) ）、またはエラープローンポリメラーゼ鎖反応（PCR）によるランダム変異のライブラリへの導入によって（Gram et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 89 : 3576 - 3580, (1992) ）増加され得ることが説明されてきた。抗体ライブラリの生成のための土台としての定義されたフレームワークの使用は、Barbas et al. , 50

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89 : 4457 - 4461 (1992) (CD3-H3のランダム化) ; Barbash et al., Gene 137 : 57 - 62 (2003) (V. sub. カッパ. CDR3へのランダム化の進展) ; 及び Hayanashi et al., Biotechniques 17 : 310 (1994) (重複伸長及びPCRによる抗体CDR領域の同時変異誘発) によって説明されてきた。他には、単一V. sub. L遺伝子とのCDR-H3ライブラリの組み合わせ (Nissim et al., EMBO J. 13 : 692 - 698 (1994))、限られたV<sub>L</sub>遺伝子の組 (De Kruif et al., J. Mol. Biol. 248 : 97 - 105 (1995))、またはV<sub>L</sub>遺伝子のランダム化レパートリー (Griffiths et al., EMBO J. 13 : 3245 - 3260 (1994)) が報告されている。10

#### 【0014】

同様に、普遍的またはランダム化された免疫グロブリン軽鎖を使用して抗体ライブラリを作り出すための方法を説明している米国特許第5,667,988号；同第6,096,551号；同第7,067,284号も参照されたい。

#### 【0015】

Knappik et al., J. Mol. Biol. 296 : 57 - 86 (2000) は、HuCAL(ヒト組み合わせ抗体ライブラリ)と指定されるヒト抗体ライブラリを設計及び構築するための異なる概念を説明している。このアプローチは、免疫応答中に頻繁に使用されるヒトV. sub. H、及びV. sub. Lサブファミリーの各々は、1つのコンセンサスフレームワークによって表され、重鎖のための7つのHuCALコンセンサス遺伝子及び軽鎖のための7つのHuCALコンセンサス遺伝子をもたらし、これらは49個の可能な組み合わせを生み出すという発見に基づく。全ての遺伝子は、コドン利用、タンパク質凝集を促進する不要な残基、及び全てのCDRに隣接する固有の一般的な制限部位を考慮して、全合成によって作製される。このアプローチは、必要に応じて、異なる抗体フォーマットに変換され得るCDRを含有するモジュラー抗体遺伝子の生成を導く。HuCAL抗体ライブラリの設計及び合成は、米国特許第6,300,064号、同第6,696,248号、同第6,706,484号、及び同第6,828,422号に説明されている。20

#### 【0016】

多様性合成抗体ライブラリの構築は、米国特許第8,131,480号に説明されている。

#### 【発明の概要】

#### 【0017】

本発明は、抗代替軽鎖(SLC)抗体及びそれらの使用に関する。

#### 【0018】

一態様では、本発明は、代替軽鎖(SLC)に特異的に結合することができる単離抗体、またはそれらの抗原結合断片を提供する。一実施形態では、本抗体、または抗原結合断片は、SLCのVpreBサブユニットに特異的に結合する。別の実施形態では、VpreBサブユニットは、配列番号1のヒトVpreB1である。1つの他の実施形態では、VpreBサブユニットは、配列番号2または配列番号3のマウスVpreB2である。また別の実施形態では、VpreBサブユニットは、配列番号4のヒトVpreB3である。別の実施形態では、本抗体、または抗原結合断片は、SLCの5サブユニットに特異的に結合する。1つの他の実施形態では、5サブユニットは、配列番号7のヒト5である。また別の実施形態では、5サブユニットは、配列番号9のヒト5dTailである。40

#### 【0019】

一実施形態では、本発明は、配列番号36～51からなる群から選択される軽鎖可変領域配列を含む抗体、または抗原結合断片を提供する。別の実施形態では、本抗体または抗原結合断片は、配列番号52～67からなる群から選択される重鎖可変領域配列を含む。50

また別の実施形態では、配列番号 3 6 ~ 5 1 からなる群から選択される軽鎖可変領域配列を含む本抗体、または抗原結合断片は、配列番号 5 2 ~ 6 7 からなる群から選択される重鎖可変領域配列をさらに含む。1つの他の実施形態では、本抗原結合断片は、F a b、F a b 、F ( a b )<sub>2</sub>、s c F v、及び(s c F v)<sub>2</sub>断片からなる群から選択される。

#### 【0020】

別の態様では、本発明は、本明細書に説明される抗体、または抗原結合断片を含有する、組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本組成物は、診断用組成物である。

#### 【0021】

1つの他の態様では、本発明は、自己免疫疾患の診断のための方法を提供する。一実施形態では、本方法は、対象におけるリウマチ性関節炎の診断のために使用される。1つの他の実施形態では、対象は、ヒト患者である。別の実施形態では、本方法は、対象に由来する生物試料を、ヒト代替軽鎖(SLC)に特異的に結合する抗体に接触させることと、SLCの発現レベルを決定することとを含む。

10

#### 【0022】

また別の態様では、本発明は、白血病の診断のための方法を提供する。一実施形態では、白血病は、異常なSLC発現に関連付けられる。別の実施形態では、本方法は、該対象に由来する生物試料を、ヒト代替軽鎖(SLC)に特異的に結合する抗体に接触させることと、SLCの発現レベルを決定することとを含む。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0023】

【図1】配列番号1のヒトV p r e B 1アミノ酸配列(天然リーダー配列に下線が施されている)、配列番号2及び3のマウスV p r e B 2配列、配列番号4のヒトV p r e B 3様配列を示し、また「三量体」における短縮されたV p r e B 1配列の配列が配列番号5として示され、ならびに配列番号6のヒトV p r e B 1アミノ酸配列(マウスIgカッパリーダーに下線が施されている)が示される。下線は、V p r e B アミノ酸配列内のリーダー配列を示す。

【図2】配列番号7のヒト5配列、配列番号8のヒト5様配列、「5 d T a i l」と指定される「三量体」における短縮された5配列の配列(配列番号9)、及びマウスIgリーダー配列を有する配列番号10のヒト5 d T a i l配列を示す。下線は、5アミノ酸配列内のリーダー配列を示す。

30

【図3】配列番号35としてのヒトV p r e B 1 ~ 5キメラアミノ酸配列(マウスIgリーダー配列に下線が施されている)を示す。

【図4A】(A)配列番号11のヒトV様ヌクレオチド配列、及びコードされるタンパク質のアミノ酸配列(A J 0 0 4 9 5 6;配列番号12)(天然リーダー配列に下線が施されている)を示し、(B)A J 0 0 4 9 5 6 V様プロトタイプ配列(配列番号12)と整列させた、各々異なる長さの伸長(配列番号13~24)を有する全Vファミリーからの可能なV様タンパク質の予測される成熟アミノ酸配列を示す。

【図4B】(A)配列番号11のヒトV様ヌクレオチド配列、及びコードされるタンパク質のアミノ酸配列(A J 0 0 4 9 5 6;配列番号12)(天然リーダー配列に下線が施されている)を示し、(B)A J 0 0 4 9 5 6 V様プロトタイプ配列(配列番号12)と整列させた、各々異なる長さの伸長(配列番号13~24)を有する全Vファミリーからの可能なV様タンパク質の予測される成熟アミノ酸配列を示す。

40

【図5A】(A)配列番号25のヒトJ Cヌクレオチド配列、及びコードされるタンパク質のアミノ酸配列(配列番号26)(予測成熟J C kタンパク質と比較したユニーク配列には二重下線が施され、潜在的リーダー切断配列には下線が施されている)を示し、(B)残りのカッパJ定常領域再配列(J 1 ~ J 5 C)(配列番号27~31)からの予測J C様アミノ酸配列を示し、(C)添付の下線が施されたマウスIgリーダー配列を有するJ C(配列番号32)、添付の下線が施されたマウスIgリーダー配列のみを有する組み換えJ C(配列番号33)、及び添付の下線が施されたマウスIgリード

50

ダー配列を有する予測される処理 J C (配列番号 3 4) を含む、J C k 操作された分泌最適化バリエントを示す。

【図 5 B】(A) 配列番号 2 5 のヒト J C ヌクレオチド配列、及びコードされるタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 2 6) (予測成熟 J C k タンパク質と比較したユニーク配列には二重下線が施され、潜在的リーダー切断配列には下線が施されている) を示し、(B) 残りのカッパ J 定常領域再配列 (J 1 ~ J 5 C) (配列番号 2 7 ~ 3 1) からの予測 J C 様アミノ酸配列を示し、(C) 添付の下線が施されたマウス Ig リーダー配列を有する J C (配列番号 3 2)、添付の下線が施されたマウス Ig リーダー配列のみを有する組み換え J C (配列番号 3 3)、及び添付の下線が施されたマウス Ig リーダー配列を有する予測される処理 J C (配列番号 3 4) を含む、J C k 操作された分泌最適化バリエントを示す。 10

【図 5 C】(A) 配列番号 2 5 のヒト J C ヌクレオチド配列、及びコードされるタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 2 6) (予測成熟 J C k タンパク質と比較したユニーク配列には二重下線が施され、潜在的リーダー切断配列には下線が施されている) を示し、(B) 残りのカッパ J 定常領域再配列 (J 1 ~ J 5 C) (配列番号 2 7 ~ 3 1) からの予測 J C 様アミノ酸配列を示し、(C) 添付の下線が施されたマウス Ig リーダー配列を有する J C (配列番号 3 2)、添付の下線が施されたマウス Ig リーダー配列のみを有する組み換え J C (配列番号 3 3)、及び添付の下線が施されたマウス Ig リーダー配列を有する予測される処理 J C (配列番号 3 4) を含む、J C k 操作された分泌最適化バリエントを示す。 20

【図 6 - 1】抗ヒト V p r e B 1 F a b タンパク質 (配列番号 3 6 ~ 5 1) の軽鎖配列を示す。

【図 6 - 2】抗ヒト V p r e B 1 F a b タンパク質 (配列番号 3 6 ~ 5 1) の軽鎖配列を示す。

【図 7】抗ヒト V p r e B 1 F a b タンパク質 (配列番号 5 2 ~ 6 7) の重鎖配列 (V H) を示す。

【図 8】抗ヒト V p r e B 1 I g G 1 (2 4 6 0 B 0 4 I g G 1) に使用される特徴付け法の概要を例証する。 20

【図 9】抗 V p r e B 1 抗体 (2 4 6 0 B 0 4 I g G 1) が、50% 血清中で HGF 結合 2 ピース Surrogate body を検出することを実証する。 30

【図 10】抗 V p r e B 1 抗体 (2 4 6 0 B 0 4 I g G 1) が、50% 血清中で HGF 結合 3 ピース Surrogate body を検出することを実証する。

【図 11】抗 V p r e B 1 抗体 (2 4 6 0 B 0 4 I g G 1) が、50% 血清中で 2 ピース Surrogate body を捕捉することを実証する。

【図 12】抗 V p r e B 1 抗体 (2 4 6 0 B 0 4 I g G 1) が、50% 血清中で 3 ピース Surrogate body を捕捉することを実証する。

【図 13】検出試薬として使用される抗 V p r e B 1 mAb (2 4 6 0 B 0 4 I g G 1) が、ヒト VL ORF を含有する Ig G に結合しないことを実証する。

【図 14】抗 V p r e B 1 mAb Is が、VL 含有 Ig G (4 4 8 C 1 2 - HC) を捕捉することができないことを実証する。 40

【図 15】抗 V p r e B 1 mAb Is が、VL 含有 Ig G (2 5 4 7 C 0 2 HC) を捕捉することができないことを実証する。

【図 16】抗 V p r e B 1 mAb Is が、VL 含有 Ig G (2 2 1 1 A 0 1 \_ N 5 6 H - HC) を捕捉することができないことを実証する。

【図 17】免疫前血清試料の PK 血清 E L I S A 結果を示す。

【図 18】5 分間 ~ 96 時間の時点にわたる SL - 5 4 1 \_ HGF SgG の PK 血清 E L I S A 結果を示す。

【図 19】168 時間 ~ 672 時間の時点にわたる SL - 5 4 1 \_ HGF SgG の PK 血清 E L I S A 結果を示す。

【図 20】5 分間 ~ 96 時間の時点にわたる SL - 6 5 6 \_ HGF SgG の PK 血清 50

E L I S A 結果を示す。

【図21】168時間～672時間の時点にわたるS L - 656—H G F S g G のP K 血清E L I S A 結果を示す。

【図22】二重特異性S u r r o b o d y のP K 特性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

#### A. 定義

別段に定義されない限り、本明細書で使用される技術及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994) は、当業者に本出願で使用される用語の多くに関する一般的な手引きを提供する。

【0025】

当業者は、本発明の実践において使用され得る、本明細書に説明されるものに類似または等価である多数の方法及び材料を認識するであろう。実際、本発明は、説明される方法及び材料にいかようにも限定されない。本発明の目的のために、以下の用語が下記に定義される。

【0026】

本出願を通して、明白に別段の定めがない限り、単数形の使用は複数形を含む。

【0027】

本出願において、明白に別段の定めがない限り、「または」の使用は「及び／または」を含む。

【0028】

さらに、「含む（incude）」、「含む（including）」、及び「含んだ（incuded）」は、限定的ではない。

【0029】

本発明の文脈において、「抗体」（Ab）という用語は、V（D）J 遺伝子組み換えに由来する古典的に組み換えられた重鎖及び同様にVJ 遺伝子組み換えに由来する古典的に組み換えられた軽鎖からの天然抗体、またはそれらの断片を指すために使用される。

【0030】

「天然抗体」は、2本の同一である軽（L）鎖及び2本の同一である重（H）鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、共有ジスルフィド結合（複数可）によって重鎖に連結され、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変動する。各重鎖及び軽鎖はまた、規則的に配置された鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一方の端部に可変ドメイン（V<sub>H</sub>）を有し、その後に多数の定常ドメインが続く。各軽鎖は、一方の端部に可変ドメイン（V<sub>L</sub>）を、またもう一方の端部に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列され、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列される。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられる。Chothia et al., J. Mol. Biol. 186: 651 (1985); Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 4592 (1985)。

【0031】

抗体鎖に関する「可変」という用語は、抗体間で配列が大きく異なり、各特定の抗体のその特定の抗原に関する結合及び特性に関与する抗体鎖の部分を指すために使用される。かかる可変性は、軽鎖及び重鎖可変ドメインの両方における超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中される。可変ドメインのより高度に保存される部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々4つのFR（それぞれFR1、FR2、FR3、及びFR4）を含み、主に - シート構成をとり、 - シ

10

20

30

40

50

ート構造を接続し、場合によりその一部を形成するループを形成する3つの超可変領域によって接続される。各鎖内の超可変領域は、FRによって近接して共に保持され、他方の鎖の超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に貢献する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 647-669ページを参照)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合には直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与等の種々のエフェクター機能を示す。

## 【0032】

10

「超可変領域」という用語は、本明細書で使用されるとき、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基を含む(すなわち、軽鎖可変ドメイン中の残基30～36(L1)、46～55(L2)、及び86～96(L3)、ならびに重鎖可変ドメイン中の30～35(H1)、47～58(H2)、及び93～101(H3); MacCallum et al., J Mol Biol. 262(5):732-45(1996))。

## 【0033】

20

「フレームワーク領域」という用語は、より相違するCDR領域の間に存在する、当該技術分野において認識される抗体可変領域の部分を指す。かかるフレームワーク領域は、典型的には、フレームワーク1～4(FR1、FR2、FR3、及びFR4)と称され、CDRが抗原結合表面を形成し得るように、重または軽鎖抗体可変領域内に見出される3つのCDRを三次元空間に保持するための骨格を提供する。

## 【0034】

30

抗体は、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて異なるクラスに割り当てられる。抗体の5つの主要なクラスIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのうちのいくつかは、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2等のサブクラス(アイソタイプ)、にさらに分類され得る。好ましい実施形態では、本発明のイムノアドヘシンの構築に使用される免疫グロブリン配列は、IgG免疫グロブリン重鎖ドメインに由来する。ヒトイムノアドヘシンに関しては、ヒトIgG1及びIgG3免疫グロブリン配列の使用が好ましい。IgG1を使用することの主な利益は、IgG1イムノアドヘシンは固定化されたタンパク質A上で効率的に精製され得るということである。しかしながら、特定のイムノアドヘシン構築に関するIg融合パートナーを選択する際には、他の構造的及び機能的特性が考慮されるべきである。例えば、IgG3ヒンジは、より長く、より柔軟であり、その結果、それはより大きい「付着因子」ドメインを格納することができ、それはIgG1に融合されるときに適切に折り畳まれないか、または機能しない場合がある。別の懸念事項は原子価であり得、IgGイムノアドヘシンは、二価ホモ二量体であり、一方IgA及びIgM等のIgサブタイプは、それぞれ基本的なIgホモ二量体ユニットの二量体または五量体構造を生じさせ得る。インビボ用途のために設計されるVEGF受容体Ig様ドメイン/免疫グロブリンキメラに関しては、Fc領域によって特定される薬物動態特性及びエフェクター機能も重要である。IgG1、IgG2、及びIgG4は全て21日間のインビボ半減期を有するが、補体系の活性化におけるそれらの相対的な潜在力は異なる。さらに、種々の免疫グロブリンは、様々な数のアロタイプのアイソタイプを有する。

40

## 【0035】

免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 及び $\mu$ と呼ばれる。

## 【0036】

50

任意の脊椎動物種からの抗体の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる明確に区別され得る2つのタイプのうちの1つに割り当てられる。本明細書における抗体軽鎖への任意の言及は、 $\kappa$ 及び $\lambda$ 軽

鎖の両方を含む。

【0037】

「抗体断片」は、全長抗体の一部分、概してその抗原結合または可変ドメインを含む。抗体断片の例としては、限定されるものではないが、F<sub>a b</sub>、F<sub>a b</sub>、F(a<sub>b</sub>)<sub>2</sub>、s<sub>c</sub>F<sub>v</sub>、及び(s<sub>c</sub>F<sub>v</sub>)<sub>2</sub>断片が挙げられる。

【0038】

本明細書で使用されるとき、「抗体結合領域」という用語は、抗原（複数可）を結合することができる免疫グロブリンまたは抗体可変領域の1つ以上の部分を指す。典型的には、抗体結合領域は、例えば、抗体軽鎖（V<sub>L</sub>）（もしくはその可変領域）、抗体重鎖（V<sub>H</sub>）（もしくはその可変領域）、重鎖F<sub>d</sub>領域、組み合わされた抗体軽鎖及び重鎖（もしくはその可変領域）、例えば、F<sub>a b</sub>、F(a<sub>b</sub>)<sub>2</sub>、単一ドメイン、もしくは一本鎖抗体（s<sub>c</sub>F<sub>v</sub>）等、または全長抗体、例えば、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4サブタイプ）、IgA1、IgA2、IgD、IgE、もしくはIgM抗体等である。10

【0039】

「エピトープ」という用語は、本明細書で使用されるとき、少なくとも約3～5個、好ましくは少なくとも約5～10個、または少なくとも約5～15個のアミノ酸、及び典型的には約500個または約1,000個以下のアミノ酸の配列を指し、これは、それ自体によってかまたはより大きい配列の一部として、かかる配列に応答して生成される抗体に結合する配列を定義する。エピトープは、それが由来する親タンパク質の部分と同一である配列を有するポリペプチドに限定されない。実際、ウイルスゲノムは、一定の変化の状態にあり、単離物間で比較的高度の変動性を示す。したがって、「エピトープ」という用語は、天然配列と同一の配列、ならびに天然配列に対する欠失、置換、及び／または挿入等の修飾を包含する。概して、かかる修飾は、保存的な性質であるが、非保存的修飾も企図される。本用語は、具体的には「ミモトープ」、すなわち、連続的な線状天然配列を同定しないか、または必ずしも天然タンパク質中に発生するわけではないが、天然タンパク質上のエピトープを機能的に模倣する配列を含む。「エピトープ」という用語は、具体的には線状及び立体配座的エピトープを含む。20

【0040】

「代替軽鎖ポリペプチド」または「SLCポリペプチド」という用語は、本明細書において、V<sub>p r e B</sub>ポリペプチド、5ポリペプチド、V<sub>λ</sub>様ポリペプチド、JCポリペプチド、またはそれらのバリエントを指すために使用される。30

【0041】

「非代替軽鎖分子」または「非SLC分子」という用語は、本明細書において、SLCポリペプチドではない分子を指すために使用される。非SLC分子は、サイトカインまたは抗体断片等のポリペプチドであってもよい。

【0042】

「V<sub>p r e B</sub>」という用語は、本明細書において広義に使用され、任意の天然配列またはバリエントV<sub>p r e B</sub>ポリペプチドを指し、具体的には、限定されるものではないが、配列番号1のヒトV<sub>p r e B</sub>1、配列番号2及び3のマウスV<sub>p r e B</sub>2、配列番号4のヒトV<sub>p r e B</sub>3様配列、配列番号5のヒトV<sub>p r e B</sub><sub>d T</sub>、配列番号6のヒトV<sub>p r e B</sub>1アミノ酸配列、ならびに翻訳後修飾によって形成されるスプライスバリエント及びバリエントを含むアイソフォーム、それらの他の哺乳類相同体、ならびにかかる天然配列ポリペプチドのバリエントを含む。（図1）40

【0043】

「5」という用語は、本明細書において広義に使用され、任意の天然配列またはバリエント5ポリペプチドを指し、具体的には、限定されるものではないが、配列番号7のヒト5、配列番号8のヒト5様タンパク質、配列番号9及び10として示されるヒト5<sub>d T</sub>、ならびに翻訳後修飾によって形成されるスプライスバリエント及びバリエントを含むそれらのアイソフォーム、それらの他の哺乳類同族体、ならびにかかる天然配列ポ50

リペプチドのバリアントを含む。（図2）

【0044】

様 Surrobody の具体的な例としては、その天然配列の断片またはバリアントを含む、V preB1、V preB2、またはV preB3配列等のV preB配列が、その天然配列の断片及びバリアントを含む 5配列に共役されたポリペプチドが挙げられる。この種類の代表的な融合は、その全体の開示が参照により本明細書に明白に援用される2008年10月2日に公開されたPCT公開第WO2008/118970号に提供される。異種リーダー配列との融合の例は、図3に例証される（配列番号35）。

【0045】

「バリアントV preBポリペプチド」及び「V preBポリペプチドのバリアント」という用語は、互換的に使用され、本明細書において、アミノ酸修飾の結果、1つ以上のアミノ酸位置において天然配列V preBポリペプチドと異なるポリペプチドと定義される。「バリアントV preBポリペプチド」は、本明細書で定義されるとき、天然抗体もしくは 軽鎖配列、またはそれらの断片とは異なる。「バリアントV preBポリペプチド」は、好ましくは、天然配列V preBポリペプチドと少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%の配列同一性を保持する。別の好ましい実施形態では、「バリアントV preBポリペプチド」は、天然抗体 または 軽鎖配列に対してそのアミノ酸配列が95%未満、または90%未満、または85%未満、または80%未満、または75%未満、または70%未満、または65%未満、または60%未満同一である。バリアントV preBポリペプチドは具体的には、限定されるものではないが、V preB配列のC末端の非Ig様ユニークテールが部分的または完全に除去されるV preBポリペプチドを含む。

【0046】

「バリアント 5ポリペプチド」及び「 5ポリペプチドのバリアント」という用語は、互換的に使用され、本明細書において、アミノ酸修飾の結果、1つ以上のアミノ酸位置において天然配列 5ポリペプチドと異なるポリペプチドと定義される。「バリアント 5ポリペプチド」は、本明細書で定義されるとき、天然抗体 もしくは 軽鎖配列、またはそれらの断片とは異なる。「バリアント 5ポリペプチド」は、好ましくは、天然配列

5ポリペプチドと少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%の配列同一性を保持する。別の好ましい実施形態では、「バリアント 5ポリペプチド」は、天然抗体 または 軽鎖配列に対してそのアミノ酸配列が95%未満、または90%未満、または85%未満、または80%未満、または75%未満、または70%未満、または65%未満、または60%同一である。バリアント 5ポリペプチドは具体的には、限定されるものではないが、 5配列のN末端のユニークテールが部分的または完全に除去される 5ポリペプチドを含む。

【0047】

「バリアントV 様ポリペプチド」及び「V 様ポリペプチドのバリアント」という用語は、互換的に使用され、本明細書において、アミノ酸修飾の結果、1つ以上のアミノ酸位置において天然配列V 様ポリペプチドと異なるポリペプチドと定義される。「バリアントV 様ポリペプチド」は、本明細書で定義されるとき、天然抗体 もしくは 軽鎖配列、またはそれらの断片とは異なる。（図4）「バリアントV 様ポリペプチド」は、好ましくは、天然配列V 様ポリペプチドと少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%の配列同一性を保持する。別の好ましい実施形態では、「バリアントV 様ポリペプチド」は、天然抗体 または 軽鎖配列に対してそのアミノ酸配列が95%未満、または90%

10

20

30

40

50

未満、または 85% 未満、または 80% 未満、または 75% 未満、または 70% 未満、または 65% 未満、または 60% 未満同一である。バリアント V 様ポリペプチドは具体的には、限定されるものではないが、V 様配列の C 末端の非 Ig 様ユニークテールが部分的または完全に除去される V 様ポリペプチドを含む。

## 【0048】

「バリアント JC ポリペプチド」及び「JC ポリペプチドのバリアント」という用語は、互換的に使用され、本明細書において、アミノ酸修飾の結果、1つ以上のアミノ酸位置において天然配列 JC ポリペプチドとは異なるポリペプチドと定義される。(図5)「バリアント JC ポリペプチド」は、本明細書で定義されるとき、天然抗体 もしくは 軽鎖配列、またはそれらの断片とは異なる。「バリアント JC ポリペプチド」は、好ましくは、天然配列 JC ポリペプチドと少なくとも約 65%、または少なくとも約 70%、または少なくとも約 75%、または少なくとも約 80%、または少なくとも約 85%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 98% の配列同一性を保持する。別の好ましい実施形態では、「バリアント JC ポリペプチド」は、天然抗体 または 軽鎖配列に対してそのアミノ酸配列が 95% 未満、または 90% 未満、または 85% 未満、または 80% 未満、または 75% 未満、または 70% 未満、または 65% 未満、または 60% 未満同一である。バリアント JC ポリペプチドは具体的には、限定されるものではないが、JC 配列の N 末端のユニークテールが部分的または完全に除去される JC ポリペプチドを含む。

10

## 【0049】

パーセントアミノ酸配列同一性は、配列比較プログラム NCBI - BLAST 2 を使用して決定され得る(Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402 (1997))。NCBI - BLAST 2 配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> からダウンロードでき、さもなくば Bethesda, MD の国立衛生研究所から入手することができる。NCBI - BLAST 2 は、複数の検索パラメータを使用し、それらの検索パラメータの全ては、例えば、unmask = yes、strand = all、expected occurrences = 10、minimum low complexity length = 15 / 5、multi-pass e-value = 0.01、constant for multi-pass = 25、dropoff for final gap ped alignment = 25、及び scoring matrix = BLOSUM62 を含む、デフォルト値に設定される。

20

30

## 【0050】

「V pre B 配列」という用語は、本明細書において、本明細書で上記に定義される通りの「V pre B」の配列またはそれらの断片を指すために使用される。

## 【0051】

「5 配列」という用語は、本明細書において、本明細書で上記に定義される通りの「5」の配列またはそれらの断片を指すために使用される。

## 【0052】

「V 様配列」という用語は、本明細書において、本明細書で上記に定義される通りの「V 様」の配列またはそれらの断片を指すために使用される。

40

## 【0053】

「JC 配列」という用語は、本明細書において、本明細書で上記に定義される通りの「JC」の配列またはそれらの断片を指すために使用される。

## 【0054】

「 様代替軽鎖」という用語は、本明細書で使用されるとき、V pre B 及び 5 タンパク質の非共有会合によって形成される二量体を指す。

## 【0055】

「 様代替軽鎖」という用語は、本明細書で使用されるとき、V 様及び JC タンパク質の非共有会合によって形成される二量体を指す。

50

## 【0056】

「様代替軽鎖配列」という用語は、本明細書で定義されるとき、本明細書で上記に定義される通りの「V p r e B 配列」及び／または「5配列」を含む任意のポリペプチド配列を意味する。本明細書で定義されるとき、「様代替軽鎖配列」とは具体的には、限定されるものではないが、配列番号1のヒトV p r e B 1配列、配列番号2及び3のマウスV p r e B 2配列、ならびに配列番号4のヒトV p r e B 3配列、配列番号5として示されるヒトV p r e B d T、ならびに配列番号6のヒトV p r e B 1アミノ酸配列、ならびに翻訳後修飾によって形成されるスプライスバリアント及びバリアントを含むそれらの種々のアイソフォーム、他の哺乳類種におけるそれらの相同体、ならびにそれらの断片及びバリアントを含む。「様代替軽鎖配列」という用語はさらに、限定されるものではないが、配列番号7のヒト5配列、配列番号8のヒト5様配列、配列番号9として示されるヒト5d T a i 1、配列番号10のヒト5d T a i 1配列、ならびに翻訳後修飾によって形成されるスプライスバリアント及びバリアントを含むそれらのアイソフォーム、他の哺乳類種におけるそれらの相同体、ならびにそれらの断片及びバリアントを含む。「様代替軽鎖配列」という用語はさらに、本明細書で上記に定義される通りのV p r e B及び5配列の両方を含む配列を含む。

10

## 【0057】

「様代替軽鎖配列」という用語は、本明細書で定義されるとき、本明細書で上記に定義される通りの「V 様配列」及び／または「J C」を含む任意のポリペプチド配列を意味する。本明細書で定義されるとき、「様代替軽鎖配列」という用語は具体的には、限定されるものではないが、配列番号12～24のいずれかのヒトV 様配列、ならびに翻訳後修飾によって形成されるスプライスバリアント及びバリアントを含むそれらの種々のアイソフォーム、他の哺乳類種におけるそれらの相同体、ならびにそれらの断片及びバリアントを含む。「様代替軽鎖配列」という用語は、限定されるものではないが、配列番号12～24のいずれかのヒトV 様配列、配列番号25～35のいずれかのヒトJ C配列、ならびに翻訳後修飾によって形成されるスプライスバリアント及びバリアントを含むそれらのアイソフォーム、他の哺乳類種におけるそれらの相同体、ならびにそれらの断片及びバリアントをさらに含む。「様代替軽鎖配列」という用語は、本明細書で上記に定義される通りのV 様及びJ C 配列の両方を含む配列をさらに含む。

20

## 【0058】

30

「代替軽鎖構築物」という用語は、広義に使用され、異種アミノ酸配列、核酸、及び代替軽鎖配列に共役される他の分子を含む、任意の及び全ての追加的な異種成分を含み、「共役」は下記に定義される。

## 【0059】

40

「代替軽鎖構築物」は、本明細書において、「S u r r o b o d y（商標）」、または「S u r r o b o d y」とも呼ばれ、この2つの用語は互換的に使用される。特定のS u r r o b o d y（商標） 様代替軽鎖構築物は、X u e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 2 0 0 8 , 1 0 5 ( 3 1 ) : 1 0 7 5 6 - 6 1 、及び2 0 0 8 年 1 0 月 2 日に公開されたP C T 公開 W O 2 0 0 8 / 1 1 8 9 7 0 に開示されている。同様に、それらの全体の開示が参照により本明細書に明白に援用される、米国特許公開第 2 0 1 0 / 0 0 6 2 9 5 0 号、及び X u e t a l . , J . M o l . B i o l . 2 0 1 0 , 3 9 7 , 3 5 2 - 3 6 0 に説明される 様代替軽鎖構築物も企図される。

## 【0060】

50

本発明のポリペプチドの文脈において、第1のアミノ酸配列に関する「異種アミノ酸配列」という用語は、第1のアミノ酸配列に自然に会合されず、本明細書における代替軽鎖構築物中に存在する形態では少なくともないアミノ酸配列を指すために使用される。したがって、V p r e B、5、V 様、またはJ C に関する「異種アミノ酸配列」は、その天然環境において天然V p r e B、5、V 様、またはJ C に会合されない任意のアミノ酸配列である。これらとしては、限定されるものではないが、i) V p r e Bと共に、発達途中のB細胞上に代替軽鎖を形成する 5配列とは異なる 5配列、例えば、短

縮された及び／または誘導体化された V 配列等のアミノ酸配列バリエント、 i i ) V と共に、発達中の B 細胞上に代替軽鎖を形成する V p r e B 配列とは異なる V p r e B 配列、例えば、短縮された及び／または誘導体化された V p r e B 配列等のアミノ酸配列バリエント、 i i i ) J C と共に、発達途中の B 細胞上に 様代替軽鎖を形成する V 様配列とは異なる V 様配列、例えば、短縮された及び／または誘導体化された V 様配列等のアミノ酸配列バリエント、及び i v ) V 様と共に、発達途中の B 細胞上に 様代替軽鎖を形成する J C 配列とは異なる J C 配列、例えば、短縮された及び／または誘導体化された J C 配列等のアミノ酸配列バリエントが挙げられる。

## 【0061】

V p r e B または V に関する「異種アミノ酸配列」はまた、それらの天然環境においては V p r e B 及び V 配列は互いに共有的に会合されない、例えば、融合されないため、天然配列 V p r e B または V を含む対応する V p r e B または V に共有的に会合される、例えば、融合される、V p r e B または V 配列も含む。同様に、V 様または J C に関する「異種アミノ酸配列」もまた、それらの天然環境においては V 様または J C 配列は互いに共有的に会合されない、例えば、融合されないため、天然配列 V 様または J C を含む対応する V 様または J C に共有的に会合される、例えば、融合される、V 様または J C 配列を含む。異種アミノ酸配列はまた、限定されるものではないが、例えば、抗体軽及び重可変領域配列ならびに抗体軽及び重鎖定常領域配列等の、抗体及び重鎖配列ならびにそれらの断片を含む抗体配列を含む。

## 【0062】

「共役する」、「共役される」、及び「共役」という用語は、共有または非共有結合の任意の及び全ての形態を指し、限定されるものではないが、直接遺伝子融合または化学融合、リンカーまたは架橋剤によるカップリング、及び例えば、ファンデルワールス力を介した、またはロイジンジッパーの使用による非共有会合が挙げられる。

## 【0063】

「可撓性リンカー」という用語は、本明細書において、その化学構造に基づいて、その意図される文脈及び環境内で三次元空間内に固定されることが予測されない任意のリンカーを指すために使用される。

## 【0064】

「融合」という用語は、本明細書において、1本のポリペプチド鎖内の異なる起源のアミノ酸配列の、それらをコードするヌクレオチド配列をインフレームで組み合わせることによる組み合わせを指すために使用される。「融合」という用語は、内部融合、すなわち、その末端のうちの1つとの融合に加えて、ポリペプチド鎖内の異なる起源の配列の挿入を明白に包含する。

## 【0065】

本明細書で使用されるとき、「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は全て、共有的な「ペプチド結合」によって連結されるアミノ酸の一次配列を指す。ペプチドは概して、数個のアミノ酸、典型的には約2～約50個のアミノ酸からなり、タンパク質よりも短い。「ポリペプチド」という用語は、本明細書で定義されるとき、ペプチド及びタンパク質を包含する。

## 【0066】

「アミノ酸」または「アミノ酸残基」という用語は、典型的には、当該技術分野において認識される定義を有するアミノ酸、例えば、アラニン(Ala)、アルギニン(Arg)、アスパラギン(Asn)、アスパラギン酸(Asp)、システイン(Cys)、グルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu)、グリシン(Gly)、ヒスチジン(His)、イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、リシン(Lys)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、プロリン(Pro)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)、トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)、及びバリン(Val)からなる群から選択されるアミノ酸を指すが、但し、修飾アミノ酸、合成アミノ酸、または希アミノ酸が所望通りに使用されてもよい。したがって、37 CFR 1.822(

10

20

30

40

50

b) (4) に列挙される修飾された及び通常ではないアミノ酸は、本定義に具体的に含まれ、参照により本明細書に明白に援用される。アミノ酸は、種々の亜群に下位分類され得る。したがって、アミノ酸は、非極性側鎖（例えば、Ala、Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Val）、負荷電側鎖（例えば、Asp、Glu）、正荷電側鎖（例えば、Arg、His、Lys）、または非荷電の極性側鎖（例えば、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、及びTyr）を有するものとして分類され得る。アミノ酸はまた、小アミノ酸（Gly、Ala）、求核性アミノ酸（Ser、His、Thr、Cys）、疎水性アミノ酸（Val、Leu、Ile、Met、Pro）、芳香族アミノ酸（Phe、Tyr、Trp、Asp、Glu）、アミド（Asp、Glu）及び塩基性アミノ酸（Lys、Arg）としても分けられ得る。

10

#### 【0067】

「ポリヌクレオチド（複数可）」という用語は、DNA分子及びRNA分子等の核酸、ならびにそれらの類似体（例えば、ヌクレオチド類似体を使用して、または核酸化学を使用して生成されるDNAまたはRNA）を指す。所望通り、ポリヌクレオチドは、合成的に、例えば、当該技術分野において認識される核酸化学を使用して、または酵素的に、例えば、ポリメラーゼを使用して作製されてもよく、また所望により修飾されてもよい。典型的な修飾としては、メチル化、ビオチン化、及び他の当該技術分野において既知である修飾が挙げられる。それに加えて、核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得、また所望により、検出可能な部分に連結され得る。

20

#### 【0068】

参考ポリペプチドに関する「バリエント」という用語は、天然ポリペプチドと比較して少なくとも1つのアミノ酸変異または修飾（すなわち、改変）を有するポリペプチドを指す。「アミノ酸修飾」によって生成されるバリエントは、例えば、天然アミノ酸配列内の少なくとも1つのアミノ酸を置換、欠失、挿入、及び／または化学修飾することによって產生され得る。

#### 【0069】

「アミノ酸修飾」は、所定のアミノ酸配列のアミノ酸配列内の変化を指す。例示的な修飾としては、アミノ酸置換、挿入、及び／または欠失が挙げられる。

30

#### 【0070】

特定の位置「におけるアミノ酸修飾」は、その特定の残基の置換もしくは欠失、またはその特定の残基に隣接する少なくとも1つのアミノ酸残基の挿入を指す。特定の残基に「隣接する」挿入とは、その1～2つの残基内の挿入を意味する。挿入は、N末端またはC末端から特定の残基まであってもよい。

#### 【0071】

「アミノ酸置換」は、所定のアミノ酸配列内の少なくとも1つの既存のアミノ酸残基を、別の異なる「置き換え」アミノ酸残基で置き換えることを指す。置き換え残基または残基は、「自然に存在するアミノ酸残基」（すなわち、遺伝コードによってコードされる）であってもよく、アラニン（Ala）、アルギニン（Arg）、アスパラギン（Asn）、アスパラギン酸（Asp）、システイン（Cys）、グルタミン（Gln）、グルタミン酸（Glu）、グリシン（Gly）、ヒスチジン（His）、イソロイシン（Ile）、ロイシン（Leu）、リシン（Lys）、メチオニン（Met）、フェニルアラニン（Phe）、プロリン（Pro）、セリン（Ser）、トレオニン（Thr）、トリプトファン（Trp）、チロシン（Tyr）、及びバリン（Val）からなる群から選択されてもよい。1つ以上の自然に存在しないアミノ酸残基による置換もまた、本明細書におけるアミノ酸置換の定義によって包含される。

40

#### 【0072】

「自然に存在しないアミノ酸残基」は、上記に列挙される自然に存在するアミノ酸残基以外の残基を指し、それらは、ポリペプチド鎖内の隣接するアミノ酸残基（複数可）と共に結合し得る。自然に存在しないアミノ酸残基の例としては、ノルロイシン、オルニ

50

チン、ノルバリン、ホモセリン、及び Elman et al. Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991) に説明されるもの等の他のアミノ酸残基類似体が挙げられる。かかる自然に存在しないアミノ酸残基を生成するために、Noren et al. Science 244: 182 (1989) 及び Elman et al. (上記参照) の手順が使用され得る。手短に述べると、これらの手順は、サブレッサー tRNA を自然に存在しないアミノ酸残基によって化学的に活性化させた後、RNA をインビトロで転写及び翻訳することを含む。

## 【0073】

「アミノ酸挿入」は、所定のアミノ酸配列内への少なくとも 1 つのアミノ酸の組み込みを指す。挿入は通常、1 または 2 つのアミノ酸残基の挿入からなるが、本出願は、例えば、約 3 ~ 約 5 個またはさらには最大で約 10 個のアミノ酸残基の挿入等の、より大きい「ペプチド挿入」を企図する。挿入される残基（複数可）は、上記に開示される通り、自然に存在してもよく、または自然に存在しなくてもよい。

10

## 【0074】

「アミノ酸欠失」は、所定のアミノ酸配列からの少なくとも 1 つのアミノ酸残基の除去を指す。

## 【0075】

「変異誘発」という用語は、別段に特定されない限り、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を改変するための任意の当該技術分野において認識される技術を指す。好みしい種類の変異誘発としては、エラーブローン PCR 変異誘発、飽和変異誘発、または他の部位特異的飽和誘発が挙げられる。

20

## 【0076】

「部位特異的変異誘発」は、当該技術分野における技術標準であり、限定されたミスマッチ以外を除いて変異誘発される一本鎖ファージ DNA に相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用して行われ、所望の変異を表す。手短に述べると、合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用して、一本鎖ファージ DNA に相補的な鎖の合成を方向付け、結果として得られる二本鎖 DNA をファージ支持宿主細菌に形質転換する。形質転換された細菌の培養物を上層寒天に塗り、ファージを含む単一細胞からのプラーク形成を可能にする。理論上、新たなプラークの 50 % が、一本鎖として変異形態を有するファージを含有し、50 % が元の配列を有する。関心のプラークは、完全にマッチしたハイブリダイゼーションを可能にするが、元の鎖とのミスマッチがハイブリダイゼーションを防止するのに十分である温度で、キナーゼされた合成プライマーとハイブリダイズすることによって選択される。次に、プローブとハイブリダイズするプラークが選択され、配列決定され、培養され、DNA が回収される。

30

## 【0077】

「ベクター」という用語は、細胞内で自己複製が可能であり、例えば、遺伝子またはポリヌクレオチド等の DNA セグメントが、付着されたセグメントの複製を引き起こすように、作動的に連結され得る rDNA 分子を指すために使用される。本明細書において、1 つ以上のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を方向付けることができるベクターは「発現ベクター」と称される。「制御配列」という用語は、特定の宿主生物内の作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な DNA 配列を指す。原核生物に好適な制御配列としては、例えば、プロモーター、任意にオペレーター配列、及びリボソーム結合部位が挙げられる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用することが知られている。ベクターは、追加的な DNA セグメントがライゲートされ得る環状の二本鎖 DNA ループを指す「プラスミド」であってもよい。ベクターは、追加的な DNA セグメントがウイルスゲノムにライゲートされ得るファージベクターまたはウイルスベクターであってもよい。好適なベクターは、例えば、細菌起源を有する細菌ベクターまたは複製及びエピソーム哺乳類ベクター等、それらが導入される宿主細胞内で自己複製することができる。ベクターは、宿主細胞への導入に際して、例えば、非エピソーム哺乳類ベクター等の宿主細胞ゲノムに統合され、宿主ゲノムと共に複製されてもよい。

40

50

## 【0078】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれる場合に、「作動可能に連結される」。例えば、プレ配列もしくは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関するプレタンパク質として発現される場合、そのポリペプチドのDNAに作動可能に連結されており、プロモーターもしくはエンハンサーは、コード配列の転写に影響を及ぼす場合、その配列に作動可能に連結されており、またはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように位置付けられる場合、コード配列に作動可能に連結されている。概して、「作動可能に連結された」は、連結されているDNA配列が隣接していることを意味し、分泌リーダーの場合には、隣接しており、かつ読み取りフェーズにあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、隣接していないてもよい。連結は、好都合な制限部位におけるライゲーションによって達成される。かかる部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の実践に従って使用される。

10

## 【0079】

「ファージディスプレイライプラリ」は、クローン化されたタンパク質配列の収集物をファージコートタンパク質との融合体として発現するタンパク質発現ライプラリである。したがって、「ファージディスプレイライプラリ」という語句は、本明細書において、ファージが外来性（典型的には非相同）のタンパク質を発現するファージ（例えば、纖維状ファージ）の収集物指す。外来性タンパク質は、ファージが接触される他の部分と自由に相互作用（結合）する。外来性タンパク質をディスプレイする各ファージは、ファージディスプレイライプラリの「メンバー」である。

20

## 【0080】

「纖維状ファージ」という用語は、その表面上に異種ポリペプチドをディスプレイすることができるウイルス粒子を指し、限定されるものではないが、f1、fd、Pf1、及びM13が挙げられる。纖維状ファージは、テトラサイクリン（例えば、「fd-tet」）等の選択可能なマーカーを含有してもよい。種々の纖維状ファージディスプレイシステムが、当業者に周知である（例えば、Zacher et al. Gene 9: 127-140 (1980), Smith et al. Science 228: 1315-1317 (1985)；及びParmley and Smith Gene 73: 305-318 (1988)を参照）。

30

## 【0081】

「パンニング」という用語は、標的に対する高い親和性及び特性を有する、抗体等の化合物を担持するファージの同定及び単離における複数回のスクリーニングプロセスを指すために使用される。

## 【0082】

「宿主細胞」は、本明細書に説明される分子をコードする核酸を含有する核酸（複数可）及び／またはベクター（複数可）の形質転換の受容者であり得るか、または受容者となっている、個々の細胞または細胞培養物を含む。本発明の方法において、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、またはヒト胚腎臓（HEK）293細胞等の真核細胞であり得る。他の好適な宿主細胞は、当業者に既知である。

40

## 【0083】

## B. 詳細な説明

本発明の方法を実施するための技術は、当該技術分野において周知であり、例えば、Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, J. Sambrook and D.W. Russell, eds., Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; O'Brian et al., Analytical Chemistry of *Bacillus Thuringiensis*, Hickle and Fitch, eds.

50

, Am. Chem. Soc., 1990; *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety, T. R. Glare and M. O'Callaghan, eds., John Wiley, 2000; Antibody Phage Display, Methods and Protocols, Humana Press, 2001; 及び Antibodies, G. Subramanian, ed., Kluwer Academic, 2004を含む標準的な実験室教本に説明されている。変異誘発は、例えば、部位特異的変異誘発 (Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492 (1985)) を使用して実施され得る。PCR增幅法は、米国特許第4,683,192号、同第4,683,202号、同第4,800,159号、及び同第4,965,188号に、ならびに PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, New York (1989); 及び PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, San Diego, Calif. (1990) を含むいくつかの教本に説明されている。  
10

#### 【0084】

本発明は、代替軽鎖 (SLC) に対する抗体に関する。抗体は、これらの抗体の各々が代替軽鎖に特異的に結合するように、V<sub>pre</sub>Bサブユニット、5サブユニット、または融合接合体に対するものであり得る。  
20

#### 【0085】

抗SLC抗体は、多様な用途に使用され得る。1つの用途は、薬物動態 / 薬力学研究、免疫組織学研究における、またはインビトロの診断使用のための複雑な生体液中のSLC含有タンパク質の検出である。

#### 【0086】

抗SLC抗体の別の用途は、診断目的のためである。SLCの不在または欠損に関連付けられる、当該技術分野において既知である多数の条件が存在する。例えば、5欠損マウスは、B細胞の発達の劇的な減少を示し (Kitamura D, Kudo A, Schaal S, Muller W, Melchers F, Rajewsky K. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. Cell. 1992; 69(5): 823-831) 、ヒト5遺伝子における変異は、無ガンマグロブリン血症をもたらす (Minegishi Y, Coustan-Smith E, Wang YH, Cooper MD, Campana D, Conley ME. Mutations in the human lambda 5/14.1 gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. J Exp Med. 1998; 187(1): 71-77)。ヒトにおいて、SLCを発現する自己反応性B細胞が同定されており、これらの細胞は、リウマチ性関節炎を罹患する患者の関節内に蓄積することが示されている (Meffre et al., (2000) Nature Immunology 1, 207-213)。したがって、SLCは、多反応性細胞及び異常なブレBCR機能のマーカーであり得る。したがって、抗SLC抗体は、異常なSLC発現及びB細胞機能に関連付けられる特定の白血病及び自己免疫疾患を診断するための有用な試薬であり得る。  
30  
40

#### 【0087】

それに加えて、融合タンパク質、非共有ヘテロマーとして、または細胞集団としてのSLC錯体の精製にも、抗SLC抗体の使用が考慮され得る。調査試薬として、抗SLC抗体は、インビトロでSLCを含有する錯体の生物物理学的及び機能的特徴を評価するために使用され得る。SLC-錯体に関する定量化、親和性決定、有効なまたは抑制性の濃度、免疫沈降、及び免疫吸着剤用途は、抗SLC抗体の重要な使用の例である。  
50

## 【0088】

本発明の抗体は、例えば、米国特許第8,131,480号に説明される多様性抗体ライブラリ等の抗体ライブラリをスクリーニングすることによって得ることができ、それは、好ましい実施形態では、ファージベクターを使用して多様性抗体ライブラリを発現する。この方法は概して、クローン化及び発現のための纖維状ファージ（ファージミド）表面発現ベクター系の使用を含む。例えば、Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4363-4366 (1991); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982 (1991); Zebrede et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3175-3179 (1992); Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:11120-11123 (1991); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4457-4461 (1992); Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580 (1992); Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187:9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); ならびに米国特許第5,698,426号；同第5,233,409号；同第5,580,717号；同第5,427,908号；同第5,750,753号；同第5,821,047号；同第5,403,484号；同第5,571,698号；同第5,516,637号；同第5,780,225号；同第5,658,727号；同第5,733,743号；同第5,837,500号；同第5,969,108号；同第6,326,155号；同第5,885,793号；同第6,521,404号；同第6,492,160,6,492,123号；同第6,489,123号；同第6,342,588号；同第6,291,650号；同第6,225,447号；同第6,180,336号；同第6,172,197号；同第6,140,471号；同第5,994,519号；同第6,969,108号；同第5,871,907号；及び同第5,858,657号を参照されたい。

## 【0089】

ベクターは、組み換え宿主細胞を形質転換するために使用され、該組み換え宿主細胞は、導入されたファージ遺伝子及びディスプレイタンパク質遺伝子が発現されること、及びファージ粒子が組み立てられ、宿主細胞から発生されることを可能にするように培養される。発生されたファージ粒子は次に、宿主細胞培地から採取（収集）され、所望の抗体結合特性に関してスクリーニングされる。典型的には、採取された粒子は、予め選択された抗原との結合に関して「パンニング」される。強く結合する粒子が収集され、粒子の個々の種はクローン的に単離され、抗原に対する結合に関してさらにスクリーニングされる。所望の抗原結合特異性の結合部位を產生するファージが選択される。

## 【0090】

本発明を、以下の非限定的な実施例においてさらに説明する。

## 【実施例】

## 【0091】

実施例1 - 抗V

```
B1 Fabの同定
```

Sea Laneの専有Fab断片ライブラリを、ヒトV

```
B-1
```

について4回パンニングした。典型的には、3~4回のパンニングの後、富化されたファージプールからの個々のクローンをELISAによってヒトV

```
B1
```

に対して分析し、陽性クローンを配列決定して、それらの重及び軽鎖配列を決定した。これらの研究から、Fabクローン分析は、16個のユニークヒトV

```
B1
```

結合剤を同定した（表1）。表2にさらに特徴付けられる通り、カッパ及びラムダ軽鎖のどちらも、4つの異なる重鎖フレームワー

10

20

30

40

50

クを伴って同定された。

表1 - 抗ヒトVpreB1のユニーク陽性クローン

ユニーク配列	VL	VH
2462VpreBiam5E07	VK1_L8	VH3-321
2462VpreBiam5C04	VK1_L8	VH3-323
2462VpreBiam5B09	VK3_A27	VH1-102
2463VpreBiam5B05	VK1_L1	VH1-1e
2463VpreBiam5D07	VK1_L1	VH1-102
2460-VpreBiam5C10	VK1_L8	VH3-321
2460VpreBiam5B04	VK1_L8	VH3-321
2462VpreBiam5A07	VK1_L8	VH3-321
2460VpreBiam5E01	VK1_L8	VH1-102
2462VpreBiam5D05	VL2_2a2	VH1-1e
2462VpreBiam5A05	VL3_3m	VH1-102
2462VpreBiam5C09	VL2_2a2	VH3-323
2460-VpreBiam5F05	VL2_2a2	VH3-323
2462VpreBiam5E08	VL3_3L	VH3-323
2462VpreBiam5C05	VL2_2a2	VH3-321
2463VpreBiam5C04	VL2_2a2	VH1-102

10

20

表2 - 抗ヒトVpreB1 Fabヒット間の軽及び重鎖配列の概要

	ラムダ	カッパ
VH_02	2	3
VH-e	1	1
VH3_21	1	4
VH3_23	3	1

30

【0092】  
FASTAプログラムを使用して、特異性抗ヒトVpreB1 Fabクローンのアミノ酸配列を決定し、可変領域配列を同定し、分析した。抗ヒトVpreB1 Fabクローンの軽鎖配列(VL)を、図6に描写されるように整列させた。この整列内では、可変軽鎖は残基番号3から開始し、この点において、定常軽鎖(CまたはC')への可変軽鎖配列の転移が矢印で画定される。抗ヒトVpreB1 Fabクローンの重鎖配列(VH)を、図7に描写されるように整列させた。この整列内では、可変重鎖は残基番号1から開始し、この点において、定常重鎖への可変重鎖及びJ鎖配列の転移が矢印で画定される。

#### 【0093】

実施例2 - 選択される抗VpreB1 IgG mAbの特徴付け

E L I S A アッセイを実施して、ヒトVpreB1に対して親和性を有する個々のパンニングされたファージFab抗体のSgG結合親和性、感受性、及び血清バックグラウンドを特徴付けた。図8は、抗ヒトVpreB1 IgG1(2460B04 IgG1)の特徴付けの概要を提供する。SgGタンパク質は、代替軽鎖(SLC)構築物を指し、本明細書においては「Surrobody」とも称され、この2つの用語は互換的に使用される。概して、2ピースフォーマットは、SLC融合及び抗体重鎖を含み、3ピースフォーマットは、2つのSLCポリペプチド及び抗体重鎖を含む。

#### 【0094】

検出

抗ヒトVpreB1 IgG1(2460B04 IgG1)を検出抗体として評価す

40

50

るため、HGF特異性S2gG及びS3gGを、ELISAにおいて非標識の、ビオチン標識された、及びDIG標識された抗VpreB1抗体によって検出した。2ピースまたは3ピースSurrobodyのいずれかを検出するためのアッセイでは、ウェルをHGF(0.1mLの0.001mg/mL)でコーティングし、1%BSA-PBSTをプロッキング及び希釈緩衝液として使用し、S2gGまたはS3gGを50%血清中で段階希釈した。HGF結合S2gGまたはS3gGを、ビオチン化抗VpreB1 IgG及びHRP共役ストレプトアビシンによって検出した。図9に実証される通り、抗VpreB1抗体は、50%血清中でHGF結合2ピースSurrobodyを検出する。同様に、抗VpreB1抗体はまた、50%血清中でHGF結合3ピースSurrobodyも検出する(図10)。検出アッセイに使用される異なるSLC構築物のEC50値は、下記の表3に提供される。

10

表3 - 非標識対標識された抗ヒトVpreB1 IgG抗体

EC50 (nM) (ELISA)			
SgG	非標識	ビオチン標識	DIG標識
S2gG	0.605	0.549	0.535
S3gG	0.482	0.48	0.432

## 【0095】

20

## 捕捉

## 抗VpreB1 IgG

(2460B04 IgG1)によって捕捉される2ピースまたは3ピースSurrobodyを評価するためのアッセイでは、ウェルを抗VpreB1 IgG(0.1mLの0.001mg/mL)でコーティングし、1%BSA-PBSTをプロッキング及び希釈緩衝液として使用し、S2gGまたはS3gGを50%血清中で段階希釈した。HGF結合S2gGを、HRP共役ヤギ抗ETagAbによって検出した。図11に実証される通り、抗VpreB1抗体は、50%血清中で2ピースSurrobodyを捕捉する。抗VpreB1抗体はまた、50%血清中で3ピースSurrobodyも捕捉する(図12)。

## 【0096】

30

## 親和性

SgGに対する抗ヒトVpreB1 IgG mAb(2460B04 IgG1)の結合親和性を、Fortebioオクテット上でBiolayer Interferometryによって試験した(「オクテット分析」)。動的結合分析を実施し、明らかな親和性を表4に報告する。結果は、2ピースまたは3ピースサログロブリン(surroglobulin)に結合するためのサブナノモル親和性を示す。

表4 - オクテットによって測定したSgGに対する抗ヒトVpreB1 IgG mAbの結合親和性

実行	S A B i o s e n s o r 固定化	結合滴定フォーマット	$K_D$ [nM]	$k_{obs} R_{sq}$
1	0.75 μg/ml αHGF S2gG-ビオチン	100ug/ml αVpreB_IgG	0.280 ~ 0.100	0.979 ~ 0.998
2	0.75 μg/ml αHGF S2gG-ビオチン	50ug/ml αVpreB_IgG	0.120 ~ 0.066	0.981 ~ 0.998
3	0.75 μg/ml αVpreB_IgG-ビオチン	50ug/ml αHGF S2gG	0.048 ~ 0.016	0.967 ~ 0.988
4	0.75 μg/ml αVpreB_IgG-ビオチン	50ug/ml αHGF S3gG	0.058 ~ 0.032	0.983 ~ 0.993

## 【0097】

抗ヒトVpreB1 IgG mAb (2460B04 IgG1)は、ヒト、マウス、またはカニクイザルの血清の存在下でクリーンなバックグラウンドを実証した。これは、2460B04 IgG1抗体が薬物動態(PK)研究において有用であることを示唆している。これらの結果によって示唆されるさらなる用途は、ヒト、マウス、及びサル血清(15ng/ml)中で最小の交差反応性を有する検出試薬として、ヒト、マウス、及びサル血清中で最小の交差反応性を有する捕捉試薬として、ならびにVpreB1含有ライプラリ構築においてライプラリを富化するための親和性抗体としてである。

## 【0098】

## 交差反応性

ヒトVLに対する抗VpreB1 mAb (2460B04 IgG1)の交差反応性を、ELISAによって調査した。表5は、抗VpreB1 mAbの交差反応性を調査するために使用される方法の概要を提供する。表6は、ヒトVL ORFを含有するIgGのタンパク質配列類似性を同定する。

表5 - 抗VpreB1 mAbの交差反応性の特徴付け

捕捉試薬	検出試薬	目標
標的 (h HGF)	ロバ抗ヒト IgG Fcγ -HRP (Jackson 709-035-098)	標的結合
	ヤギ抗ヒトλ-HRP (Southern)	
	抗VpreB1 hIgG 1-HRP	
抗VpreB1 mAb 2a	マウスαヒトλ mAb- HRP (クローン JDC-1 0、Southern)	錯体形成
	ヤギ抗ヒトλ-HRP (Southern)	VpreB1 捕捉CL
ロバ抗ヒト IgG Fcγ (Jackson 709 -005-098)	ヤギ抗ヒトλ-HRP (Southern)	錯体形成

表 6 - ヒト VL タンパク質配列類似性

	VpredT- 2S_JL (F1)	VpreBdT- 2S-B11_JL (F2)	VL5e_JL	VL1b_JL	VL1c_JL	VL2a2_JL	VL3l_JL	VL3m_JL
VpredT- 2S_JL (F1)	100	98	60	41	44	44	42	42
VpreBdT- 2S-B11_JL (F2)		100	62	43	46	46	44	44
VL5e_JL			100	52	56	56	50	55
VL1b_JL				100	62	66	66	62
VL1c_JL					100	69	62	59
VL2a2_JL						100	86	84
VL3l_JL							100	75
VL3m_JL								100

## 【0099】

検出試薬として使用されるとき、抗VpreB1 mAbは、ヒトVL ORFを含有するIgGに結合しない(図13A～D)。同様に、捕捉試薬として使用されるとき、抗VpreB1 mAbは、VL含有IgG(448C12-HC)を捕捉することができない(図14A～C)。抗VpreB1 mAbはまた、2547C02 HC(図15A～C)または2211A01\_N56H-HC(図16A～C)によって表されるVL含有IgGを捕捉することもできない。したがって、従来的な軽鎖タンパク質に対する交差反応性は存在しないと考えられる。

## 【0100】

実施例3 - カニクイザルにおけるSurrogate bodyの薬物動態研究

10

20

30

40

50

抗 V p r e B 1 IgG mAb の有用性を、カニクイザルにおける S u r r o b o d y の薬物動態 ( P K ) 研究においてさらに実証した。カニクイザルにおける S u r r o b o d y の P K プロファイルを、半減期 ( T 1 / 2 ) 、最大血漿 / 血清濃度 ( C max ) 、排除速度定数、 A U C 0 - t ( 最後に観察されたデータ点に対する血漿濃度 - 時間曲線下の面積 ) 、及びクリアランスの測定によって評価した。単回注射から得られる抗 S g G 応答も調査した。カニクイザル P K 研究に使用される S u r r o b o d y 試験物品は、表 7 に特定される。

表 7 - カニクイザル P K 研究に使用される S u r r o b o d y 試験物品

S L 番号	標的	S g G フォーマット	S g G 構造
SL-349	HGF/PIGF	SgG1_SVD ( 積み重ね可変ドメイン )	
SL-521	HGF/PIGF	SgG1_ポール／ソケット	
SL-541	HGF	SgG1	
SL-542	PIGF	SgG1	
SL-656	HGF	IgG1	

#### 【 0 1 0 1 】

##### P K カニクイザル血清中の標的特異性 S u r r o b o d y の検出

生物学的にナイーブなカニクイザルを使用して、図 17 に特定される通り、5 つの S g G 試験物品を評定した。試験物品群の各々において 3 匹のサルが研究された。5 つの群の中、合計 15 匹のサルが存在し、各々 3 . 37 ~ 5 . 67 kg の体重であり、各サルに関して健康に関する報告を維持した。各群の平均体重は、4 . 34 ~ 4 . 87 kg であった。単回の 10 mg / mL 注射を、静脈注射によって付与した。各サルの血清を収集し、最大 28 日間で調製した。血清収集の時点は、短間隔 ( 0 及び 5 分間 ) 、中間隔 ( 1 、 4 、 8 、及び 24 時間 ) 、及び長間隔 ( 48 時間 ( 2 日間 ) 、 72 時間 ( 3 日間 ) 、 96 時間 ( 4 日間 ) 、 168 時間 ( 7 日間 ) 、 240 時間 ( 10 日間 ) 、 336 時間 ( 14 日間 ) 、 408 時間 ( 17 日間 ) 、 504 時間 ( 21 日間 ) 、 576 時間 ( 24 日間 ) 、及び 672 時間 ( 28 日間 ) ) を含んだ。カニクイザル血清中の S g G を検出するために、 E L I S A アッセイを使用した。1 つの P K 時点をプレート毎にアッセイし、標準 / 試料の段階希釈を 2 mL 深ウェルブロック中で実施した。1 : 3 段階希釈液は、 800 uL の 1 % B S A - P B S T + 400 uL の試料を含んだ。1 つの希釈液を、 H G F 結合、 P I G F 結合、及びコンプレックス E L I S A の各々のために作製した。

#### 【 0 1 0 2 】

5 つの試験群の各々における全てのサルからの免疫前血清試料は、 S g G タンパク質に関してクリーンであった ( 図 17 ) 。5 分間 ~ 96 時間の時点にわたって S L - 541 \_ H G F S g G に関して収集した E L I S A データの例が、図 18 に提供され、 168 時間 ~ 672 時間の時点にわたるこの S g G 構造のデータが、図 19 に提供される。5 分間 ~ 96 時間の時点にわたって S L - 656 \_ H G F I g G に関して収集された E L I S A データの例が、図 20 に提供され、 168 時間 ~ 672 時間の時点にわたるこの S g G 構造のデータが、図 21 に提供される。結果は、試験対象の半減期が 6 ~ 10 日間の範囲にわたることを示している。これらの結果は、治療用 S u r r o b o d y の P K 特性を決定するための V p r e B 1 IgG mAb ( 2460B04 IgG1 ) の有用性を

10

20

30

40

50

さらに実証する。PK研究は、潜在的な治療薬の分配、代謝、及び排除の決定に役立つ。これらのデータは、治験治療用製品と認可された治療薬との間の歴史的比較の基礎を提供し、また製品の最適な投薬計画及び消退期間の決定に役立つであろう。したがって、V<sub>p</sub>reB1 IgG mAbは、臨床的に有効な量及び臨床的に関連のある用量を達成するためのクリアランス時間の両方を確立することによって、Surrogateの適切な投薬を決定するために有用である。

#### 【0103】

我々はまた、二重特異性SurrogateのPK特性にも着目し、それらがカニクイザルにおける親に相当することを見出した。(図22)カニクイザルのナイーブ群(n=3)にSurrogateの単回静脈注射用量(10mg/kg)を投与し、その血清を28日間の期間にわたり試験した。二重特異性Surrogateの全体的なPK特性は、非特異的HGF及びPIGF Surrogateに極めて類似であることが見出された。

#### 【0104】

前述の説明において、本発明は特定の実施形態に関して例証されるが、それはそのように限定されるものではない。実際、本明細書に示され、説明されるものに加え本発明の種々の修正は、前述の説明から当業者に明らかになり、また添付の特許請求の範囲の範疇に含まれるであろう。

#### 【0105】

本明細書に引用される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、個々の刊行物、特許、または特許出願が具体的かつ個々に参照により援用されることが示される場合と同程度に、あらゆる目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に援用される。

10

20

#### 【図1】

**MSWAPVLLMILEVYCTCGCPQPVLHQPPAMSSALGTIRLCTLRNDHDIGVYSVYWWQ**  
QRPGHPPRFLRYFSQSDKSQQPQVPPRSGSKDVARNRGylSISELQPEDEAAMYCAM

(配列番号1)

**MAWTSVLLMLLAHLIJCFCGPQPMVHQPPSSSLGATJRLSCTLSDNHINIGIYIYWWYQQ**  
RPQGHPPRFLRYFSHSDKIHQGPDIPPRSGSKDTARNLGYLSISELQPEDAEVYYCAVGL

(配列番号2)

**MAWTSVLLMLLAHLIOKGTLGVQGFLAPPVALLCPSDGHASIFSGCGPQPMVHQPPSA**  
SSSLGATIRLSCTLSDNHINIGIYIYWWYQQRPGHPPRFILRYFSHSDKHQGPDIPPRSGSK

(配列番号3)

**MACRCLSLFLMGTFISVSQTVLAQIDALLVFPQVAQLSCILSPQHVTIRDYGVWSYQ**  
QRAGSAPRYLLYYRSEEDHHRPADIPIRFAAKDEAHNACVLTISPVQPEDDADYYCSV

(配列番号4)

**MSWAPVLLMILEVYCTCGCPQPVLHQPPAMSSALGTIRLCTLRNDHDIGVYSVYWWQ**  
QRPGHPPRFLRYFSQSDKSQQPQVPPRSGSKDVARNRGylSISELQPEDEAAMYCAM

(配列番号5)

**METDILLWVLLWVPGSTGQPVLHQPPAMSSALGTIRLCTLRNDHDIGVYSVYWWQ**  
QRPGHPPRFLRYFSQSDKSQQPQVPPRSGSKDVARNRGylSISELQPEDEAAMYCAM

(配列番号6)

#### 【図2】

**MKLRVQGQILGLTIPROCFVLLILLJLGLVDGVVHILSPSSAERSRAVGPGASVGSNRPSL**  
WALPORLIFQHPGRGAGPRCSPIRPLSKPQFWYVFGGGTQELIIGQPKSDPLVILFPLSK

NLQPTTRPHVVCLVSEFYPGTLVVDWKVDGVPVTQGVETTQPSKQTNNKYMVSSYLTLS

SDQWMPHSKYSCRVTHEGNTVFKSVPACCS

(配列番号7)

**MRPGLGGGLFAPGEGPGPNLRRQWPPLLJLGLAYVTHGLIRPTAASOSRALGPAGPGS**  
SRSSRSRGRFLRGCRSGTGPRCWPRGFQSKIHNSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSV

LFPSSFLQANKAFLVCLMNDFYPGILTVTKADGTPITQGVEMITPSKQSNNKYAAS

SYISLTPPFQWRSRSRSCQVMHGSTVEKTVAPACCS

(配列番号8)

**MRPGLGGGLFAPGEGPGPNLRRQWPPLLJLGLAVVTHGSVTHVFGSGTQLTVLSQPKAT**  
PSVTLFPSSFLQANKAFLVCLMNDFYPGILTVTKADGTPITQGVEMITPSKQSNNKYAASSYLSL

TPQWRSRSRSCQVMHGSTVEKTVAPACCS

(配列番号9)

**METDILLWVLLWVPGSTGQPVLHQPPAMSSALGTIRLCTLRNDHDIGVYSVYWWQ**  
QRPGHPPRFLRYFSQSDKSQQPQVPPRSGSKDVARNRGylSISELQPEDEAAMYCAM

NGARSSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPSSFLQANKAFLVCLMNDFYPGILTV

TWKADGTPITQGVEMITPSKQSNNKYAASSYLSLTPQWRSRSRSCQVMHGSTVEK

TVAPACCS

(配列番号10)

#### 【図3】

**METDILLWVLLWVPGSTGQPVLHQPPAMSSALGTIRLCTLRNDHDIGVYSVYWWQ**  
QRPGHPPRFLRYFSQSDKSQQPQVPPRSGSKDVARNRGylSISELQPEDEAAMYCAM

NGARSSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPSSFLQANKAFLVCLMNDFYPGILTV

TWKADGTPITQGVEMITPSKQSNNKYAASSYLSLTPQWRSRSRSCQVMHGSTVEK

TVAPACCS

(配列番号3-5)

【 図 4 A 】

【 4 B 】

卷之三

〔 叴 5 A 〕

V R B M F V Q Q D N G E I T L N S T P G  
 1 GRGGAGGCG TTITGGCA AGGAGAGT TGGAGCTCA CGCCTGGC  
 CTCCTCTC AGAACAGT CCTTGATG CTCTGGAGT GGAAACGCG CGDAGGC  
 GTCCTGGT TCCACTTA ATTGTCTTA TACCGAGT CGCTGGACG CTCCTGGC  
 Q S D Z Q L K S G T A B V C L B W R E  
 61 CGAGGCGA AGGTTGAAT CGAGGAGT CGGGCTAC CGCTGGACG CGCTGGC  
 1121 CGCTGGAT AGGTTGAAT CGCTGGACG CGCTGGACG CGCTGGACG CGCTGGACG  
 CGCTGGACG TCCACTTA TACCTTA CGAGAAC AGGAGAGT CGGAGCTG CGCTGGACG  
 V P R E A K V C W K V D N A L Q S G N S T C  
 1181 TATCCCGAG AGGCTGGT AGCTTGAG CGCTGGACG CGCTGGACG CGCTGGACG  
 AGGAGCTG TCCACTTA TACCTTA CGCTGGACG CGCTGGACG CGCTGGACG  
 Q E S V T E Q D S K D W T Y S L S S T L  
 2241 CGAGGAGG TGAGGCA CGCAGGAG GAGGAGCT AGGGCTGG ACAGAGCT  
 CGCTGGACG AGGCTGGT CGCTGGACG CGCTGGACG CGCTGGACG CGCTGGACG  
 C T L S X A D Y E H K L Y A C E V T M Q  
 3301 AGCTGGAG AGAGGAGC CGAGGAGC AGGAGAGT CGCTGGACG CGCTGGACG CGCTGGACG  
 CGCTGGACG AGGCTGGT CGCTGGACG CGCTGGACG CGCTGGACG CGCTGGACG

【 5 B 】

(配列番号 27~31)

【図5C】

MEIDITLWVLLWVPGSTGVRREVQDNGELILWWTHGQGTKEVKRTVAAPSFH  
FPPSDQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWQKVNDALQGNQSVEQEKSVDSTYLS  
TLJLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSPNRGEC

MELLELLWVLLWVPPQVTEGQQTKEVKEKRTVAAPSVIIPPPSDQEQLKSGIAGSVCLLNNPFYPREAVQVKVDPNAQLQGNSQESVTEQDSKIDSTYSLSSTIILSKADYEKHKLYCEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

METDLLWVLLWWPGSITGTVKEIKRTVAAAPSVFIFPPSDDEQLKSGIISAVYCLLNNSIYP  
REAKVQWKVDNALQGSNQESVTIQLQDSKDSTYLSLSSTUTLSKADYEKKHLYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC

(配列番号3-2~3-4)

【 図 6 - 1 】

解鎖可變領域		解鎖定常領域	
1	1	1	1
2	2	2	2
3	3	3	3
4	4	4	4
5	5	5	5
6	6	6	6
7	7	7	7
8	8	8	8
9	9	9	9
10	10	10	10
11	11	11	11
12	12	12	12
13	13	13	13
14	14	14	14
15	15	15	15
16	16	16	16
17	17	17	17
18	18	18	18
19	19	19	19
20	20	20	20
21	21	21	21
22	22	22	22
23	23	23	23
24	24	24	24
25	25	25	25
26	26	26	26
27	27	27	27
28	28	28	28
29	29	29	29
30	30	30	30
31	31	31	31
32	32	32	32
33	33	33	33
34	34	34	34
35	35	35	35
36	36	36	36
37	37	37	37
38	38	38	38
39	39	39	39
40	40	40	40
41	41	41	41
42	42	42	42
43	43	43	43
44	44	44	44
45	45	45	45
46	46	46	46
47	47	47	47
48	48	48	48
49	49	49	49
50	50	50	50
51	51	51	51
52	52	52	52
53	53	53	53
54	54	54	54
55	55	55	55
56	56	56	56
57	57	57	57
58	58	58	58
59	59	59	59
60	60	60	60
61	61	61	61
62	62	62	62
63	63	63	63
64	64	64	64
65	65	65	65
66	66	66	66
67	67	67	67
68	68	68	68
69	69	69	69
70	70	70	70
71	71	71	71
72	72	72	72
73	73	73	73
74	74	74	74
75	75	75	75
76	76	76	76
77	77	77	77
78	78	78	78
79	79	79	79
80	80	80	80
81	81	81	81
82	82	82	82
83	83	83	83
84	84	84	84
85	85	85	85
86	86	86	86
87	87	87	87
88	88	88	88
89	89	89	89
90	90	90	90
91	91	91	91
92	92	92	92
93	93	93	93
94	94	94	94
95	95	95	95
96	96	96	96
97	97	97	97
98	98	98	98
99	99	99	99
100	100	100	100

【 6 - 2 】

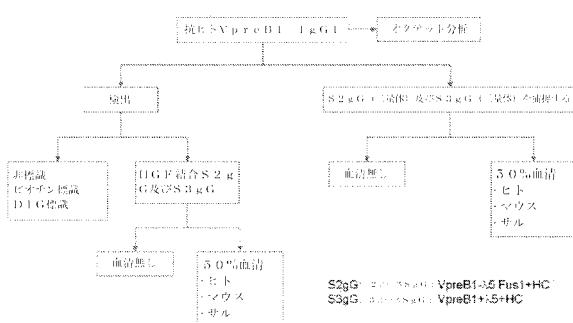
(配列番号36~51)

〔 図 7 〕

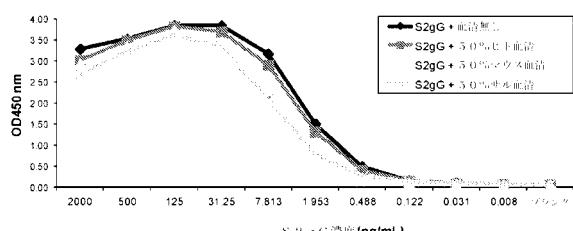
車道可変領域(駁基番号1から開始)

重慶市巴南區政府 丁酉年 城鄉建設局

〔 図 8 〕

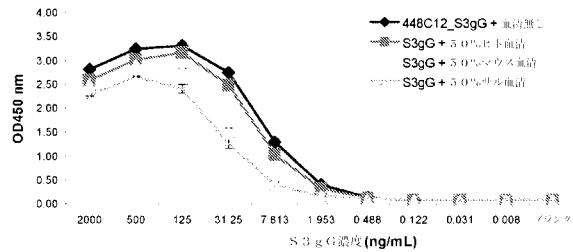


〔 四 9 〕

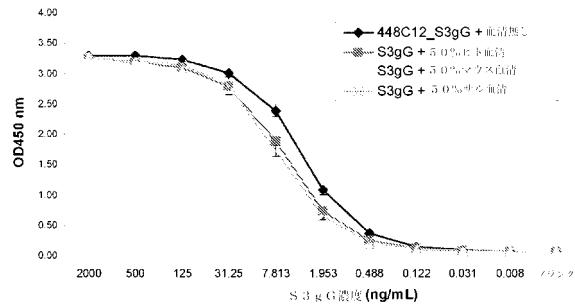


(配列番号 5-2~6-7)

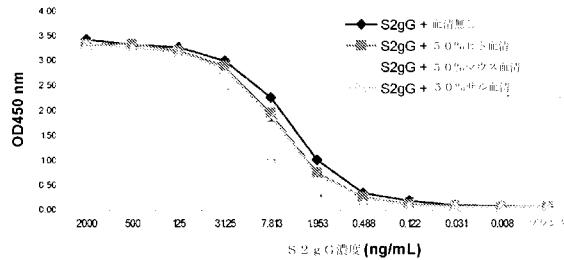
【 図 1 0 】



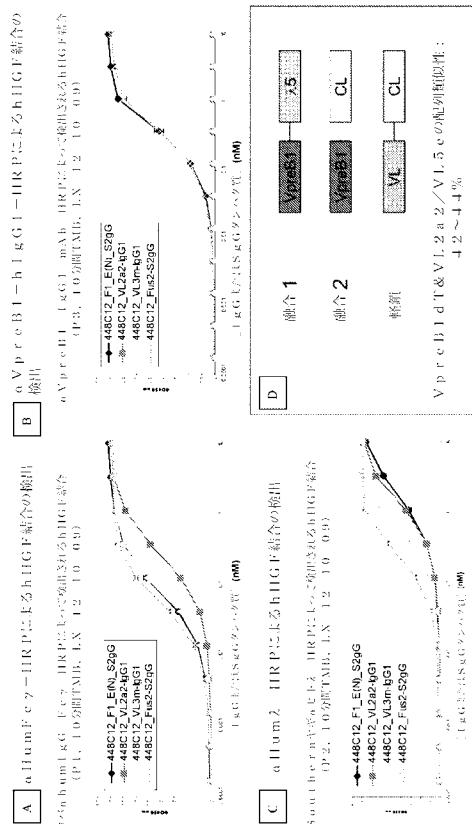
【 図 1 2 】



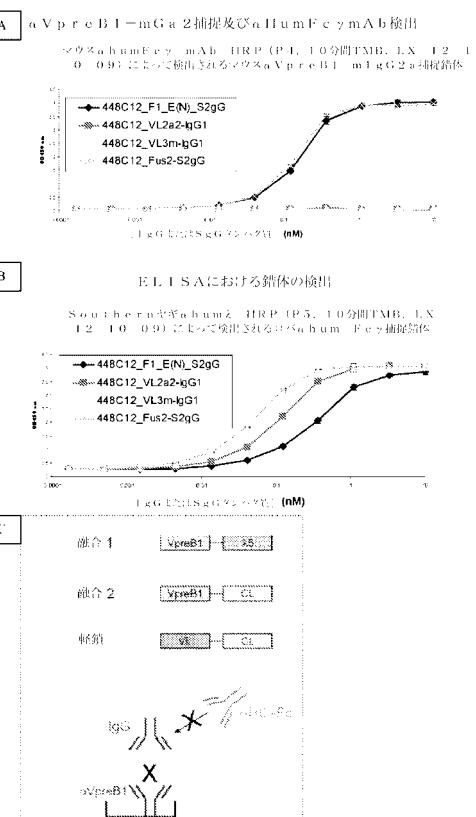
【図11】



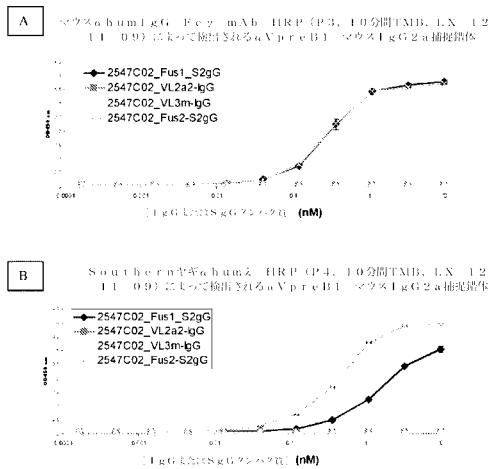
【 14 】



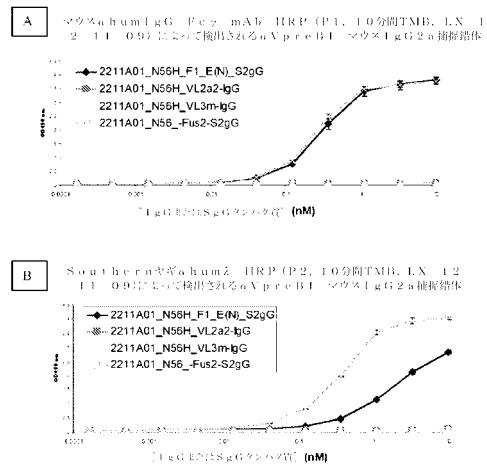
【 14 】



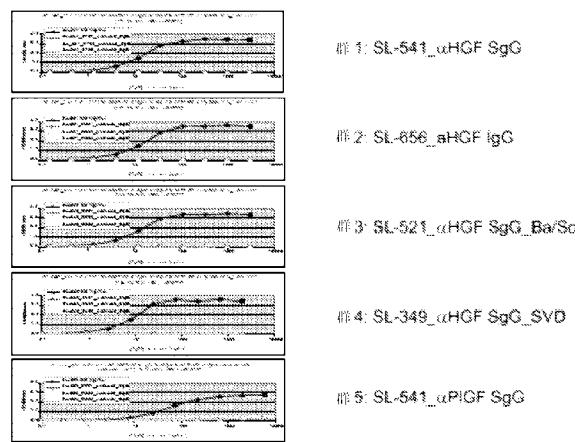
【図15】



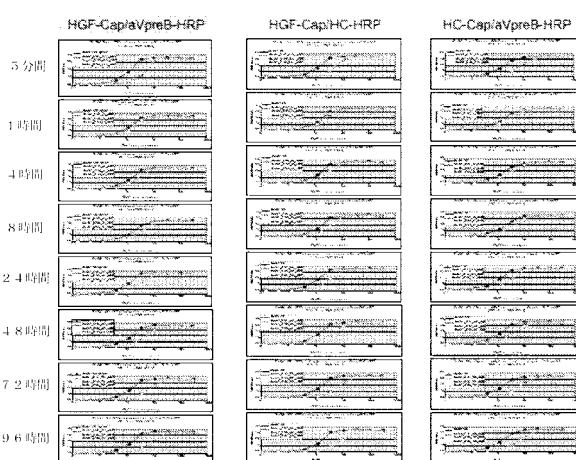
【図16】



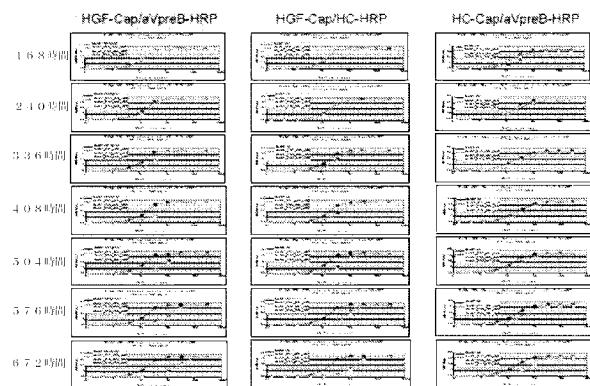
【図17】



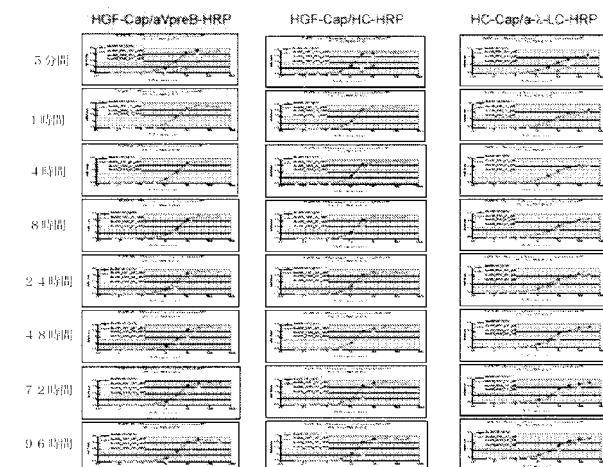
【図18】



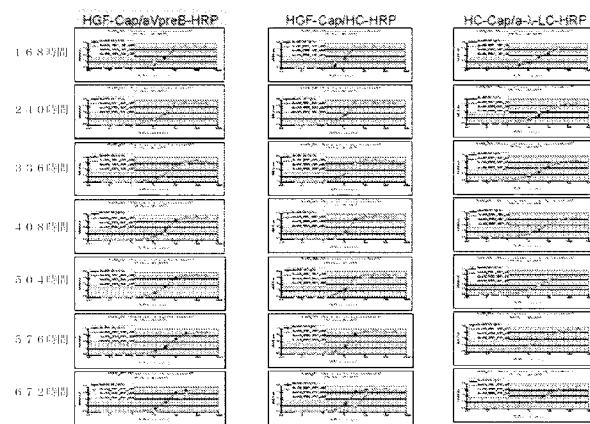
【図19】



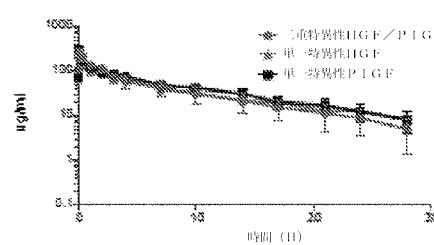
【図20】



【図21】



【図22】



薬剤	半減期 (h)	クリアランス (mL/時間/kg)	Vss (mL/kg)
SL-521_HGF/PIGF	6.64	0.42	77.2
SL-541_HGF	9.28	0.40	100
SL-542_PIGF	6.35	0.25	78.5

【配列表】

2018507254000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/15166
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 16/18, C07K 16/28, C07K 16/38, G01N 33/574, G01N 33/569 (2016.01) CPC - C07K 16/18, G01N 33/57492, C07K 16/2896, C07K 16/38, C07K 16/28, A61K 2039/505 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> IPC(8)- C07K 16/18, C07K 16/28, C07K 16/38, G01N 33/574, G01N 33/569 (2016.01) CPC - C07K 16/18, G01N 33/57492, C07K 16/2896, C07K 16/38, C07K 16/28, A61K 2039/505		
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small> CPC - G01N 33/56972 USPC- 424/130.1, 424/138.1, 424/155.1, 424/185.1, 530/388.1, 530/389.1, 435/6.16, 435/7.23		
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small> PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); PatBase, Google/Scholar: human VpreB1, CD179 antigen like family member A, Immunoglobulin iota chain, VPreB1, V(pre)B, CD179a, antibody, monoclonal, Fab, scFv, sdAb, scFv, F(ab'), Mab, MoAB GenCore 6.4.1: SEQ ID NO: 1, 36, 52		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Lemmers, et al. The human (PsiL+mu-) proB complex: cell surface expression and biochemical structure of a putative transducing receptor. Blood 1999, 93(12):4336-46; Abstract; pg	1-3, 12, 13/(1-3,12), 14/13/(1-3,12)
A	UniProt Accession P12018. PREB_HUMAN. (07 January 2015) [Retrieved from the Internet 02 April 2016: <http://www.uniprot.org/uniprot/P12018.txt?version=140>]; in entirety, 100% identity to SEQ ID NO:1	3, 13/3, 14/13/3
X	US 2003/0215453 A1 (Dedera, et al.) 20 November 2003 (20.11.2003) Abstract, claims 1-4, 23, 24	1-3, 12, 13/(1-3,12), 14/13/(1-3,12)
X	US 6,335,175 B1 (Tsuganezawa, et al.) 01 January 2002 (01.01.2002) Abstract, claims 1-3; col 8, ln 10 to col 15, ln 8	1-3, 12, 13/(1-3,12), 14/13/(1-3,12)
A	US 2012/0201756 A1 (SEXTON) 09 August 2012 (09.08.2012) SEQ ID NO 2470, amino acids 19-234, 97.7% identity to SEQ ID NO:36	9, 11, 13(9,11), 14/13(9,11)
A	US 2006/0257397 A1 (Throsby, et al.) 16 November 2006 (16.11.2006) para [0136], SEQ ID NO 53, amino acids 1-137, 85.5% identity to SEQ ID NO:52	10, 13/10, 14/13/10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
<small>* Special categories of cited documents:</small> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
<small>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "&amp;" document member of the same patent family</small>		
Date of the actual completion of the international search  07 June 2016 (07.06.2016)	Date of mailing of the international search report  08 JUL 2016	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		<b>International application No.</b> PCT/US 16/15166
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li>      <li>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</li>      <li>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>		
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>This application contains the following Inventions or groups of Inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all Inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.</p> <p>***** See Supplemental Sheet to continue *****</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li>      <li>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. 1-3, 9-14, restricted to an anti-human VpreB1 of SEQ ID NO:1, the antibody comprises LCV of SEQ ID NO:36 and HCV of SEQ ID NO:52</li> </ol>		
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/15166

## \*\*\*\*\* Supplemental Sheet \*\*\*\*\*

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group I+: claims 1-14, directed to an antibody specifically binding to a surrogate light chain (SLC) (claims 1-12) and a composition comprising thereof (claims 13, 14). The antibody will be searched to the extent that it encompasses an anti-VpreB1 antibody, wherein VpreB1 is human VpreB1 of SEQ ID NO:1, and the antibody comprises LCV of SEQ ID NO:36 and HCV of SEQ ID NO:52. It is believed that claims 1-3, 9-14 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass an antibody specifically binding to human VpreB1 of SEQ ID NO:1, wherein the antibody comprises LCV of SEQ ID NO:36 and HCV of SEQ ID NO:52. Additional antibody(ies) specifically binding to another SLC(s) of a specified amino acid sequence, and comprising LCV and HCV of specific SEQ ID NO:(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected antibody(ies), binding to a SLC of a specific SEQ ID NO:, said antibody(ies) comprising LCV and HCV of a specific SEQ ID Nos.: Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an anti-mouse VpreB2 of SEQ ID NO:2, i.e. claims 1, 2, 4, 12-14. Another exemplary election would be an anti-human VpreB1 of SEQ ID NO:1, having LCV of SEQ ID NO:51 and HCV of SEQ ID NO:57, i.e. claims 1-3, 9-14.

Group II: claims 15, 16, directed to a method for the diagnosis of a disease by contacting a biological sample from said subject with an antibody specifically binding to human SLC, and determining the expression level of SLC.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

## Special Technical Features

The special technical feature of each invention of Group I+ is a specific antigen recited therein, because no significant structural similarities can readily be ascertained among the antigens, and further because they were known in the art at the time of the invention. Specifically, UniProt Accession P12018 titled "PREB\_HUMAN" (07 January 2015) [Retrieved from the Internet 02 April 2016: <http://www.uniprot.org/uniprot/P12018.txt?version=140>] (hereinafter "UniProt P12018") discloses human VpreB1 of SEQ ID NO:1 (pg 1, VPREB1, 100% identity);

Lmbda5 subunit was also known in the art at the time of the invention (please see UniProt Accession P15814 titled "IGLL1\_HUMA" (07 January 2015) [Retrieved from the Internet 02 April 2016: <http://www.uniprot.org/uniprot/P15814.txt?version=144>] ) (hereinafter "UniProt P15814"); pg 1, Full=Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1, synonymous with Ig lambda-5).

The special technical feature of some invention of Group I+ is a LCV of a specific amino acid sequence and a HCV a LCV of a specific amino acid sequence recited therein, because no significant structural similarities can readily be ascertained among the LCV amino acid sequences and among HCV amino acid sequences.

The inventions of Group I+ do not include the shared or common technical feature of a method for the diagnosis of a disease, as required by Group II.

## Common Technical Features

The inventions of Group I+ and Group II share the technical feature of an isolated antibody specifically binding to a SLC. Some inventions of Group I+ share the technical feature of a composition comprising isolated antibody specifically binding to a SLC. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being anticipated by a publication titled "Polyclonal Antibody to Pre-B-Lymphocyte Gene 1 (VPREB1)" by Cloud-Clone Corp. (2014) [Retrieved from the Internet 02 April 2016: <http://www.uscnk.com/manual/Polyclonal-Antibody-to-Pre-B-Lymphocyte-Gene-1-VPREB1-PAA942Ra01.pdf>] (hereinafter "Cloud-Clone Corp").

Cloud-Clone Corp discloses an isolated antibody specifically binding to a SLC (pg 1, Polyclonal Antibody to Pre-B-Lymphocyte Gene 1 (VPREB1)) and a composition comprising thereof (pg 2, "Supplied as solution form in PBS, pH7.4, containing 0.02% NaN<sub>3</sub>, 50% glycerol"). As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

The inventions of Groups I+ and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

---

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IDL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US