

(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2017-532953

(P2017-532953A)

(43) 公表日 平成29年11月9日(2017.11.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A C	4 B O 6 3
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2017-511337 (P2017-511337)  
 (86) (22) 出願日 平成27年9月16日 (2015. 9. 16)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年4月21日 (2017. 4. 21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/050449  
 (87) 国際公開番号 W02016/044436  
 (87) 国際公開日 平成28年3月24日 (2016. 3. 24)  
 (31) 優先権主張番号 62/051, 130  
 (32) 優先日 平成26年9月16日 (2014. 9. 16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/089, 054  
 (32) 優先日 平成26年12月8日 (2014. 12. 8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 517059517  
 オバサイエンス・インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州O 2 4  
 5 1, ウォルサム, フォース・アベニュー  
 9  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100118902  
 弁理士 山本 修  
 (74) 代理人 100106208  
 弁理士 宮前 徹  
 (74) 代理人 100120112  
 弁理士 中西 基晴  
 (74) 代理人 100107386  
 弁理士 泉谷 玲子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗V A S A抗体、ならびにその産生法および使用法

(57) 【要約】

高アフィニティでV A S Aに特異的に結合する抗V A S A抗体 ( m A b )、特にヒト化m A bを開示する。これらの抗V A S A m A bの軽鎖および重鎖のCDRのアミノ酸配列、ならびにこれらのCDRのコンセンサス配列を提供する。該開示はまた、抗V A S A m A bをコードする核酸分子、発現ベクター、宿主細胞、抗V A S A m A bを作製するための方法、および抗V A S A m A bを発現するための方法も提供する。最後に、抗V A S A m A bを用いて、V A S Aを発現している細胞を単離し、そして/または精製する方法を開示する。

Human VASA Amino Acid Sequence  
 (Accession: NP\_077726; SEQ ID NO: 1)

```

1  mgdedveael nphmssyvpf fekdrysgen qdnfnrtpas ssenddpsr rdhfmksqfa
61  sprnfgnrda gecnkrdnts tmqfivgks fgnrgfnr fedgdssofw resndcedn
121  plrnrgfkr ggyrdqnse asqgyrgrg gsrgrggf glgspndld pdecsrtgy
181  lfgsrpvlr gqngdtsqs rsgsgergg ykglneavit gsgkmswke aegqessdtg
241  gpktylppp poededsifa hygtgfnfk ydfilvevsg hdappailtf eeantqtlh
301  nniakagytk ltpvqysip illagrnlma caqtgsqkta afilpilahm mhdytasrf
361  kelqepcili vaptrelmq iylearkfsf gtcvrvvvy gqtlghsir qivegcnilc
421  atqplndii gkcklglkqi iylvldeadr mldmrgpen kklfscgmp skeorglmaf
481  satlpeeiqr laasfilksv lfvavqvgv acrdvqglvl qwgqfstrk lveilruqg
541  ertmivefk kkadfiatfl cpekiatfsl hgdregrre qalgdfrrk cpvlvateva
601  argldienvq hvinfalpst ideyvrigr tgrcngtra isiffdesdn blagplvklv
661  tdaqqdvpaw leelafstyi pglsgstrgn vfasvdrtkg kstlntagfs ssqapnqvdd
721  eswd
    
```

FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト V A S A タンパク質に特異的に結合する抗体であって：  
免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、  
前記軽鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 8 3 ~ 8 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 8 9 ~ 9 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および/または

( i i i ) 配列番号 9 6 ~ 1 0 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体。

## 【請求項 2】

ヒト V A S A タンパク質に特異的に結合する抗体であって：  
免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、  
前記重鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 1 0 5 ~ 1 1 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 1 1 3 ~ 1 2 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および/または

( i i i ) 配列番号 1 2 2 ~ 1 3 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体。

## 【請求項 3】

ヒト V A S A タンパク質に特異的に結合する抗体であって：  
免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、  
前記軽鎖の可変領域が：

( i ) V L C D R 1 モチーフ 1 ~ 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) V L C D R 2 モチーフ 1 ~ 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および/または

( i i i ) V L C D R 3 モチーフ 1 ~ 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体。

## 【請求項 4】

ヒト V A S A タンパク質に特異的に結合する抗体であって：  
免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、  
前記重鎖の可変領域が：

( i ) V H C D R 1 モチーフ 1 ~ 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) V L C D R 2 モチーフ 1 ~ 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および/または

( i i i ) V L C D R 3 モチーフ 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項の抗体を含む抗体調製物。

## 【請求項 6】

モノクローナル抗体調製物である、請求項 5 の抗体調製物。

## 【請求項 7】

10

20

30

40

50

少なくとも2つのモノクローナル抗体調製物の混合物である、請求項5の抗体調製物。

【請求項8】

請求項1～4のいずれか一項の重鎖または軽鎖をコードする単離核酸分子。

【請求項9】

クローニングベクター、発現ベクター、異種組換えベクターおよびウイルス組込みベクターからなる群より選択される、請求項8の単離核酸。

【請求項10】

請求項8～9のいずれか一項の核酸で形質転換された細胞。

【請求項11】

哺乳動物細胞である、請求項10の細胞。

10

【請求項12】

齧歯類細胞である、請求項11の細胞。

【請求項13】

CHO細胞である、請求項11の細胞。

【請求項14】

ヒト細胞である、請求項11の細胞。

【請求項15】

VASAタンパク質を発現している細胞を単離する方法であって：

(a) 細胞集団を得て；

(b) 請求項1～4のいずれか一項の多数の抗体と、細胞集団を接触させ；そして

20

(c) 抗体と特異的に結合しない集団中の細胞から、抗体と特異的に結合する集団中の細胞を分離する

工程を含む、前記方法。

【請求項16】

細胞を蛍光活性化細胞ソーティングによって分離する、請求項15の方法。

【請求項17】

蛍光活性化細胞ソーティングによって、固定二次抗体を用いて細胞を分離する、請求項15の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

[0001]本出願は、米国仮出願第62/051,130号、2014年9月16日出願、および米国仮出願第62/089,054号、2014年12月8日出願の優先権の恩典を請求し、該出願の全内容はその全体が本明細書に援用される。

【0002】

発明の分野

[0002]本開示は、一般的に、抗体、その産生および使用に関する。特に、本開示は、ヒトVASAタンパク質に特異的に結合する抗体、こうした抗体を産生する方法、ならびにこうした抗体を用いた診断法、療法および臨床的方法に関する。

【背景技術】

40

【0003】

[0003]VASAタンパク質は、DEADファミリーATP依存性RNAヘリカーゼをコードする生殖質の構成要素としてショウジョウバエ属(*Drosophila*)で同定された(Liangら(1994), *Development*, 120:1201-11; Laskoら(1988), *Nature* 335:611-17)。VASAの分子機能は、生殖細胞確立、卵形成、および翻訳開始に關与するターゲットmRNAへの結合に関する(Gavisら(1996), *Development* 110:521-28)。VASAは、極細胞形成に必要とされ、そして発生全体を通じて、生殖細胞系譜にもっぱら制限される。

【0004】

50

[0004] Vasa 相同体遺伝子は、多様な動物種で単離されており、そして VASA は、大部分の動物種において、生殖細胞系譜の分子マーカーとして使用可能である (Nocera (2001), Cell Structure and Function 26: 131-36)。例えば、Castriillonら (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 97(17): 958590-9590 は、ヒト Vasa 遺伝子が卵巣および精巣で発現されるが、体細胞性組織では検出不能であることを示した。

#### 【0005】

[0005] 哺乳動物卵巣の体細胞組織における卵原幹細胞または卵巣幹細胞 (OSC) または卵前駆細胞としても知られる哺乳動物雌性生殖系列幹細胞の存在は、Johnsonら (2004), Nature 428: 145-50 に最初に記載され、そして現在、他の研究グループによって確認されている (例えば、Zouら (2009), Nature Cell Biology, オンライン公開 DOI: 10.1038/ncb1869; Telfer & Albertini (2012), Nature Medicine 18(3): 353-4)。in vitro 受精 (IVF) を含む人工的生殖技術 (ART) において使用するために、または卵母細胞へのミトコンドリア・トランスファーのための高機能性ミトコンドリアの供給源として、卵母細胞を産生するための OSC の潜在的な使用、ならびに閉経期の多様な症状を治療するための OSC の使用が、科学文献および特許文献に記載されてきている (例えば、Tilly & Telfer (2009), Mol. Hum. Repro. 15(7): 393-8; Zouら (2009)、上記; Telfer & Albertini (2012)、上記; Whiteら (2012), Nature Medicine 18(3): 413-21; WO 2005/121321; 米国特許第 7,955,846 号; 米国特許第 8,652,840 号; WO 2012/142500; 米国特許第 8,642,329 号および米国特許第 8,647,869 号)。

#### 【0006】

[0006] Johnsonら (2004)、上記によって、OSC が最初に特徴付けられた際、該細胞が VASA タンパク質を発現することが示され、そして VASA タンパク質に対する抗体は、卵巣組織ホモジネートから OSC を単離するために用いられてきている (例えば、Zouら (2009)、上記; Whiteら (2012)、上記)。さらに、Whiteら (2012)、上記は、VASA の N 末端ドメインに対する抗体を用いて、VASA を発現している生存 OSC を単離することは不可能であるが、C 末端ドメインに対する抗体は、こうした細胞を有効に単離することを示し、N 末端ドメインではなく C 末端ドメインが細胞外であり、そしてしたがって抗体に対してアクセス可能であることが示唆された。

#### 【0007】

[0007] 抗 VASA ポリクローナル抗体の産生は、Castriillonら (2000)、上記、および WO 01/36445 に最初に記載された。ヒト VASA タンパク質の C 末端部分に対して向けられるポリクローナル抗体は、Abcam plc (英国ケンブリッジ; 製品コード AB13840)、および R&D Systems, Inc. (ミネソタ州ミネアポリス; カタログ番号 AF2030) より商業的に入手可能であり、そしてヒト VASA の N 末端部分に対して向けられるモノクローナル抗体もまた、R&D Systems, Inc. (ミネソタ州ミネアポリス; カタログ番号 AF2030) より商業的に入手可能である。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0008】

【特許文献 1】 WO 2005/121321

【特許文献 2】 米国特許第 7,955,846 号

【特許文献 3】 米国特許第 8,652,840 号

10

20

30

40

50

【特許文献4】WO2012/142500

【特許文献5】米国特許第8,642,329号

【特許文献6】米国特許第8,647,869号

【特許文献7】WO01/36445

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Liangら(1994), Development, 120:1201-11

【非特許文献2】Laskoら(1988), Nature 335:611-17

【非特許文献3】Gavisら(1996), Development 110:521-28 10

【非特許文献4】Noceら(2001), Cell Structure and Function 26:131-36

【非特許文献5】Castrillonら(2000), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 97(17):958590-9590

【非特許文献6】Johnsonら(2004), Nature 428:145-50

【非特許文献7】Zouら(2009), Nature Cell Biology, オンライン公開 DOI: 10.1038/ncb1869

【非特許文献8】Telfer & Albertini (2012), Nature Medicine 18(3):353-4 20

【非特許文献9】Tilly & Telfer (2009), Mol. Hum. Repro. 15(7):393-8

【非特許文献10】Whiteら(2012), Nature Medicine 18(3):413-21

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

[0008]しかし、限定されるわけではないがOSCを含む、VASAを発現している細胞を同定し(例えば免疫組織化学または標識抗体によって)、そして単離する(例えば磁気または蛍光活性化細胞ソーティングによって)ための、VASAのC末端細胞外ドメインに対して向けられる高アフィニティ抗体に関する必要性が残っている。 30

【課題を解決するための手段】

【0011】

[0009]高アフィニティでVASAに特異的に結合する抗VASA抗体(mAb)、特にヒト化mAbを開示する。これらの抗VASA mAbの軽鎖および重鎖のCDRのアミノ酸配列、ならびにこれらのCDRのコンセンサス配列を提供する。該開示はまた、抗VASA mAbをコードする核酸分子、発現ベクター、宿主細胞、抗VASA mAbを作製するための方法、および抗VASA mAbを発現するための方法も提供する。最後に、抗VASA mAbを用いて、VASAを発現している細胞を単離し、そして/または精製する方法を開示する。 40

【0012】

[0010]開示のこれらのおよび他の側面および態様を以下に例示し、そして記載する。以下の図および詳細な説明を検証すると、他の系、プロセス、および特徴が、当業者には明らかとなるであろう。こうしたさらなる系、プロセス、および特徴のすべてが本明細書に含まれ、本発明の範囲内にあり、そして付随する請求項によって保護されることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】[0011]図1は、NP\_\_077726(配列番号1)のGenBank寄託由来の 50

ヒトVASAタンパク質アイソフォーム1のアミノ酸配列を提供する。

【図2】[0012]図2は、NP\_\_001139357(配列番号2)のGenBank寄託由来のマウスVASA相同体タンパク質アイソフォーム1のアミノ酸配列を提供する。

【図3】[0013]図3は、ヒトVASAタンパク質(配列番号1の残基690~724)およびマウスVASA相同体(配列番号2の残基691~728)のC末端部分の間のアミノ酸整列を提供する。

【図4】[0014]図4Aは、本発明の抗体および対照抗体(AB13840、Abcam plc、英国ケンブリッジ)と反応性であるVASA/DDX4ポリペプチドのC末端ドメイン領域を示し、そして図4Bは、VASAタンパク質ならびにV1およびV2ポリペプチドへの対照抗体の結合を示す。

10

【図5】[0015]図5Aは、1E9および1A12のVASAに対するアフィニティの用量反応結合曲線を示し；そして図5Bは、VASA、V1およびV2ペプチドを用いたELISAアッセイの結果を示し、これは、1E9が、商業的に入手可能なウサギポリクローナル抗体(AB13840、Abcam plc、英国ケンブリッジ)と同じエピトープに結合することを示唆する。NC = 陰性対照； VASA = 配列番号1、残基700~724； VASA-1 = V1または配列番号1、残基712~721； VASA-2 = V2または配列番号1、残基700~709。

【図6】[0016]図6Aは、1E9のIgGおよびscFv-Fc型のVASAに対するアフィニティの用量反応結合曲線を示し；そして図6Bは、VASA、V1およびV2ペプチドと1E9のIgGおよびscFv-Fc型の結合のELISAアッセイの結果を示す。

20

NC = 陰性対照； VASA = 配列番号1、残基700~724； VASA-1 = V1または配列番号1、残基712~721； VASA-2 = V2または配列番号1、残基700~709。

【図7-1】[0017]図7Aは、3つの抗VASAハイブリドーマ抗体(2M1/1K3、2M1/1K23および2M1/1L5)およびVASA特異的ではない2つの陰性対照(2M1/1F5および2M1/1H5)を用いた結合実験の結果を示し；図7Bは、1E9-ラムダに比較した、4つのVASA特異的ハイブリドーマ抗体(2M1/1K3、2M1/1K23および2M1/1L5)の用量反応曲線を示し；そして図7Cは、1E9-ラムダに比較したVASA特異的ハイブリドーマ抗体2M1/2K4の用量反応曲線を示す。

30

【図7-2】[0017]図7Aは、3つの抗VASAハイブリドーマ抗体(2M1/1K3、2M1/1K23および2M1/1L5)およびVASA特異的ではない2つの陰性対照(2M1/1F5および2M1/1H5)を用いた結合実験の結果を示し；図7Bは、1E9-ラムダに比較した、4つのVASA特異的ハイブリドーマ抗体(2M1/1K3、2M1/1K23および2M1/1L5)の用量反応曲線を示し；そして図7Cは、1E9-ラムダに比較したVASA特異的ハイブリドーマ抗体2M1/2K4の用量反応曲線を示す。

【図8】[0018]図8は、8つのハイブリドーマ由来の抗VASA抗体(2M1/1L20、2M1/1J20、1M1/1C9、2M1/1N3、2M1/1K23、1M1/1L5および2M1/2K4)に関するサブタイプ決定分析の結果を示す。

40

【図9-1】[0019]図9A~9Bは、抗VASA発明のVL配列のいくつかの整列を示す。図は、3つのCDR領域のおよその位置(太字、下線)および各配列に対応する配列番号を示す。

【図9-2】[0019]図9A~9Bは、抗VASA発明のVL配列のいくつかの整列を示す。図は、3つのCDR領域のおよその位置(太字、下線)および各配列に対応する配列番号を示す。

【図9-3】[0019]図9A~9Bは、抗VASA発明のVL配列のいくつかの整列を示す。図は、3つのCDR領域のおよその位置(太字、下線)および各配列に対応する配列番号を示す。

【図9-4】[0019]図9A~9Bは、抗VASA発明のVL配列のいくつかの整列を示す

50

。図は、3つのCDR領域のおよその位置（太字、下線）および各配列に対応する配列番号を示す。

【図10-1】[0020]図10A~10Bは、抗VASA発明のVH配列のいくつかの整列を示す。図は、3つのCDR領域のおよその位置（太字、下線）および各配列に対応する配列番号を示す。

【図10-2】[0020]図10A~10Bは、抗VASA発明のVH配列のいくつかの整列を示す。図は、3つのCDR領域のおよその位置（太字、下線）および各配列に対応する配列番号を示す。

【図10-3】[0020]図10A~10Bは、抗VASA発明のVH配列のいくつかの整列を示す。図は、3つのCDR領域のおよその位置（太字、下線）および各配列に対応する配列番号を示す。

【図10-4】[0020]図10A~10Bは、抗VASA発明のVH配列のいくつかの整列を示す。図は、3つのCDR領域のおよその位置（太字、下線）および各配列に対応する配列番号を示す。

【図11】[0021]図11は、図9のVL領域のユニークなCDR配列の整列を示す。

【図12】[0022]図12は、図10のVH領域のユニークなCDR配列の整列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

[0023]本開示は、単離抗体(Ab)、特に高アフィニティでVASAに特異的に結合するAbに関する。特定の態様において、抗VASA Abは、特定の重鎖および軽鎖配列由来であり、そして/または特定の構造特徴、例えば特定のアミノ酸配列を含むCDR領域を含む。本開示は、単離抗VASA Ab、こうした抗VASA Abを作製する方法、こうした抗VASA Abを含むイムノコンジュゲートおよび二重特異性分子、ならびにこうした抗VASA Abを発現する方法を提供する。本開示はまた、抗VASA Abを用いて、哺乳動物雌性生殖系幹細胞または卵原幹細胞(OSC)または卵前駆細胞およびその子孫細胞を含む、VASAを発現する細胞を単離し、そして/または精製する方法にも関する。

【0015】

[0024]本開示がより容易に理解できるように、特定の用語を定義する。さらなる定義を詳細な説明全体に示す。

#### 定義

[0025]用語「抗体」または略語「Ab」には、本明細書において、天然グリコシル化を伴うまたは伴わない、全抗体および任意の抗原結合断片（すなわち「抗原結合部分」またはその一本鎖）が含まれる。完全「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互連結された少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。各重鎖には、重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)および重鎖定常領域が含まれる。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>およびC<sub>H3</sub>で構成される。各軽鎖には、軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)、および1つのドメイン、C<sub>L</sub>を含む軽鎖定常領域が含まれる。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域は、相補性決定領域(CDR)およびフレームワーク領域(FR)にさらに細分割されうる。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域には、各々、CDR1、CDR2およびCDR3と称される、抗原(例えばVASA)と相互作用する、3つのCDRが含まれる。

【0016】

[0026]用語、抗体の「抗原結合部分」は、本明細書において、抗原(例えばVASA)に特異的に結合する能力を保持する抗体の1またはそれより多い断片を指す。用語、抗体の「抗原結合部分」内に含まれる結合断片の例には、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fab'断片、Fd断片、Fv断片、scFv断片、dAb断片、および単離CDRが含まれる。

【0017】

[0027]用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体調製物」は、本明細書において、単一の重鎖アミノ酸配列および単一の軽鎖アミノ酸配列を有する(が、不均一

10

20

30

40

50

なグリコシル化を有することも可能である)抗体から本質的になる抗体分子の調製物を指す。

【0018】

[0028]用語「ヒト化抗体」には、本明細書において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の定常領域および可変領域フレームワーク領域(FR)を有するが、CDRを含まない抗体が含まれる。

【0019】

[0029]用語「組換え抗体」には、本明細書において、組換え手段によって調製され、発現され、生成され、または単離されたすべての抗体が含まれる。特定の態様において、組換え抗体は、抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から(例えばトランスフェクトーマから)単離される。他の態様において、組換え抗体は、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリー、例えばファージディスプレイライブラリーから単離される。組換え抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを伴う、任意の他の手段によって、調製され、発現され、生成され、または単離されることも可能である。

10

【0020】

[0030]用語「アイソタイプ」は、本明細書において、定常領域遺伝子によってコードされる、重鎖クラス(例えば、ヒト抗体に関してはIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM)または軽鎖クラス(例えばヒトにおいてカッパまたはラムダ)を指す。用語「サブタイプ」は、サブタイプ内のサブクラス(例えばヒトにおいてIgA<sub>1</sub>、IgA<sub>2</sub>、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>)を指す。

20

【0021】

[0031]句、明記する抗原「に特異的な抗体」は、本明細書において、句、明記する抗原「に特異的に結合する抗体」と交換可能に用いられる。本明細書において、用語「K<sub>a</sub>」は、特定の抗体-抗原複合体の会合速度を指し、そして用語「K<sub>d</sub>」は解離速度を指す。用語「K<sub>D</sub>」は、K<sub>d</sub>対K<sub>a</sub>の比から得られ、そしてモル濃度(M)で表される、解離定数を指す。いくつかの態様にしたがって、「ヒトVASSAに特異的に結合する」抗体は、 $5 \times 10^{-8}$  Mまたはそれ未満、より好ましくは $1 \times 10^{-8}$  Mまたはそれ未満のK<sub>D</sub>で、ヒトVASSAに結合する抗体を指すよう意図される。

【0022】

[0032]別に定義しない限り、本明細書で用いるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する業の一般的な当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載するものと類似かまたは同等の方法および材料が、本発明の実施または試験に使用可能であるが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書に言及するすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が本明細書に援用される。対立する場合、定義を含めて本明細書が統制するであろう。さらに、材料、方法、および例は例示のみであり、そして限定することを意図しない。

30

【0023】

抗VASSA抗体

[0033]本発明は、ヒトVASSAタンパク質、特にC末端領域に対して高アフィニティを持つ多様な新規抗体を提供する。抗体は、本明細書に開示する完全VHおよびVL領域を含むことも可能であるし、または本明細書開示のCDR配列のみを含むことも可能である。さらに、本明細書開示のCDR配列に基づいて、CDR配列の配列モチーフを提供し、そして抗体は、モチーフによって定義されるCDR配列を含むことも可能である。

40

【0024】

[0034]本発明のCDR配列(図11および12に開示されるCDRならびに本明細書開示の配列モチーフによって定義されるCDRの両方を含む)を、当該技術分野に周知の方法にしたがって、他の免疫グロブリン配列と組み合わせ、本発明のCDRによって定義される抗原結合特異性を持つ免疫グロブリン分子を産生することも可能である。

【0025】

50

[0035]いくつかの態様において、本発明のCDRを他の抗体由来のフレームワーク領域(FR)および定常ドメイン(CHまたはCL)配列と組み合わせる。例えば、本明細書開示のCDRのいくつかは、ネズミハイブリドーマ由来であり、そしてネズミFRおよび定常ドメイン配列を有するが、これらはヒトまたは他の哺乳動物FRおよび定常ドメイン配列と組み合わせられて、ヒト化または他の組換え抗体を産生することも可能である。こうした組換え抗体の産生は、当業者に周知であり、そしてルーチンの実験しか必要としない。

#### 【0026】

[0036]こうした組換え抗体に含まれる定常領域のタイプを、その意図される使用にしたがって選択することも可能である。例えば、抗体が、破壊のためにVASA発現細胞をターゲティングする療法使用のために意図される場合、IgGサブタイプの重鎖定常ドメイン(すなわちFc領域)を用いることも可能である。抗体が細胞を標識するための試薬(例えば蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)のため)としてのみ意図される場合、完全抗体、抗原結合断片(Fab)、一本鎖可変断片(Fsc)、単ドメイン抗体(sdAb)またはさらに非抗体免疫グロブリン分子(例えばMHC受容体細胞外ドメイン)を、本発明のCDRとともに用いてもよい。

10

#### 【0027】

[0037]所定の可変軽(VL)鎖または可変重(VH)鎖のCDR1、CDR2およびCDR3配列が、異なる元来のVLおよびVH鎖から、異なるVLおよびVH CDRモチーフから、または開示するCDRおよびモチーフの組み合わせから、本発明のCDRを独立に選択することも可能である。しかし、軽鎖CDRの配列を、開示するVL CDRまたはVL CDRモチーフから選択すべきであり、そして重鎖CDRの配列を、開示するVH CDRまたはVH CDRモチーフから選択すべきである。同様に、適切であるように、VLまたはVH鎖に関して、CDR1領域の配列を、開示するCDR1またはCDR1モチーフ配列から選択すべきであり、CDR2領域の配列を、開示するCDR2またはCDR2モチーフ配列から選択すべきであり、そしてCDR3領域の配列を、開示するCDR3またはCDR3モチーフ配列から選択すべきである。

20

#### 【0028】

##### 細胞を検出するか単離するために抗VASA抗体を用いる方法

[0038]本発明の抗VASA抗体を、免疫アフィニティ精製、免疫組織化学および免疫療法の標準法において、しかしVASAタンパク質を発現している細胞および組織に対する特異的適用とともに、用いることも可能である。

30

#### 【0029】

[0039]例えば、本発明の抗VASA抗体を用いて、VASAを発現する細胞を一部のみ含む、細胞の混合集団から、VASAを発現する細胞を単離することも可能である。例えば、雌性生殖系幹細胞または卵原幹細胞またはその前駆細胞が、非常に低い比率で卵巣組織中に存在することが発見されてきている。卵巣組織(例えば卵巣表面上皮および/または皮質)を切除し、個々の細胞に解離させ、そして蛍光標識抗VASA抗体を用いたFACSまたは固定抗VASA抗体を用いた免疫アフィニティ精製などの技術に供することも可能である。単離VASA発現細胞は、上述のように、補助生殖技術において、多様な有用性を有する。

40

#### 【0030】

[0040]あるいは、本発明の抗VASA抗体を用いて免疫組織化学を行って、VASAを発現している細胞または組織を同定し、そして/またはこうした細胞におけるVASA発現を定量化することも可能である。

#### 【0031】

[0041]さらに、本発明の抗VASA抗体を療法的に用いて、放射または化学毒性部分にコンジュゲート化された本発明の抗VASA抗体を含む抗体依存性細胞伸介性細胞傷害(ADCC)または免疫毒素のいずれかによって、破壊のためにVASA発現細胞をターゲティングすることも可能である。また、本発明の抗VASA抗体の抗体-薬剤コンジュゲ

50

ートを用いて、V A S A 発現細胞に療法薬剤を送達することも可能である。

【0032】

抗V A S A 抗体をコードする核酸分子

[0042]本発明はまた、本発明の抗V A S A 抗体をコードする核酸分子も提供する。所望のアミノ酸配列をコードするであろうコドンを選択するための普遍的な遺伝暗号の標準表を用いて、こうした核酸を設計することも可能であるし、または異なる生物に特徴的なコドンバイアスを反映する、特殊化コドン表を用いることも可能である。したがって、例えば、C H O 細胞における本発明の抗V A S A 抗体の発現を最適化するため、C H O 細胞に関して最適化されたコドン表を用いて、所望の抗体をコードする核酸を設計することも可能である。

10

【0033】

[0043]本発明の抗V A S A 抗体をコードする核酸は、クローニングベクター（例えば細菌または哺乳動物クローニングベクター）、形質転換ベクター（例えば相同組換え、ウイルス組込みまたは自律複製ベクター）および発現ベクター（例えば高コピー数、誘導性または恒常的哺乳動物発現ベクター）を含む、当該技術分野に知られる非常に多様なベクターが含まれることも可能である。

【0034】

抗V A S A 抗体を発現している細胞

[0044]やはり提供するのには、本発明の抗V A S A 抗体をコードする異種配列を発現している宿主細胞である。こうした宿主細胞は、本発明の抗V A S A 抗体の商業的産生に有用である可能性もあり、そして適切な宿主細胞を上述の発現ベクターで形質転換することによって産生可能である。

20

【0035】

[0045]いくつかの態様において、本発明は、本発明の抗V A S A 抗体を発現している、C H O 細胞を含む、哺乳動物細胞を提供する。しかし、当業者は、細菌、酵母、昆虫および哺乳動物系を含む、多様な宿主細胞において、抗体を発現させることも可能である。例えば、本明細書にその全体が援用される、Vermaら(1998), J. Immunol. Methods 216(1-2): 165-81を参照されたい。

【実施例】

【0036】

免疫原ペプチド

[0046]以下のペプチドを免疫原として用いて、ヒトV A S A のC末端ドメインに対する抗体を生成し、そしてV A S A に対する高アフィニティ結合を持つ抗体に関してスクリーニングした：

V A S A - 1 ( V 1 ) 免疫原：S Q A P N P V D D E ( 配列番号 1 残基 7 1 2 ~ 7 2 1 )

V A S A - 2 ( V 2 ) 免疫原：G K S T L N T A G F ( 配列番号 1 残基 7 0 0 ~ 7 0 9 )

[0047]図3に示すように、これらの免疫原は、ヒトV A S A タンパク質およびマウスV A S A 相同体の中で非常に保存されるV A S A のC末端ドメイン由来のアミノ酸配列を含む。

40

【0037】

ハイブリドーマ生成

[0048]ハイブリドーマは、V A S A ペプチド免疫原V 1 およびV 2 ( 上記 ) を用いた別個の実験において形成された。標準法によって、ペプチドをキャリアタンパク質にコンジュゲート化した。コンジュゲート化ペプチドを用いてマウスを免疫し、そしてコンジュゲート化ペプチドでのブーストを通じて、免疫反応を増加させた。血清中の抗体力価増加期間後、動物を屠殺し、そして脾臓を除去した。単離およびクローニングのため、脾臓B細胞をマウス融合パートナー細胞株(S P 2 - 0 ) に融合させた。限界希釈での外植によってハイブリドーマを形成して、そしてクローニング力価決定実験によって、クローンを

50

発展させた。V A S A 反応性抗体の存在を E L I S A アッセイによって調べた。限界希釈細胞クローニングでプレティングした細胞の外植および安定化によって、ハイブリドーマを得た。

【 0 0 3 8 】

[0049] V A S A / D D X 4 ポリペプチドの C 末端ドメイン領域中の V A S A 反応性抗体の結合を、結合対照抗体 ( A B 1 3 8 4 0、A b c a m p l c、英国ケンブリッジ) と比較して、結合エピトープの類似性を描写した。例示的な結果を図 4 に示す。

【 0 0 3 9 】

ハイブリドーマの分析

[0050] ハイブリドーマをマウスに腹腔内注射し、そして増殖期間を与えた後、すべて標準法を用いて、腹水を収集し、そして精製し、そして次いで、E L I S A によって分析した。

10

【 0 0 4 0 】

[0051] V A S A、V A S A - 1 および V A S A - 2 ポリペプチドに対する腹水由来抗体の結合を用いて、さらなる分析のため、抗体を選択した。例えば、図 7 に示すように、4 つの抗 V A S A ハイブリドーマ抗体 ( 2 M 1 / 1 K 3、2 M 1 / 1 K 2 3、2 M 1 / 1 L 5 および 2 M 1 / 2 K 4 ) を、V A S A 特異的ではない 2 つの陰性対照 ( 2 M 1 / 1 F 5 および 2 M 1 / 1 H 5 ) に、そして / または 1 E 9 - ラムダ抗体に比較した ( 以下に記載する )。

【 0 0 4 1 】

20

組換えライブラリーパニング

[0052] ハイブリドーマ技術の代替法として、ファージディスプレイ技術を用いて、ヒト V A S A / D D X 4 のアミノ酸残基 7 0 0 ~ 7 2 4 に対する抗体の生成を行った。~ 4 0 の血液ドナー由来の正常 B 細胞プールから、ファージディスプレイライブラリーを形成した。ファージを用いて、抗体の s c F v 鎖をディスプレイした。

【 0 0 4 2 】

[0053] V A S A / D D X 4 7 0 0 ~ 7 2 4 ペプチドに対して、ヒト未刺激 ( n a i v e ) s c F v ライブラリーをパニングした結果は、以下の表 1 に示した通りであった：

表 1

【 0 0 4 3 】

30

【表 1】

ペプチド	周期	アウトプット ファージの力 価 (cfu/ml)	レスキューさ れたファージ の力価 (cfu/ml)	ELISA 結果
VASA	1	$10^7$	$10^{13}$	/
	2	$10^7$	$10^{13}$	/
	3	$10^7$	$10^{12}$	陽性クローン なし
	4	$10^7$	$10^{13}$	陽性クローン 2
	5	$10^7$	$10^{13}$	いくつかの 陽性クローン
	6	$10^7$	/	/

40

【 0 0 4 4 】

50

【0054】選択 3 および 4 周期後に同定された単一コロニーの E L I S A 結果を以下の表 2 ~ 4 に示す。2 つのクローン：「1 A 1 2」（プレート 1、A 行、1 2 列）および「1 E 9」（プレート 1、E 行、9 列）が注目された。

【0045】

表 2

【0046】

【表 2】

プレート 1												
	3 周期						4 周期					
	VASA ペプチド											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.062	0.061	0.057	0.063	0.065	0.092	0.059	0.059	0.059	0.060	0.059	0.550
B.	0.055	0.058	0.056	0.056	0.064	0.073	0.060	0.057	0.060	0.58	0.063	0.059
C.	0.065	0.058	0.060	0.063	0.069	0.072	0.069	0.063	0.066	0.061	0.070	0.063
D.	0.072	0.064	0.067	0.066	0.061	0.062	0.069	0.069	0.070	0.070	0.117	0.071
E.	0.778	0.058	0.055	0.071	0.056	0.059	0.057	0.056	0.458	0.064	0.060	0.059
F.	0.057	0.059	0.059	0.060	0.059	0.062	0.063	0.057	0.059	0.057	0.059	0.056
G.	0.058	0.055	0.056	0.082	0.061	0.066	0.061	0.057	0.056	0.058	0.068	0.055
H.	0.044	0.058	0.058	0.056	0.053	0.096	0.056	0.052	0.056	0.054	0.054	0.056
	非関連ペプチド											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.085	0.063	0.062	0.069	0.056	0.089	0.054	0.059	0.056	0.057	0.057	0.061
B.	0.062	0.053	0.054	0.06	0.09	0.066	0.063	0.054	0.054	0.058	0.058	0.062
C.	0.064	0.063	0.071	0.069	0.069	0.067	0.062	0.06	0.057	0.062	0.064	0.057
D.	0.094	0.063	0.067	0.069	0.069	0.067	0.071	0.067	0.067	0.066	0.135	0.061
E.	0.078	0.058	0.059	0.116	0.055	0.057	0.054	0.064	0.061	0.054	0.056	0.059
F.	0.062	0.056	0.056	0.056	0.055	0.064	0.063	0.057	0.062	0.056	0.054	0.058
G.	0.057	0.06	0.059	0.066	0.056	0.064	0.057	0.057	0.057	0.055	0.077	0.055
H.	0.061	0.066	0.061	0.054	0.058	0.111	0.057	0.054	0.057	0.058	0.052	0.054

【0047】

表 3

【0048】

10

20

30

【表 3】

プレート 2-選択 4 周期後												
VASA ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.052	0.045	0.053	0.045	0.051	0.045	0.046	0.044	0.049	0.044	0.045	0.050
B.	0.049	0.051	0.051	0.045	0.042	0.054	0.046	0.045	0.055	0.045	0.048	0.053
C.	0.048	0.047	0.048	0.054	0.051	0.047	0.047	0.045	0.047	0.052	0.051	0.055
D.	0.062	0.050	0.048	0.047	0.059	0.056	0.059	0.063	0.048	0.057	0.052	0.061
E.	0.047	0.042	0.042	0.045	0.051	0.041	0.047	0.042	0.044	0.052	0.050	0.054
F.	0.047	0.049	0.040	0.042	0.046	0.043	0.046	0.042	0.052	0.045	0.051	0.054
G.	0.047	0.052	0.045	0.041	0.039	0.051	0.048	0.049	0.052	0.043	0.054	0.050
H.	0.055	0.048	0.054	0.042	0.043	0.048	0.048	0.049	0.051	0.051	0.048	0.054
非関連ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.047	0.053	0.050	0.042	0.053	0.053	0.041	0.043	0.042	0.053	0.053	0.054
B.	0.052	0.053	0.054	0.054	0.053	0.043	0.043	0.045	0.053	0.045	0.055	0.054
C.	0.052	0.047	0.054	0.053	0.055	0.045	0.045	0.043	0.053	0.055	0.057	0.053
D.	0.047	0.049	0.054	0.056	0.047	0.049	0.054	0.051	0.056	0.062	0.065	0.062
E.	0.052	0.045	0.042	0.045	0.041	0.051	0.040	0.047	0.041	0.056	0.053	0.054
F.	0.052	0.053	0.041	0.045	0.052	0.053	0.054	0.052	0.533	0.049	0.045	0.053
G.	0.051	0.053	0.049	0.050	0.051	0.043	0.049	0.052	0.053	0.053	0.054	0.051
H.	0.055	0.052	0.054	0.053	0.045	0.051	0.051	0.051	0.052	0.062	0.054	0.053

10

20

【 0 0 4 9 】

表 4

【 0 0 5 0 】

【表 4】

プレート 3-選択 4 周期後												
VASA ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.074	0.052	0.058	0.076	0.052	0.063	0.052	0.055	0.040	0.052	0.054	0.072
B.	0.047	0.041	0.052	0.064	0.072	0.051	0.059	0.048	0.053	0.048	0.054	0.053
C.	0.051	0.042	0.042	0.044	0.053	0.056	0.052	0.048	0.044	0.048	0.060	0.056
D.	0.057	0.049	0.045	0.051	0.053	0.046	0.067	0.047	0.046	0.046	0.059	0.058
E.	0.054	0.046	0.042	0.126	0.041	0.047	0.051	0.040	0.042	0.043	0.048	0.073
F.	0.077	0.045	0.040	0.047	0.042	0.040	0.042	0.039	0.041	0.053	0.051	0.051
G.	0.178	0.056	0.044	0.041	0.051	0.050	0.055	0.042	0.042	0.051	0.044	0.052
H.	0.054	0.042	0.045	0.041	0.049	0.039	0.045	0.089	0.050	0.051	0.061	0.055
非関連ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.050	0.056	0.055	0.049	0.053	0.055	0.051	0.059	0.051	0.044	0.047	0.054
B.	0.058	0.075	0.061	0.064	0.073	0.061	0.053	0.054	0.059	0.056	0.059	0.063
C.	0.076	0.056	0.053	0.054	0.056	0.053	0.053	0.053	0.057	0.063	0.049	0.061
D.	0.069	0.052	0.052	0.058	0.056	0.048	0.059	0.059	0.056	0.052	0.051	0.056
E.	0.047	0.056	0.050	0.118	0.063	0.067	0.052	0.053	0.054	0.053	0.056	0.054
F.	0.053	0.054	0.054	0.052	0.054	0.054	0.053	0.053	0.043	0.056	0.046	0.056
G.	0.063	0.056	0.054	0.045	0.045	0.049	0.050	0.053	0.053	0.052	0.055	0.053
H.	0.058	0.055	0.054	0.047	0.053	0.048	0.050	0.051	0.054	0.053	0.053	0.058

30

40

【 0 0 5 1 】

【0055】選択 5 周期後に同定された単一コロニーの E L I S A 結果を以下の表 5 ~ 7 に示す。注目されるクローンには、1 A 1 1、1 B 4、1 B 7、1 D 4、1 D 5、1 E 2、1

50

E 3、1 F 7、1 G 3、1 G 1 2、2 B 8、2 C 7、2 E 1 1、2 F 1、2 G 8、2 G 1 0、2 H 9、3 B 2、3 B 5、3 B 7、3 D 1 1、3 E 5、3 E 1 2、3 F 6 および 3 H 1 1 が含まれた。

【 0 0 5 2 】

表 5

【 0 0 5 3 】

【 表 5 】

プレート 1- 選択 5 周期後												
VASA ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.049	0.049	0.122	0.135	0.050	0.129	0.051	0.089	0.077	0.084	0.227	0.077
B.	0.051	0.197	0.056	0.212	0.067	0.099	0.280	0.109	0.122	0.094	0.049	0.053
C.	0.181	0.168	0.062	0.059	0.105	0.051	0.127	0.098	0.101	0.093	0.061	0.080
D.	0.057	0.186	0.143	0.408	0.527	0.057	0.178	0.061	0.124	0.060	0.061	0.077
E.	0.159	0.342	0.230	0.046	0.047	0.042	0.120	0.119	0.053	0.119	0.126	0.064
F.	0.160	0.177	0.160	0.086	0.048	0.134	0.248	0.053	0.079	0.054	0.159	0.052
G.	0.167	0.119	0.246	0.085	0.049	0.050	0.050	0.052	0.050	0.102	0.053	0.458
H.	0.126	0.136	0.096	0.050	0.048	0.049	0.060	0.049	0.058	0.104	0.066	0.052
非関連ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.053	0.054	0.051	0.052	0.053	0.054	0.054	0.050	0.051	0.044	0.050	0.052
B.	0.056	0.054	0.053	0.053	0.052	0.052	0.062	0.053	0.052	0.053	0.054	0.053
C.	0.056	0.055	0.056	0.056	0.056	0.053	0.053	0.052	0.052	0.051	0.054	0.053
D.	0.060	0.060	0.060	0.057	0.065	0.059	0.058	0.061	0.052	0.056	0.057	0.055
E.	0.052	0.083	0.051	0.053	0.043	0.043	0.042	0.039	0.043	0.050	0.053	0.057
F.	0.052	0.052	0.050	0.050	0.041	0.040	0.048	0.043	0.050	0.053	0.052	0.052
G.	0.051	0.051	0.048	0.049	0.052	0.043	0.054	0.046	0.052	0.051	0.053	0.061
H.	0.052	0.048	0.046	0.049	0.044	0.050	0.050	0.049	0.049	0.051	0.051	0.052

10

20

30

【 0 0 5 4 】

表 6

【 0 0 5 5 】

【表 6】

プレート 2-選択 5 周期後												
VASA ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.075	0.051	0.067	0.050	0.049	0.069	0.150	0.094	0.081	0.050	0.043	0.103
B.	0.136	0.054	0.107	0.075	0.059	0.052	0.120	0.318	0.159	0.095	0.152	0.052
C.	0.103	0.056	0.055	0.052	0.140	0.053	0.210	0.056	0.116	0.054	0.140	0.114
D.	0.098	0.141	0.058	0.114	0.104	0.057	0.070	0.077	0.079	0.049	0.138	0.054
E.	0.071	0.065	0.058	0.077	0.044	0.050	0.121	0.051	0.050	0.049	0.212	0.083
F.	0.210	0.051	0.046	0.110	0.043	0.063	0.043	0.056	0.052	0.057	0.051	0.062
G.	0.054	0.078	0.064	0.060	0.053	0.051	0.054	0.475	0.055	0.272	0.076	0.061
H.	0.050	0.050	0.050	0.054	0.050	0.054	0.051	0.050	0.290	0.055	0.061	0.056
非関連ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.040	0.041	0.044	0.041	0.040	0.048	0.046	0.047	0.040	0.045	0.044	0.045
B.	0.039	0.052	0.039	0.047	0.042	0.050	0.052	0.060	0.053	0.042	0.045	0.043
C.	0.036	0.043	0.051	0.041	0.042	0.051	0.053	0.062	0.052	0.053	0.050	0.040
D.	0.047	0.055	0.048	0.046	0.047	0.051	0.049	0.058	0.048	0.052	0.054	0.052
E.	0.051	0.051	0.040	0.039	0.043	0.041	0.040	0.040	0.040	0.043	0.067	0.046
F.	0.054	0.051	0.046	0.045	0.47	0.040	0.043	0.050	0.043	0.049	0.048	0.040
G.	0.038	0.050	0.047	0.040	0.039	0.039	0.045	0.060	0.041	0.048	0.050	0.044
H.	0.039	0.058	0.039	0.040	0.049	0.048	0.050	0.049	0.058	0.048	0.044	0.049

10

20

【 0 0 5 6 】

表 7

【 0 0 5 7 】

【表 7】

プレート 3-選択 5 周期後												
VASA ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.047	0.122	0.105	0.176	0.177	0.102	0.040	0.164	0.104	0.109	0.169	0.081
B.	0.048	0.218	0.094	0.054	0.314	0.155	0.287	0.146	0.052	0.166	0.054	0.054
C.	0.199	0.059	0.052	0.105	0.060	0.054	0.118	0.152	0.054	0.145	0.055	0.053
D.	0.053	0.096	0.066	0.056	0.058	0.077	0.055	0.048	0.196	0.155	0.259	0.133
E.	0.139	0.052	0.052	0.046	0.471	0.089	0.199	0.052	0.049	0.042	0.173	0.244
F.	0.055	0.051	0.068	0.046	0.093	0.412	0.083	0.041	0.129	0.052	0.053	0.053
G.	0.101	0.056	0.058	0.039	0.051	0.050	0.075	0.046	0.042	0.044	0.070	0.052
H.	0.135	0.083	0.062	0.052	0.052	0.050	0.056	0.071	0.073	0.094	0.200	0.050
非関連ペプチド												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.055	0.056	0.053	0.051	0.054	0.056	0.054	0.45	0.049	0.053	0.055	0.053
B.	0.057	0.057	0.054	0.055	0.059	0.056	0.056	0.044	0.058	0.052	0.054	0.055
C.	0.057	0.055	0.056	0.054	0.049	0.052	0.043	0.052	0.055	0.055	0.050	0.055
D.	0.060	0.062	0.059	0.058	0.061	0.058	0.057	0.047	0.059	0.058	0.061	0.059
E.	0.056	0.045	0.048	0.055	0.071	0.048	0.046	0.043	0.048	0.056	0.056	0.059
F.	0.054	0.045	0.055	0.047	0.053	0.070	0.044	0.052	0.053	0.053	0.054	0.055
G.	0.052	0.055	0.049	0.049	0.041	0.047	0.044	0.046	0.054	0.053	0.053	0.051
H.	0.053	0.052	0.057	0.041	0.046	0.044	0.051	0.051	0.052	0.052	0.048	0.050

30

40

【 0 0 5 8 】

50

[0056]太字で示すクローンはPCR増幅された。

s c F v - F c 融合への変換および哺乳動物細胞における発現

[0057]パニング5周期後、DNA消化パターンは、第5周期由来の多くのクローンが同じであることを示し、選択およびELISA分析のさらなる周期が不要であることが示された。

【0059】

[0058]2つのユニークなクローン(1A12、1E9)を、哺乳動物細胞において発現させるためにs c F v - F c 融合への変換に、そしてELISAおよびFACS分析に選択した。図5Aは、1E9が0.02779nMのEC50を有し、そして1A12が0.2156nMのEC50を有することを示す、用量反応結合曲線を示す。さらに、図5Bは、1E9が、商業的に入手可能なウサギポリクローナル抗体(AB13840、Abcam plc、英国ケンブリッジ)と同じエピトープに結合することを示唆する、V1およびV2 VASAペプチドを用いたELISAアッセイの結果を示す。

10

【0060】

[0059]1E9抗体の2つの異なる型: IgGおよびs c F v - F cを比較した。図6Aに示すように、1E9 IgGは0.08919nMのEC50を有し、そして1E9 s c F v - F cは0.3072nMのEC50を有した。さらに、図6Bに示すように、どちらの型もVASA-1エピトープに対して特異的であった。

【0061】

合成抗体遺伝子産生

20

[0060]以下の工程を使用して、合成抗体遺伝子を産生した:

[0061](1) ハイブリドーマ抗体のサブタイプ決定。製造者のプロトコルにしたがって、商業的に入手可能なキット(例えばマウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定キット、カタログ番号MMT1、AbD Serotech、英国キドリングトン)を用いて、ハイブリドーマ抗体のIgGサブタイプを決定した。図8は、8つのハイブリドーマ由来の抗VASA抗体(2M1/1L20、2M1/1J20、1M1/1C9、2M1/1N3、2M1/1K23、1M1/1L5および2M1/2K4)に関するサブタイプ決定分析の結果を示す。すべての抗体は、IgG1、IgG2aまたはIgG2bであった。

【0062】

[0062](2) 縮重プライマー合成。試験した8つのハイブリドーマ抗体に関するサブタイプ情報に基づいて、マウスIgGデータベース(すなわち国際免疫遺伝学情報システム(International Immunogenetics Information System)(登録商標)またはIMGTデータベース; Lefrancら(2003), Leukemia 17:260-266、およびAlamyara(2012), Methods Mol. Biol. 2012; 882:569-604を参照されたい)由来の配列情報を用い、マウスIgG VHおよびVLの縮重プライマーを設計した。VH鎖に関して10の、そしてVL鎖に関して10(カッパ鎖に関して9、そしてラムダ鎖に関して1つ)の縮重順方向プライマーを設計し、そして合成した。さらに、VH鎖に関して2つ(IgG1およびIgG2bサブタイプに関して1つ、そしてIgG2aサブタイプに関して1つ)、そしてVL鎖に関して5つ(カッパ鎖に関して4つ、そしてラムダ鎖に関して1つ)の縮重逆方向プライマーを設計し、そして合成した。

30

40

【0063】

[0063](3) RNA抽出、増幅、クローニングおよび配列決定。標準技術によって、ハイブリドーマ細胞からRNAを抽出し、遺伝子特異的およびオリゴ(dT)プライマーを用いて標準技術によって第一鎖cDNA合成を行い、そして遺伝子特異的プライマーを用いて、cDNAを増幅した。次いで、増幅DNAを商業的に入手可能な細菌クローニングベクター(pMD18-T, Sino Biological, Inc., 中国北京)内に連結した。標準方法論を行って、大腸菌DH5a内に連結産物を形質転換し、そして陽性クローンを配列決定した。

【0064】

50

抗体配列分析

[0064]潜在的に有用な抗Vas a抗体を産生するクローンをDNA配列決定し、そして対応するアミノ酸配列を推定した。上述のハイブリドーマ由来の8つの抗体(すなわち、1N23、1K23、2K4、1C9、1J20、1L20、1K3、1L5)、契約下で産生したハイブリドーマ由来の4つのさらなる抗体(すなわち、CTA4/5、CTB4/11、CTC2/6、CTD2/6)およびファージディスプレイ由来の2つの抗体(すなわち、1A12および1E9)に関して、配列を開示する。

## 【0065】

可変軽鎖配列

[0065] 1N23のVL。1N23ハイブリドーマ由来の陽性VLクローンを配列決定し、そして6つが機能するVL鎖をコードすることが見出された。これらの6つのクローンは、1N23VL5-5、1N23VL5-8\_\_0816、1N23VL1-8、1N23VL1-2\_\_0820、1N23VL1-4\_\_0820および1N23VL1-2と名付けられた。

10

## 【0066】

[0066] 1K23のVL。1K23ハイブリドーマ由来の陽性VLクローンを配列決定し、そして4つが機能するVL鎖をコードすることが見出された。これらの4つのクローンは、1K23VL2-5、1K23VL2-6、1K23VL2-8\_\_0822および1K23VL2-3\_\_0829と名付けられた。

## 【0067】

[0067] 2K4のVL。2K4ハイブリドーマ由来の陽性VLクローンを配列決定し、そして8つが機能するVL鎖をコードすることが見出された。これらの8つのクローンは、2K4VL1-3\_\_0820、2K4VL1-4、2K4VL1-1、2K4VL1-6\_\_0820、2K4VL2-5\_\_0816、2K4VL2-4、2K4VL2-6\_\_0816および2K4VL2-5と名付けられた。

20

## 【0068】

[0068] 1C9のVL。1C9ハイブリドーマ由来の陽性VLクローンを配列決定し、そして3つが機能するVL鎖をコードすることが見出された。これらの3つのクローンは、1C9VL2-4、1C9VL2-6および1C9VL2-3\_\_0816と名付けられた。

30

## 【0069】

[0069] 1J20のVL。1J20ハイブリドーマ由来の陽性VLクローンを配列決定し、そして3つが機能するVL鎖をコードすることが見出された。これらの3つのクローンは、1J20VL5-2\_\_0907、1J20VL5-6\_\_0907および1J20VL4-3\_\_0907と名付けられた。

## 【0070】

[0070] 1L20のVL。1L20ハイブリドーマ由来の陽性VLクローンを配列決定し、そして1つが機能するVL鎖をコードすることが見出された。このクローンは、1L20VL5-0912\_\_091と名付けられた。

## 【0071】

[0071] 1K3のVL。1K3ハイブリドーマ由来の陽性VLクローンを配列決定し、そして4つが機能するVL鎖をコードすることが見出された。これらの4つのクローンは、1K3VL2-5、1K3VL2-5、1K3VL2-3および1K3VL2-4と名付けられた。

40

## 【0072】

[0072] 1L5のVL。1L5ハイブリドーマ由来の陽性VLクローンを配列決定し、そして2つが機能するVL鎖をコードすることが見出された。これらの2つのクローンは、1L5VL2-4および1L5VL3-1と名付けられた。

## 【0073】

[0073] さらなるVL。CTA4\_\_VL、CTB4\_\_VL、CTC6\_\_VL、CTD6\_\_

50

V L と称される 4 つのさらなるハイブリドーマ抗体に関して、V L 配列を得た。

[0074] V L 配列 整列。上記の V L 配列すべての整列を図 9 に示す。図は、3 つの C D R 領域のおよその位置 (太字、下線)、および各配列に対応する配列番号を示す。

【0074】

[0075] ユニークな V L C D R 配列。図 9 の V L のユニークな C D R 配列の整列を図 11 に示す。34 の V L 配列のうち、図 11 に示すように、5 つのユニークな C D R 1 配列、6 つのユニークな C D R 2 配列および 8 つのユニークな C D R 3 配列しかない。

【0075】

[0076] V L C D R コンセンサス配列。図 11 に開示する配列、ならびに天然存在アミノ酸の構造 / 機能特性に基づいて、V L C D R のコンセンサス配列を決定することも可能である。

10

【0076】

[0077] 1 つのコンセンサス配列は、V L C D R 1 モチーフ 1 である：

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11}$  (配列番号 132)

式中、 $X_1$  は、Q、N、K、R、S または T であり； $X_2$  は、S、T、C、N または Q であり； $X_3$  は、I、L、V、M または A であり； $X_4$  は、V、L、I、M、A または存在せず； $X_5$  は、H、K、R または存在せず； $X_6$  は、S、T、C または存在せず； $X_7$  は、N、Q または存在せず； $X_8$  は、G、A または存在せず； $X_9$  は、N または Q であり； $X_{10}$  は、T、S、C、N または Q であり；そして  $X_{11}$  は、Y、F または W である。いくつかの態様において、 $X_1$  は、Q、K または S に限定され；そして / または  $X_2$  は、S または N に限定され；そして / または  $X_3$  は、I または L に限定され；そして / または  $X_4$  は、V、L または存在しないに限定され；そして / または  $X_5$  は、H または存在しないに限定され；そして / または  $X_6$  は、S または存在しないに限定され；そして / または  $X_7$  は、N または存在しないに限定され；そして / または  $X_8$  は、G または存在しないに限定され；そして / または  $X_9$  は、N に限定され；そして / または  $X_{10}$  は、T、S または N に限定され；そして / または  $X_{11}$  は、Y または F に限定される。いくつかの態様において、下位配列  $X_1 X_2 X_3$  は、Q N I に限定され；いくつかの態様において、下位配列  $X_1 X_2 X_3$  は、Q S L に限定され；そして、いくつかの態様において、下位配列  $X_1 X_2 X_3$  は、K S L に限定される。さらに、いくつかの態様において、 $X_1 X_2 X_3$  が、Q S L または Q N I である場合、 $X_4$  は、V であり；一方、他の態様において、 $X_1 X_2 X_3$  が、K S L である場合、 $X_4$  は、L である。いくつかの態様において、 $X_9 X_{10}$  が、N T である場合、 $X_{11}$  は、Y である。

20

30

【0077】

[0078] 特に、配列番号 86 ~ 88 の V L C D R 1 配列が図 11 の他の配列とはまったく異なることに注目して、代替コンセンサス配列は、V L C D R 1 モチーフ 2 である：

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11}$  (配列番号 133)

式中、 $X_1$  は、Q、N、K または R であり； $X_2$  は、S、T、C、N または Q であり； $X_3$  は、I、L、V、M または A であり； $X_4$  は、V、L、I、M または A であり； $X_5$  は、H、K または R であり； $X_6$  は、S、T または C であり； $X_7$  は、N または Q であり； $X_8$  は、G または A であり； $X_9$  は、N または Q であり； $X_{10}$  は、T、S または C であり；そして  $X_{11}$  は、Y、F または W である。いくつかの態様において、 $X_1$  は、Q または K に限定され；そして / または  $X_2$  は、S または N に限定され；そして / または  $X_3$  は、I または L に限定され；そして / または  $X_4$  は、V または L に限定され；そして / または  $X_5$  は、H に限定され；そして / または  $X_6$  は、S に限定され；そして / または  $X_7$  は、N に限定され；そして / または  $X_8$  は、G に限定され；そして / または  $X_9$  は、N に限定され；そして / または  $X_{10}$  は、T に限定され；そして / または  $X_{11}$  は、Y に限定される。いくつかの態様において、下位配列  $X_1 X_2 X_3$  は、Q N I に限定され；いくつかの態様において、下位配列  $X_1 X_2 X_3$  は、Q S L に限定され；そしていくつかの態様において、下位配列  $X_1 X_2 X_3$  は、K S L に限定される。さらに、いくつかの態様において、 $X_1 X_2 X_3$  が、Q S L または Q N I である場合、 $X_4$  は、V であり；一方、他の態

40

50

様において、 $X_1 X_2 X_3$  が、K S Lである場合、 $X_4$  は、Lである。いくつかの態様において、 $X_9 X_{10}$  が、N Tである場合、 $X_{11}$  は、Yである。

【0078】

[0079] V L C D R 2 に関して、1つのコンセンサス配列は、V L C D R 2 モチーフ1である：

$Y_1 Y_2 Y_3$  (配列番号134)

式中、 $Y_1$  は、K、RまたはHであり； $Y_2$  は、V、I、L、M、A、T、SまたはCであり；そして $Y_3$  は、S、T、C、NまたはQである。いくつかの態様において、 $Y_2$  は、V、I、MまたはTに限定され；そして/または $Y_3$  は、SまたはNに限定される。

【0079】

[0080] 特に、配列番号94のV L C D R 2 配列が図11の他の配列とまったく異なることに注目して、代替コンセンサス配列は、V L C D R 2 モチーフ2である：

$Y_1 Y_2 Y_3$  (配列番号135)

式中、 $Y_1$  は、DまたはEであり； $Y_2$  は、NまたはQであり；そして $Y_3$  は、NまたはQである。いくつかの態様において、 $Y_1$  は、Dに限定され；そして/または $Y_2$  は、Nに限定され；そして/または $Y_3$  は、Nに限定される。

【0080】

[0081] 同様に、配列番号95のV L C D R 2 配列が図11の他の配列とまったく異なることに注目しては、代替コンセンサス配列は、V L C D R 2 モチーフ3である：

$Y_1 Y_2 Y_3$  (配列番号136)

式中、 $Y_1$  は、QまたはNであり； $Y_2$  は、DまたはEであり；そして $Y_3$  は、K、RまたはHである。いくつかの態様において、 $Y_1$  は、Qに限定され；そして/または $Y_2$  は、Dに限定され；そして/または $Y_3$  は、Kに限定される。

【0081】

[0082] V L C D R 3 に関して、1つのコンセンサス配列は、V L C D R 3 モチーフ1である：

$Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10}$  (配列番号137)

式中、 $Z_1$  は、S、T、C、F、Y、M、L、V、IまたはAであり； $Z_2$  は、Q、N、S、TまたはCであり； $Z_3$  は、S、T、C、G、A、H、K、R、Q、N、Y、FまたはWであり； $Z_4$  は、A、G、S、T、C、L、I、V、M、DまたはEであり； $Z_5$  は、H、K、R、E、D、S、TまたはCであり； $Z_6$  は、V、L、I、M、A、Y、F、W、S、TまたはCであり； $Z_7$  は、P、S、T、Cまたは存在せず； $Z_8$  は、S、T、Cまたは存在せず； $Z_9$  は、W、P、L、I、V、M、A、F、またはYであり；そして $Z_{10}$  は、T、S、C、V、L、I、M、Aである。いくつかの態様において、 $Z_1$  は、S、F、MまたはLに限定され；そして/または $Z_2$  は、QまたはSに限定され；そして/または $Z_3$  は、S、G、H、QまたはYに限定され；そして/または $Z_4$  は、A、S、T、L、またはDに限定され；そして/または $Z_5$  は、H、E、DまたはSに限定され；そして/または $Z_6$  は、V、Y、F、またはSに限定され；そして/または $Z_7$  は、P、Sまたは存在しないに限定され；そして/または $Z_8$  は、Sまたは存在しないに限定され；そして/または $Z_9$  は、W、P、LまたはFに限定され；そして/または $Z_{10}$  は、TまたはVに限定される。

【0082】

[0083] 特に、配列番号96～98のV L C D R 3 配列が、 $Z_5$  位で陽性電荷を有する一方、図11の他の配列はそうではないことに注目し、代替コンセンサス配列は、V L C D R 3 モチーフ2である：

$Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10}$  (配列番号138)

式中、 $Z_1$  は、S、T、C、FまたはYであり； $Z_2$  は、QまたはNであり； $Z_3$  は、S、T、C、GまたはAであり； $Z_4$  は、A、G、S、TまたはCであり； $Z_5$  は、H、KまたはRであり； $Z_6$  は、V、L、I、MまたはAであり； $Z_7$  は、Pまたは存在せず； $Z_8$  は、存在せず； $Z_9$  は、W、P、L、I、V、M、A、FまたはYであり；そして $Z_{10}$  は、TまたはVに限定される。

10

20

30

40

50

$Z_{10}$  は、T、S、またはCである。いくつかの態様において、 $Z_1$  は、SまたはFに限定され；そして/または $Z_2$  は、Qに限定され；そして/または $Z_3$  は、SまたはGに限定され；そして/または $Z_4$  は、A、SまたはTに限定され；そして/または $Z_5$  は、Hに限定され；そして/または $Z_6$  は、Vに限定され；そして/または $Z_7$  は、Pまたは存在しないに限定され；そして/または $Z_8$  は、存在しないに限定され；そして/または $Z_9$  は、W、P、LまたはFに限定され；そして/または $Z_{10}$  は、Tに限定される。

【0083】

[0084]特に、配列番号99～102のVL CDR3配列が、 $Z_5$ 位で陰性電荷を有する一方、図11の他の配列はそうではないことに注目し、代替コンセンサ配列は、VL CDR3モチーフ3である：

$Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10}$  (配列番号139)

式中、 $Z_1$  は、M、C、L、I、V、Aであり； $Z_2$  は、QまたはNであり； $Z_3$  は、H、K、R、Q、N、G、A、YまたはFであり； $Z_4$  は、L、I、V、M、A、DまたはEであり； $Z_5$  は、EまたはDであり； $Z_6$  は、YまたはFであり； $Z_7$  は、Pであり； $Z_8$  は、存在せず； $Z_9$  は、W、P、L、I、V、M、A、FまたはYであり；そして $Z_{10}$  は、T、S、またはCである。いくつかの態様において、 $Z_1$  は、MまたはLに限定され；そして/または $Z_2$  は、Qに限定され；そして/または $Z_3$  は、H、Q、GまたはYに限定され；そして/または $Z_4$  は、LまたはDに限定され；そして/または $Z_5$  は、EまたはDに限定され；そして/または $Z_6$  は、YまたはFに限定され；そして/または $Z_7$  は、Pに限定され；そして/または $Z_8$  は、存在しないに限定され；そして/または $Z_9$  は、W、P、LまたはFに限定され；そして/または $Z_{10}$  は、Tに限定される。

10

20

【0084】

[0085]特に、配列番号103のVL CDR3配列が図11の他の配列とまったく異なることに注目して、代替コンセンサ配列は、VL CDR3モチーフ4である：

$Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10}$  (配列番号140)

式中、 $Z_1$  は、S、TまたはCであり； $Z_2$  は、S、TまたはCであり； $Z_3$  は、YまたはFであり； $Z_4$  は、T、S、またはCであり； $Z_5$  は、S、TまたはCであり； $Z_6$  は、S、TまたはCであり； $Z_7$  は、S、TまたはCであり； $Z_8$  は、S、TまたはCであり； $Z_9$  は、W、P、FまたはYであり；そして $Z_{10}$  は、V、L、I、M、A、T、SまたはCである。いくつかの態様において、 $Z_1$  は、SまたはTに限定され；そして/または $Z_2$  は、SまたはTに限定され；そして/または $Z_3$  は、Yに限定され；そして/または $Z_4$  は、TまたはSに限定され；そして/または $Z_5$  は、SまたはTに限定され；そして/または $Z_6$  は、SまたはTに限定され；そして/または $Z_7$  は、SまたはTに限定され；そして/または $Z_8$  は、SまたはTに限定され；そして/または $Z_9$  は、W、PまたはFに限定され；そして/または $Z_{10}$  は、V、L、I、TまたはSに限定される。いくつかの態様において、 $Z_1$  は、Sに限定され；そして/または $Z_2$  は、Sに限定され；そして/または $Z_3$  は、Yに限定され；そして/または $Z_4$  は、Tに限定され；そして/または $Z_5$  は、Sに限定され；そして/または $Z_6$  は、Sに限定され；そして/または $Z_7$  は、Sに限定され；そして/または $Z_8$  は、Sに限定され；そして/または $Z_9$  は、Wに限定され；そして/または $Z_{10}$  は、Vに限定される。

30

40

【0085】

[0086]最後に、特に、配列番号104のVL CDR3配列が図11の他の配列とまったく異なることに注目して、代替コンセンサ配列は、VL CDR3モチーフ5である：

$Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10}$  (配列番号141)

式中、 $Z_1$  は、QまたはNであり； $Z_2$  は、AまたはGであり； $Z_3$  は、W、YまたはFであり； $Z_4$  は、DまたはEであり； $Z_5$  は、S、TまたはCであり； $Z_6$  は、R、KまたはHであり； $Z_7$  は、T、SまたはCであり； $Z_8$  は、V、I、L、MまたはAであり； $Z_9$  は、V、I、L、MまたはAであり；そして $Z_{10}$  は、I、L、V、MまたはAである。いくつかの態様において、 $Z_1$  は、Qに限定され；そして/または $Z_2$  は、Aに限

50

定され；そして／または $Z_3$ は、Wに限定され；そして／または $Z_4$ は、Dに限定され； $Z_5$ は、Sに限定され；そして／または $Z_6$ は、Rに限定され；そして／または $Z_7$ は、Tに限定され；そして／または $Z_8$ は、Vに限定され；そして／または $Z_9$ は、Vに限定され；そして／または $Z_{10}$ は、Iに限定される。

【0086】

可変重鎖配列

[0087] 1 N 2 3 の V H。1 N 2 3 ハイブリドーマ由来の陽性 V H クローンを配列決定し、そして4つすべてが機能する V H 鎖をコードすることが見出された。これらの4つのクローンは、1 N 2 3 V H 3 - 5、1 N 2 3 V H 3 - 7、1 N 2 3 V H 2 - 1 および 1 N 2 3 V H 1 - 5 と名付けられた。

10

【0087】

[0088] 1 K 2 3 の V H。1 K 2 3 ハイブリドーマ由来の陽性 V H クローンを配列決定し、そして6つが機能する V H 鎖をコードすることが見出された。これらの6つのクローンは、1 K 2 3 V H 2 - 1 \_\_ 0 9 1 0、1 K 2 3 V H 1 - 4 \_\_ 0 9 0 7、1 K 2 3 V H 1 - 1 0 \_\_ 0 9 0 7、1 K 2 3 V H 8 - 4 \_\_ 0 9 0 7、1 K 2 3 V H 8 - 5 \_\_ 0 9 0 7 および 1 K 2 3 V H 8 - 9 \_\_ 0 9 0 7 と名付けられた。

【0088】

[0089] 2 K 4 の V H。2 K 4 ハイブリドーマ由来の陽性 V H クローンを配列決定し、そして4つが機能する V H 鎖をコードすることが見出された。これらの4つのクローンは、2 K 4 V H 3 - 8、2 K 4 V H 2 - 8、2 K 4 V H 1 - 1 および 2 K 4 V H 1 - 4 と名付けられた。

20

【0089】

[0090] 1 C 9 の V H。1 C 9 ハイブリドーマ由来の陽性 V H クローンを配列決定し、そして8つが機能する V L 鎖をコードすることが見出された。これらの8つのクローンには4つのユニークな配列が含まれ、これらは、1 C 9 V H 2 - 4 0 4 - 8 \_\_ 1 0 2 4、1 C 9 V H 2 - 4 0 5 - 1 2 \_\_ 1 0 2 4、1 C 9 V H 2 - 4 1 1 - 1 \_\_ 1 0 2 4 および 1 C 9 V H 2 - 4 0 6 - 4 \_\_ 1 0 2 4 と名付けられた。

【0090】

[0091] 1 J 2 0 の V H。1 J 2 0 ハイブリドーマ由来の陽性 V H クローンを配列決定し、そして2つが機能する V H 鎖をコードすることが見出された。これらの2つのクローンは、1 J 2 0 V H 1 - 7 \_\_ 0 9 1 0 および 1 J 2 0 V H 1 - 1 - 6 \_\_ 0 8 2 9 と名付けられた。

30

【0091】

[0092] 1 L 2 0 の V H。1 L 2 0 ハイブリドーマ由来の陽性 V H クローンを配列決定し、そして3つが機能する V H 鎖をコードすることが見出された。これらの3つのクローンは、1 L 2 0 V H 2 - 3 \_\_ 0 9 0 3、1 L 2 0 V H 2 - 1 \_\_ 0 9 0 7 および 1 L 2 0 V H 2 - 3 \_\_ 0 9 1 0 と名付けられた。

【0092】

[0093] 1 K 3 の V H。1 K 3 ハイブリドーマ由来の陽性 V H クローンを配列決定し、そして5つが機能する V H 鎖をコードすることが見出された。これらの5つのクローンは、1 K 3 V H 6 - 7、1 K 3 V H 6 - 8 \_\_ 0 8 1 6、1 K 3 V H 3 - 4、1 K 3 V H 3 - 4 および 1 K 3 V H 3 - 3 \_\_ 0 8 1 6 と名付けられた。

40

【0093】

[0094] 1 L 5 の V H。1 L 5 ハイブリドーマ由来の陽性 V H クローンを配列決定し、そして9つが機能する V H 鎖をコードすることが見出された。これらの9つのクローンは、1 L 5 V H 0 0 3 - 5 - 8 \_\_ 0 9 0 7、1 L 5 V H 0 0 3 - 6 - 3 \_\_ 0 9 0 7、1 L 5 V H 0 0 1 - 7 - 6 \_\_ 0 9 0 7、1 L 5 V H 0 0 1 - 6 - 5 \_\_ 0 9 0 7、1 L 5 V H 0 0 1 - 6 - 1 1 \_\_ 0 9 0 7、1 L 5 V H 0 0 3 - 6 - 2 \_\_ 0 9 1 0、1 L 5 V H 0 0 1 - 6 - 1 2 \_\_ 0 9 0 7、1 L 5 V H 0 0 3 - 3 - 4 \_\_ 0 9 0 7 および 1 L 5 V H 0 0 3 - 3 - 8 \_\_ 0 9 0 7 と名付けられた。

50

## 【0094】

[0095]さらなるVH。CTA5\_\_VH、CTB11\_\_VH、CTC2\_\_VH、CTD2\_\_VHと名付けられた4つのさらなるハイブリドーマ抗体に関して、VH配列を得た。

[0096]VH配列整理。上述のVH配列すべての整理を図10に示す。図は、3つのCDR領域のおよその位置(太字、下線)、および各配列に対応する配列番号を示す。

## 【0095】

[0097]ユニークなVH CDR配列。図10のVHのユニークなCDR配列の整理を図12に示す。43のVH配列のうち、図12に示すように、8つのユニークなCDR1配列、9つのユニークなCDR2配列および10のユニークなCDR3配列しかない。

## 【0096】

[0098]VH CDRコンセンサス配列。図12に開示する配列、ならびに天然存在アミノ酸の構造/機能特性に基づいて、VH CDRのコンセンサス配列を決定することも可能である。

## 【0097】

[0099]VH CDR1に関して、1つのコンセンサス配列は、VH CDR1モチーフ1である：

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$  (配列番号142)

式中、 $X_1$ は、GまたはAであり； $X_2$ は、Y、F、W、DまたはEであり； $X_3$ は、T、S、CまたはMであり； $X_4$ は、F、Y、W、V、L、I、MまたはAであり； $X_5$ は、T、S、C、N、またはQであり； $X_6$ は、S、T、C、AまたはGであり； $X_7$ は、Y、F、W、N、Q、GまたはAであり；そして $X_8$ は、W、A、G、YまたはFである。いくつかの態様において、 $X_1$ は、Gに限定され；そして/または $X_2$ は、Y、FまたはDに限定され；そして/または $X_3$ は、TまたはSに限定され；そして/または $X_4$ は、FまたはVに限定され；そして/または $X_5$ は、T、SまたはNに限定され；そして/または $X_6$ は、S、TまたはAに限定され；そして/または $X_7$ は、Y、F、NまたはGに限定され；そして/または $X_8$ は、W、AまたはYに限定される。いくつかの態様において、下位配列 $X_1 X_2 X_3$ は、GYTに限定され；そしていくつかの態様において、下位配列 $X_1 X_2 X_3$ は、GFTに限定される。さらに、いくつかの態様において、下位配列 $X_1 X_7 X_8$ は、SYWに限定される。

## 【0098】

[0100]特に、配列番号109~110および112のVH CDR1配列が図12の他の配列とまったく異なることに注目して、代替コンセンサス配列は、VH CDR1モチーフ2である：

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$  (配列番号143)

式中、 $X_1$ は、GまたはAであり； $X_2$ は、Y、FまたはWであり； $X_3$ は、T、S、CまたはMであり； $X_4$ は、F、YまたはWであり； $X_5$ は、T、SまたはCであり； $X_6$ は、S、TまたはCであり； $X_7$ は、Y、FまたはWであり；そして $X_8$ は、Wである。いくつかの態様において、 $X_1$ は、Gに限定され；そして/または $X_2$ は、YまたはFに限定され；そして/または $X_3$ は、TまたはSに限定され；そして/または $X_4$ は、Fに限定され；そして/または $X_5$ は、TまたはSに限定され；そして/または $X_6$ は、SまたはTに限定され；そして/または $X_7$ は、YまたはFに限定され；そして/または $X_8$ は、Wに限定される。いくつかの態様において、下位配列 $X_1 X_2 X_3$ は、GYTに限定され；そしていくつかの態様において、下位配列 $X_1 X_2 X_3$ は、GFTに限定される。さらに、いくつかの態様において、下位配列 $X_1 X_7 X_8$ は、SYWに限定される。

## 【0099】

[0101]VH CDR2に関して、1つのコンセンサス配列は、VH CDR2モチーフ1である：

$Y_1 Y_2 Y_3 Y_4 Y_5 Y_6 Y_7 Y_8 Y_9 Y_{10}$  (配列番号144)

式中、 $Y_1$ は、I、L、V、MまたはAであり； $Y_2$ は、Y、F、H、R、K、SまたはTであり； $Y_3$ は、P、S、T、Y、F、R、KまたはHであり； $Y_4$ は、G、A、S、

10

20

30

40

50

T、K、R、H、DまたはEであり；Y<sub>5</sub>は、T、Sまたは存在せず；Y<sub>6</sub>は、R、K、Hまたは存在せず；Y<sub>7</sub>は、N、Q、D、E、G、Aまたは存在せず；Y<sub>8</sub>は、G、A、S、T、YまたはFであり；Y<sub>9</sub>は、D、E、A、G、NまたはQであり；そしてY<sub>10</sub>は、T、S、I、L、V、M、A、K、RまたはHである。いくつかの態様において、Y<sub>1</sub>は、Iに限定され；そして/またはY<sub>2</sub>は、Y、H、R、KまたはSに限定され；そして/またはY<sub>3</sub>は、P、S、YまたはRに限定され；そして/またはY<sub>4</sub>は、G、S、KまたはDに限定され；そして/またはY<sub>5</sub>は、Tまたは存在しないに限定され；そして/またはY<sub>6</sub>は、Rまたは存在しないに限定され；そして/またはY<sub>7</sub>は、N、D、Gまたは存在しないに限定され；そして/またはY<sub>8</sub>は、G、A、SまたはYに限定され；そして/またはY<sub>9</sub>は、D、E、AまたはNに限定され；そして/またはY<sub>10</sub>は、T、IまたはKに限定される。

10

## 【0100】

[0102]特に、配列番号120～121のVH CDR2配列が図12の他の配列とまったく異なることに注目して、代替コンセンサ配列は、VH CDR2モチーフ2である：

Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>3</sub>Y<sub>4</sub>Y<sub>5</sub>Y<sub>6</sub>Y<sub>7</sub>Y<sub>8</sub>Y<sub>9</sub>Y<sub>10</sub>（配列番号145）

式中、Y<sub>1</sub>は、I、L、V、MまたはAであり；Y<sub>2</sub>は、Y、F、H、R、K、SまたはTであり；Y<sub>3</sub>は、P、S、T、YまたはFであり；Y<sub>4</sub>は、G、A、S、T、K、RまたはHであり；Y<sub>5</sub>は、T、Sまたは存在せず；Y<sub>6</sub>は、R、K、Hまたは存在せず；Y<sub>7</sub>は、N、Q、D、Eまたは存在せず；Y<sub>8</sub>は、G、A、S、T、YまたはFであり；Y<sub>9</sub>は、D、E、A、G、NまたはQであり；そしてY<sub>10</sub>は、T、S、I、L、V、MまたはAである。いくつかの態様において、Y<sub>1</sub>は、Iに限定され；そして/またはY<sub>2</sub>は、Y、H、RまたはSに限定され；そして/またはY<sub>3</sub>は、P、SまたはYに限定され；そして/またはY<sub>4</sub>は、G、SまたはKに限定され；そして/またはY<sub>5</sub>は、Tまたは存在しないに限定され；そして/またはY<sub>6</sub>は、Rまたは存在せずに限定され；そして/またはY<sub>7</sub>は、N、Dまたは存在しないに限定され；そして/またはY<sub>8</sub>は、G、A、SまたはYに限定され；そして/またはY<sub>9</sub>は、D、E、AまたはNに限定され；そして/またはY<sub>10</sub>は、TまたはIに限定される。

20

## 【0101】

[0103]VH CDR3に関して、1つのコンセンサ配列は、VH CDR3モチーフ1である：

Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub>Z<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>Z<sub>7</sub>Z<sub>8</sub>Z<sub>9</sub>Z<sub>10</sub>Z<sub>11</sub>Z<sub>12</sub>Z<sub>13</sub>Z<sub>14</sub>Z<sub>15</sub>（配列番号146）

式中、Z<sub>1</sub>は、A、G、V、L、IまたはMであり；Z<sub>2</sub>は、R、K、H、CまたはMであり；Z<sub>3</sub>は、G、A、R、K、H、S、T、Y、F、W、D、Eまたは存在せず；Z<sub>4</sub>は、Y、F、W、N、Q、G、A、R、K、Hまたは存在せず；Z<sub>5</sub>は、S、T、N、Q、E、Dまたは存在せず；Z<sub>6</sub>は、D、Eまたは存在せず；Z<sub>7</sub>は、L、I、V、M、A、S、Tまたは存在せず；Z<sub>8</sub>は、L、I、V、M、Aまたは存在せず；Z<sub>9</sub>は、G、A、R、K、Hまたは存在せず；Z<sub>10</sub>は、I、L、V、M、A、N、Q、R、K、Hまたは存在せず；Z<sub>11</sub>は、A、M、F、Y、W、S、T、Gまたは存在せず；Z<sub>12</sub>は、W、Y、F、A、Gまたは存在せず；Z<sub>13</sub>は、F、Y、W、G、A、MまたはCであり；Z<sub>14</sub>は、A、G、M、D、E、W、YまたはFであり；そしてZ<sub>15</sub>は、Y、F、W、G、AまたはVであるいくつかの態様において、Z<sub>1</sub>は、AまたはVに限定され；そして/またはZ<sub>2</sub>は、R、KまたはCに限定され；そして/またはZ<sub>3</sub>は、G、R、S、Y、Dまたは存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>4</sub>は、Y、N、G、Rまたは存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>5</sub>は、S、N、Eまたは存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>6</sub>は、Dまたは存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>7</sub>は、L、Sまたは存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>8</sub>は、Lまたは存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>9</sub>は、G、Rまたは存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>10</sub>は、I、N、R、Lまたは存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>11</sub>は、A、F、S、Gまたは

30

40

50

存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>12</sub>は、W、Y、Aまたは存在しないに限定され；そして/またはZ<sub>13</sub>は、F、Y、GまたはMに限定され；そして/またはZ<sub>14</sub>は、A、D、WまたはYに限定され；そして/またはZ<sub>15</sub>は、Y、F、WまたはGに限定される。

【0102】

[0104]開示する主題は、前述の例示的態様で記載されそして例示されているが、本開示は例としてのみ作製され、そして以下の請求項によってのみ制限される、開示する主題の精神および範囲から逸脱することなく、開示する主題の実行の詳細において、多くの変化が行われうるということが理解される。

【図1】

ヒト VASA アミノ酸配列  
( 寄託 : NP\_077726; 配列番号 1))

1 mgdedweaei nphmssyvip fekdrysgen qdnfnrtpas ssemddgpsr rdhfmksqfa  
61 sqnfngrda gecnkronts tmogfvgvks fgnrgfnsr fedqdsqfw ressndcedn  
121 ptrnrgfskr ggyrdgnse asqpyrrgr qsfrcrggf glgpnndld pdecmqrtgg  
181 lfgrsrpvis gtngdntsqe rsgsqsegrg ykglneevit gsgkswkse aeggesdrtg  
241 gpkvtyppp ppededsifa hvqtginfdk ydfilvevsg ndappailtf eeanlqtlm  
301 nniakagytk ltpvqkysip illagrldma caqtgsgkta aflpilahm mhdgitasrf  
361 kelqepeci vaptrelvng ylearkfsf gtcvrvaviy gqtqghsvr qivggcnilc  
421 tpgrlmndil gekiglkqvi ylvldeadr ldmqfcpem kkliscpmp keqrqllfs  
481 atfpeeiqr laaeifknsy ifvavggvga crdvqgtllq vqgyskrekl veilrnigde  
541 rtmvfvetkk kadfiatfl gekisttsih qdreqrere algdfrogko pvlvatsvaa  
601 rglldienvq hvinfldpst ideyvhriqr grcngtqra sfftdsdnh laqplvkvls  
661 daqqdvpaw eeiafstyip psfssstrgg avfasvdrk nyqgkhlint agissqapn  
721 pvddeswd

図 1

【図2】

マウス VASA 相同体アミノ酸配列  
( 寄託 : NP\_001139357; 配列番号 2))

1 mgdedweaei lkphvssyvp vfekdryssg angdtfnrts assemddgpps grddfnrsgf  
61 psgrslgsrd igesskkent sttgqfgrgk fgfnrgflnn kfeegdsqfw wkesnndced  
121 nqtrsrqfsk rggcqdqnds easqpfrrg rgsfrcrggf flgprnpses dcdqgtqrgg  
181 glfgrsrkpa sdsngdtyq rsgsqsggyy kglneevvtg sgknskset eggesdsqg  
241 pkvtyipppp pededsifah yvtginfdky dtilvevsgn dappailtfe eanlqtlm  
301 niakagytkl tlvqkysipi vlagrdmac aqtgsgktaa filpilahm rdgitasrfk  
361 elqepeciiv aptrelinqi ylearkfsf gtcvrvaviy gqtqghsvr ivggcnilca  
421 tpgrlmndiig kekgikqvk ylvldeadrm ldmqfcpem kkliscpmp keqrqllfs  
481 atfpeeiqr agdflkssyl ifvavggvga crdvqgtllq vqgyskrekl veilrnigde  
541 rtmvfvetkk kadfiatflc gekisttsih qdreqrere algdfrogko pvlvatsvaa  
601 rglldienvq hvinfldpsti deyvhriqr grcngtqra sfftdsdnh laqplvkvls  
661 daqqdvpawl eeiafstyip psfssstrgg avfasvdrk nyqgkhlint agissqapn  
721 pvddeswd

図 2

【図3】

ヒト ...nvfasvdrk gkstlntagfsssqapnpvddeswd  
(配列番号 1 残基 690-724)  
マウス ...avfasvdrknyqgkhlntagfsssqapnpvddeswd  
(配列番号 2 残基 691-728)

図 3

【図4】

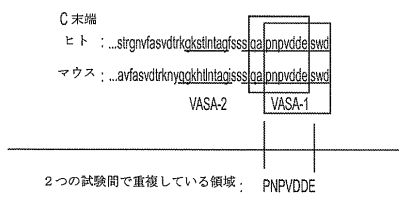


図 4A

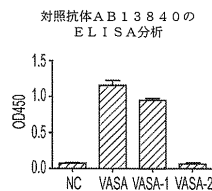


図 4B

【 図 5 】

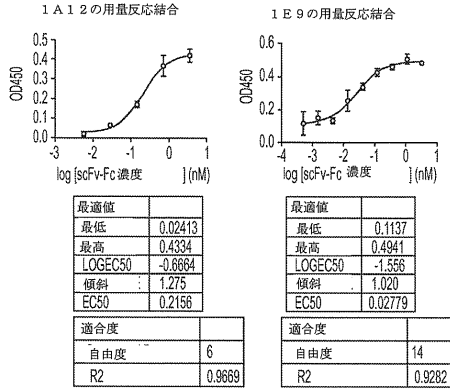


図 5A

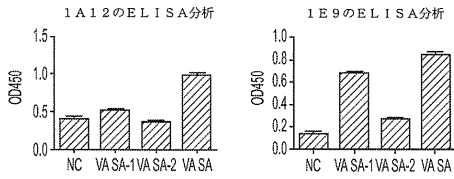


図 5B

【 図 6 】

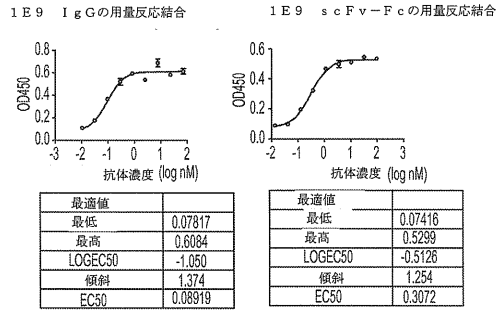


図 6A

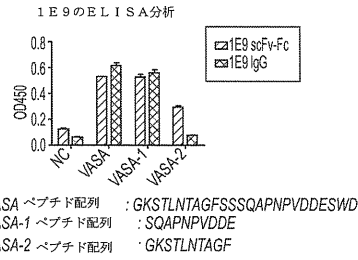


図 6B

【 図 7 - 1 】

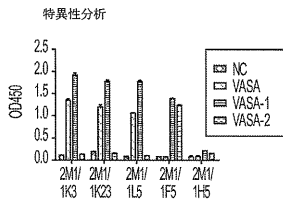
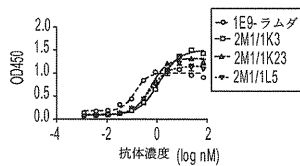


図 7A

VASA抗体の用量反応曲線

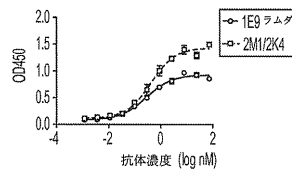


	1E9-ラムダ	2M1/1K3	2M1/1K23	2M1/1L5
最適値				
最低	0.1822	0.09026	0.1057	0.08716
最高	1.007	1.509	1.326	1.154
LOGEC50	-0.8650	0.09294	-0.2333	-0.2855
傾斜	1.763	1.072	1.338	1.258
EC50	0.1365	1.239	0.5844	0.5182

図 7B

【 図 7 - 2 】

VASA抗体の用量反応結合

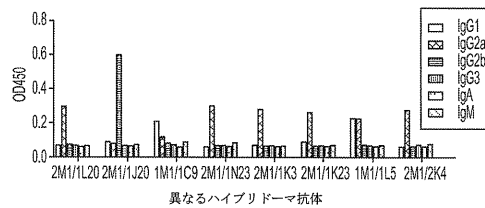


	1E9-ラムダ	2M1/2K4
最適値		
最低	0.08445	0.1134
最高	0.9319	1.437
LOGEC50	-0.5576	-0.3812
傾斜	0.8795	0.9339
EC50	0.2770	0.4157

図 7C

【 図 8 】

ハイブリドーマサブタイプ決定



異なるハイブリドーマ抗体

図 8

【 図 9 - 1 】

配列番号	クローン名	CR1	CR2
3	1N23VL5-5	FTVWTFSLPSTLGGQASISCR-SSQSLVHSGNGTYLHHVLAQFGSPKLLIVKYSRF	60
4	1N23VL5-8	SVVWTFSLPSTLGGQASISCR-SSQSLVHSGNGTYLHHVLAQFGSPKLLIVKYSRF	60
5	1N23VL1-8	LVMWTFSLPSTLGGQASISCR-SSQSLVHSGNGTYLHHVLAQFGSPKLLIVKYSRF	60
6	1N23VL1-2	SVLWTFSLPSTLGGQASISCR-SSQSLVHSGNGTYLHHVLAQFGSPKLLIVKYSRF	60
7	1N23VL1-4	YLVWTFSLPSTLGGQASISCR-SSQSLVHSGNGTYLHHVLAQFGSPKLLIVKYSRF	60
8	1N23VL2-5	QVHWTFSLPSTLGGQASISCR-SSQSLVHSGNGTYLHHVLAQFGSPKLLIVKYSRF	60
9	1N23VL1-2	RFVWTFSLPSTLGGQASISCR-SSQSLVHSGNGTYLHHVLAQFGSPKLLIVKYSRF	60
10	1N23VL2-6	VFWWTFSLPSTLGGQASISCR-SSQSLVHSGNGTYLHHVLAQFGSPKLLIVKYSRF	60
11	1N23VL2-8	LIVWTFSLPSTLGGQASISCR-SSQSLVHSGNGTYLHHVLAQFGSPKLLIVKYSRF	60
12	1K23VL2-3	1K23VL2-3 0829	60
13	2K4VL1-3	2K4VL1-3 0820	60
14	2K4VL1-4	2K4VL1-4	60
15	2K4VL1-1	2K4VL1-1	60
16	2K4VL1-6	2K4VL1-6 0820	60
17	1C9VL2-4	1C9VL2-4	60
18	1C9VL2-6	1C9VL2-6	60
19	1C9VL2-3	1C9VL2-3 0816	60
20	2K4VL2-5	2K4VL2-5 0816	60
21	2K4VL2-4	2K4VL2-4	60
22	2K4VL2-6	2K4VL2-6 0816	60
23	1Z20VL5-2	1Z20VL5-2 0907	60

図 9A

【 図 9 - 2 】

24	1Z20VL5-6	0907	60
25	1Z20VL4-3	0907	60
26	1Z20VL5-0912	0917	60
27	1K3VL2-5		60
28	1K3VL2-3		60
29	1K3VL2-4		60
30	2K4VL2-5		60
31	1L5VL2-4		60
32	1L5VL3-1		60
33	CTC6_VL		60
34	CTM4_VL		55
35	CTM4_VL		55
36	CTM4_VL		55
37	1E3_VL		56
38	1A1Z_VL		56

図 9A 続き

【 図 9 - 3 】

配列番号	クローン名	CR3
3	1N23VL5-5	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
4	1N23VL5-8	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
5	1N23VL1-8	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
6	1N23VL1-2	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
7	1N23VL1-4	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
8	1K23VL2-5	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
9	1N23VL1-2	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
10	1K23VL2-6	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
11	1K23VL2-8	1K23VL2-8 0822
12	1K23VL2-3	1K23VL2-3 0829
13	2K4VL1-3	2K4VL1-3 0820
14	2K4VL1-4	2K4VL1-4
15	2K4VL1-1	2K4VL1-1
16	2K4VL1-6	2K4VL1-6 0820
17	1C9VL2-4	1C9VL2-4
18	1C9VL2-6	1C9VL2-6
19	1C9VL2-3	1C9VL2-3 0816
20	2K4VL2-5	2K4VL2-5 0816
21	2K4VL2-4	2K4VL2-4

図 9B

【 図 9 - 4 】

22	2K4VL2-6	0816	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
23	1Z20VL5-2	0907	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
24	1Z20VL5-6	0907	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
25	1Z20VL4-3	0907	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
26	1L20VL5-0912	0917	SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
27	1K3VL2-5		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
28	1K3VL2-3		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
29	1K3VL2-4		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
30	2K4VL2-5		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
31	1L5VL2-4		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
32	1L5VL3-1		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
33	CTC6_VL		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
34	CTM4_VL		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
35	CTM4_VL		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
36	CTM4_VL		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
37	1E3_VL		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112
38	1A1Z_VL		SGVPDFS6S6S6GTDFLKLINRVPAEDDGVYFCQSAHVP-WTFGGGTMLEIK-112

図 9B 続き

縦横可変領域配列 (続き)

縦横可変領域配列

【 10 - 1 】

配列番号	クローン名	COR1	COR2
39	IK3VH6-7	LIVDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
40	IK3VH6-8_0816	LIVDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
41	IK3VH3-8	LIVDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
42	ZK4VH1-8	LIVDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
43	IK3VH3-4	SVIADQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
44	IK3VH3-3_0816	SVIADQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
45	ZK4VH2-8	RSQVADQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
46	ZK4VH1-1	SVIADQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
47	ZK4VH1-4	SVIADQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
48	IC9_VH404-8_1024	QVVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
49	IC9_VH405-12_1024	QVVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
50	IC9_VH411-1_1024	QVVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
51	IC9_VH406-4_1024	QVVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
52	IL20VH2-3_0903	QVVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
53	IL20VH2-1_0907	QVVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
54	IL20VH2-3_0910	QVVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
55	IL20VH1-7_0910	DVWLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
56	IL20VH1-11_0829	QVVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
57	IL15VH003-5-8_0907	QVVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
58	IL15VH003-6-3_0907	EVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58
59	IL15VH001-7-5_0907	EVDLQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--NGFT	58

図10A

【 10 - 3 】

配列番号	クローン名	COR3	
39	IK3VH6-7	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	117
40	IK3VH6-8_0816	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	117
41	IK3VH3-8	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	117
42	ZK4VH1-8	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	117
43	IK3VH3-4	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	117
44	IK3VH3-3_0816	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	117
45	ZK4VH2-8	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	117
46	ZK4VH1-1	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	117
47	ZK4VH1-4	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	117
48	IC9_VH404-8_1024	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	116
49	IC9_VH405-12_1024	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	116
50	IC9_VH411-1_1024	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	116
51	IC9_VH406-4_1024	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	116
52	IL20VH2-3_0903	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
53	IL20VH2-1_0907	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
54	IL20VH2-3_0910	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
55	IL20VH1-7_0910	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
56	IL20VH1-11_0829	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
57	IL15VH003-5-8_0907	RVTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
58	IL15VH003-6-3_0907	RLAQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
59	IL15VH001-7-5_0907	RLAQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
60	IL15VH001-6-5_0907	RLAQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
61	IL15VH001-6-11_0907	RLAQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118

図10B

【 10 - 2 】

58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58
58	EVLDQSGALRGRGASVLSKASGVTTFSTLWQWVQKQREGLEMTGAIIPG--DSEET	58

図10A 続き

【 10 - 4 】

118	RLAQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
118	RLAQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
118	RLAQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	118
113	RPTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	113
113	RPTQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	113
115	YVADSVQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	115
115	YVADSVQRFKGRATLFDKSSSTAIAWQSSLASEDSAVTTCARG---GIAWPAVWGGTILVTVA	115
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
120	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	120
116	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	116
116	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	116
117	YVPLSKRISITFDPSKQVYLIQNSVTTPHATTCARNSLRLRGLNDYRGQGSVTVSS	117

図10B 続き

重複可変領域配列番号

重複可変領域配列番号 (続き)

## 【 図 1 1 】

ユニークな軽鎖CDR配列整列

配列番号	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3
83	QSLVHSHGNTY	89	KVS	96	SQSAHVP-WT
84	QHLVHSHGNTY	90	KIS	97	SQSTHVP-PT
85	KSLHSHGNTY	91	RMS	98	FQGSFV--LT
86	QNI-----NSF	92	RMS	99	MQHLEYP-LT
87	SNI-----GNY	93	RTH	100	LQQLEYP-PT
88	KL-----GKY	94	DNN	101	MQGLEYP-LT
		95	QDK	102	LQYDFP-LT
				103	SSYTSSSSW
				104	QAWDSRTVVI

図 1 1

## 【 図 1 2 】

ユニークな重鎖CDR配列整列

配列番号	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3
105	GYFTTSYW	113	IYPG--NGDT	122	ARG----GIAWFAY
106	GFTFTNYW	114	IYPG--NGET	123	ASGYP-----YFAY
107	GYSTTSYW	115	IYPG--DGET	124	ARG--D--GHWFPAY
108	GYFTTFW	116	IHPS--DSET	125	ACRY-D---RSYFDY
109	GFTFNANA	117	IYPG--DAAT	126	VRS-----GDF
110	GDSVTSCY	118	IRSKTRNYAI	127	VR---D-----GWW
111	GFTFSSYW	119	ISYS---GHT	128	ARYNS-LLRLGANDY
112	GFTFSNYG	120	IKRD--GSEK	129	ARGGH-S-----YYG
		121	ISYD--GTHK	130	ARGGN-S-----FRD
				131	AKDRED----G-MDV

図 1 2

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成29年6月30日(2017.6.30)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 0 3 5

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 0 3 5 】

[0045]いくつかの態様において、本発明は、本発明の抗VASA抗体を発現している、CHO細胞を含む、哺乳動物細胞を提供する。しかし、当業者は、細菌、酵母、昆虫および哺乳動物系を含む、多様な宿主細胞において、抗体を発現させることも可能である。例えば、本明細書にその全体が援用される、Vermaら(1998), J. Immunol. Methods 216(1-2): 165-81を参照されたい。本発明は、非限定的に以下の態様を含む。

[ 態様 1 ]

ヒトVASAタンパク質に特異的に結合する抗体であって：

免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、

前記軽鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 8 3 ~ 8 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR 1 領域；

( i i ) 配列番号 8 9 ~ 9 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR 2 領域；および/または

( i i i ) 配列番号 9 6 ~ 1 0 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR 3 領域

を含む、前記抗体。

## [ 態様 2 ]

ヒト V A S A タンパク質に特異的に結合する抗体であって：

免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、

前記重鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 1 0 5 ~ 1 1 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 1 1 3 ~ 1 2 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および/または

( i i i ) 配列番号 1 2 2 ~ 1 3 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体。

## [ 態様 3 ]

ヒト V A S A タンパク質に特異的に結合する抗体であって：

免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、

前記軽鎖の可変領域が：

( i ) V L C D R 1 モチーフ 1 ~ 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) V L C D R 2 モチーフ 1 ~ 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および/または

( i i i ) V L C D R 3 モチーフ 1 ~ 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体。

## [ 態様 4 ]

ヒト V A S A タンパク質に特異的に結合する抗体であって：

免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、

前記重鎖の可変領域が：

( i ) V H C D R 1 モチーフ 1 ~ 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) V L C D R 2 モチーフ 1 ~ 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および/または

( i i i ) V L C D R 3 モチーフ 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体。

## [ 態様 5 ]

態様 1 ~ 4 のいずれか一項の抗体を含む抗体調製物。

## [ 態様 6 ]

モノクローナル抗体調製物である、態様 5 の抗体調製物。

## [ 態様 7 ]

少なくとも 2 つのモノクローナル抗体調製物の混合物である、態様 5 の抗体調製物。

## [ 態様 8 ]

態様 1 ~ 4 のいずれか一項の重鎖または軽鎖をコードする単離核酸分子。

## [ 態様 9 ]

クローニングベクター、発現ベクター、異種組換えベクターおよびウイルス組込みベクターからなる群より選択される、態様 8 の単離核酸。

## [ 態様 10 ]

態様 8 ~ 9 のいずれか一項の核酸で形質転換された細胞。

## [ 態様 11 ]

哺乳動物細胞である、態様 10 の細胞。

## [ 態様 12 ]

齧歯類細胞である、態様 11 の細胞。

## [ 態様 1 3 ]

CHO細胞である、態様 1 1 の細胞。

## [ 態様 1 4 ]

ヒト細胞である、態様 1 1 の細胞。

## [ 態様 1 5 ]

VASAタンパク質を発現している細胞を単離する方法であって：

( a ) 細胞集団を得て；

( b ) 態様 1 ~ 4 のいずれか一項の多数の抗体と、細胞集団を接触させ；そして

( c ) 抗体と特異的に結合しない集団中の細胞から、抗体と特異的に結合する集団中の細胞を分離する

工程を含む、前記方法。

## [ 態様 1 6 ]

細胞を蛍光活性化細胞ソーティングによって分離する、態様 1 5 の方法。

## [ 態様 1 7 ]

蛍光活性化細胞ソーティングによって、固定二次抗体を用いて細胞を分離する、態様 1 5 の方法。

## 【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ヒトVASAタンパク質に特異的に結合する抗体であって、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、

a ) ここにおいて、前記軽鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 8 3 ~ 8 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 8 9 ~ 9 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および

( i i i ) 配列番号 9 6 ~ 1 0 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含み；そして、

b ) 前記重鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 1 0 5 ~ 1 1 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 1 1 3 ~ 1 2 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および

( i i i ) 配列番号 1 2 2 ~ 1 3 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体。

【 請求項 2 】

抗体調製物であって：

ヒトVASAタンパク質に特異的に結合する抗体であって、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、

a ) ここにおいて、前記軽鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 8 3 ~ 8 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 8 9 ~ 9 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および

( i i i ) 配列番号 9 6 ~ 1 0 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含み；そして、

b ) 前記重鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 1 0 5 ~ 1 1 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 1 1 3 ~ 1 2 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および

( i i i ) 配列番号 1 2 2 ~ 1 3 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体、

を含む、前記抗体調製物。

【請求項 3】

モノクローナル抗体調製物である、請求項 2 の抗体調製物。

【請求項 4】

少なくとも 2 つのモノクローナル抗体調製物の混合物である、請求項 2 の抗体調製物。

【請求項 5】

ヒト V A S A タンパク質に特異的に結合する抗体であって、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、

a ) ここにおいて、前記軽鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 8 3 ~ 8 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 8 9 ~ 9 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および

( i i i ) 配列番号 9 6 ~ 1 0 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含み；そして、

b ) 前記重鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 1 0 5 ~ 1 1 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 1 1 3 ~ 1 2 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および

( i i i ) 配列番号 1 2 2 ~ 1 3 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含む、前記抗体の重鎖または軽鎖をコードする単離核酸分子。

【請求項 6】

クローニングベクター、発現ベクター、異種組換えベクターおよびウイルス組込みベクターからなる群より選択される、請求項 5 の単離核酸。

【請求項 7】

V A S A タンパク質を発現している細胞を単離する方法であって：

( a ) 細胞集団を得て；

( b ) ヒト V A S A タンパク質に特異的に結合する抗体であって、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、

a ) ここにおいて、前記軽鎖の可変領域が：

( i ) 配列番号 8 3 ~ 8 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 領域；

( i i ) 配列番号 8 9 ~ 9 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 領域；および

( i i i ) 配列番号 9 6 ~ 1 0 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3 領域

を含み；そして、

b) 前記重鎖の可変領域が：

(i) 配列番号105～112からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1領域；

(ii) 配列番号113～121からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2領域；および

(iii) 配列番号122～131からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3領域

を含む、前記抗体を含む、多数の抗体と、細胞集団を接触させ；そして

(c) 抗体と特異的に結合しない集団中の細胞から、抗体と特異的に結合する集団中の細胞を分離する

工程を含む、前記方法。

【請求項8】

細胞を蛍光活性化細胞ソーティングによって分離する、請求項7の方法。

【請求項9】

蛍光活性化細胞ソーティングによって、固定二次抗体を用いて細胞を分離する、請求項7の方法。

【請求項10】

ヒトV<sub>AS</sub>Aタンパク質に特異的に結合する抗体であって、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含み、

a) ここにおいて、前記軽鎖の可変領域が：

(i) 配列番号83～88からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1領域；

(ii) 配列番号89～95からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2領域；および

(iii) 配列番号96～104からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3領域

を含み；そして、

b) 前記重鎖の可変領域が：

(i) 配列番号105～112からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1領域；

(ii) 配列番号113～121からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2領域；および

(iii) 配列番号122～131からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3領域

を含む、前記抗体の重鎖または軽鎖をコードする核酸分子で形質転換された細胞。

【請求項11】

単離核酸分子が、クローニングベクター、発現ベクター、異種組換えベクターおよびウイルス組込みベクターからなる群より選択される、請求項10の細胞。

【請求項12】

哺乳動物細胞である、請求項10の細胞。

【請求項13】

齧歯類細胞である、請求項12の細胞。

【請求項14】

チャイニーズハムスター(CHO)細胞である、請求項12の細胞。

【請求項15】

ヒト細胞である、請求項12の細胞。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/US2015/050449

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(B) - C07K 16/40 (2016.01) CPC - C07K 16/40 (2016.02) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B) - A61K 39/395; C07K 16/40; G01N 33/569 (2016.01) CPC - C07K 16/40, 2317/21, 2317/565; G01N 33/56966 (2016.02)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/130.1, 133.1; 530/387.1 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed. Search terms used: antibodoy, VASA, CDR, heavy chain, light chain, Fc.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,875,854 B1 (CASTRILLON) 05 April 2005 (05.04.2005) entire document	1-9, 15-17
P, A	CASTRILLON et al. "The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage," PNAS, 15 August 2015 (15.08.2015), Vol. 97, No. 17, Pgs. 9585-9590. entire document	1-9, 15-17
A	MEDRANO et al. "Divergent RNA-Binding Proteins, DAZL and VASA, Induce Meiotic Progression in Human Germ Cells Derived In Vitro," Stem Cells, 12 December 2011 (12.12.2011), Vol. 30, Pgs. 441-451. entire document	1-9, 15-17
A	RENAULT et al. "vasa is expressed in somatic cells of the embryonic gonad in a sex-specific manner in Drosophila melanogaster," Biology Open, 20 August 2012 (20.08.2012), Vol. 2012, Pgs. 1-6. entire document	1-9, 15-17
A	US 2011/0244485 A1 (YOSHIZAKI et al) 06 October 2011 (06.10.2011) entire document	1-9, 15-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 30 March 2016		Date of mailing of the international search report <b>14 APR 2016</b>
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/050449

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  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:
  
3.  Claims Nos.: 10-14  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see Extra Sheet.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  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.:
4.  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.:  
1-9 and 15-17 restricted to an antibody of SEQ ID NOs: 3, 39, 83, 89, 96, 105, 113, & 122.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/050449

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

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 need to be paid.

Group I+: claims 1-9 and 15-17 are drawn to an antibody that specifically binds to a human VASA protein.

The first invention of Group I+ is restricted to an anti-VASA antibody comprising a light chain variable region and a heavy chain variable region, wherein in the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:3, the light chain further comprising light chain complementary determining regions LCDR1, LCDR2, and LCDR3, where LCDR1 is selected to be SEQ ID NO:83, LCDR2 is selected to be SEQ ID NO:89, and LCDR3 is selected to be SEQ ID NO:96; and a heavy chain variable region, wherein the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO: 39, the heavy chain further comprising heavy chain complementary determining regions HCDR1, HCDR2, and HCDR3, where HCDR1 is selected to be SEQ ID NO: 105, HCDR2 is selected to be SEQ ID NO: 113, and HCDR3 is selected to be SEQ ID NO: 122. It is believed that claims 1-9 and 15-17 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOs: 3, 39, 83, 89, 96, 105, 113, and 122.

Applicant is invited to elect additional light chain CDRs with corresponding SEQ ID NO and/or heavy chain CDRs with corresponding SEQ ID NO to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an anti-VASA antibody comprising a light chain variable region and a heavy chain variable region, wherein in the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:14, the light chain further comprising light chain complementary determining regions LCDR1, LCDR2, and LCDR3, where LCDR1 is selected to be SEQ ID NO:84, LCDR2 is selected to be SEQ ID NO:89, and LCDR3 is selected to be SEQ ID NO:98; and a heavy chain variable region, wherein the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO: 48, the heavy chain further comprising heavy chain complementary determining regions HCDR1, HCDR2, and HCDR3, where HCDR1 is selected to be SEQ ID NO: 106, HCDR2 is selected to be SEQ ID NO: 114, and HCDR3 is selected to be SEQ ID NO: 123. Additional light chain CDRs with corresponding SEQ ID NO and/or heavy chain CDRs with corresponding SEQ ID NO will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on 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/examined.

The inventions listed in Groups I+ 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:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element for the binding of VASA, requiring the selection of alternatives for each heavy and light chain CDR, where "the variable region of said light chain comprises: (i) a CDR 1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 83-88; (ii) a CDR2 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 89-95; and/or (iii) a CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 96-104" and "the variable region of said heavy chain comprises: (i) a CDR1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 105-112; (ii) a CDR2 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 113-121; and/or (iii) a CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 122-131".

The Groups I+ share the technical features of an antibody that specifically binds to a human VASA protein comprising an immunoglobulin heavy chain and an immunoglobulin light chain, wherein the variable region of said light chain comprises a LCDR1, LCDR2, and/or a LCDR3, and a heavy chain variable region comprising a HCDR1, HCDR2, and/or a HCDR3. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 6,875,854 B1 to Castrillon discloses an antibody that specifically binds to a human VASA protein (the isolated binding polypeptides include antibodies and fragments of antibodies (e.g., Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd and antibody fragments which include a CDR3 region which binds selectively to the human VASA polypeptide), Col. 4, Lns. 51-55) comprising: an immunoglobulin heavy chain and an immunoglobulin light chain (Fab fragments consist of a covalently bound antibody light chain and a portion of the antibody heavy chain denoted Fd, Col. 18, Lns. 42-44), wherein the variable region of said light chain comprises a LCDR1, LCDR2, and/or a LCDR3, and a heavy chain variable region comprising a HCDR1, HCDR2, and/or a HCDR3 (in both the heavy chain Fd, fragment and the light chain of IgG immunoglobulins, there are four framework regions (FR1 through FR4) separated respectively by three complementarity determining regions (CDR1 through CDR3), Col. 18, Lns. 53-58).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

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

(72)発明者 ウィーバー, デヴィッド・ティー.

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02467, ニュートン, オーデュボン・ドライブ 6

(72)発明者 チャン, ポー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01940, リンフィールド, ビレッジ・ロウ 14

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QR48 QS05 QS15 QX02

4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01

BA02 BA25 CA25 CA44 CA46

4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 DA76 FA72 FA74

专利名称(译)	抗VASA抗体，及其产生和使用的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017532953A</a>	公开(公告)日	2017-11-09
申请号	JP2017511337	申请日	2015-09-16
[标]发明人	ウィーバー・デヴィッド・テイー チャン・ポー		
发明人	ウィーバー, デヴィッド・テイー, チャン, ポー		
IPC分类号	C12N15/02 C12N5/10 C07K16/18 G01N33/53 C12Q1/02		
CPC分类号	C07K16/40 C07K2317/14 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/92 C12Y306/04013 G01N33/566 G01N33/56966 C07K2317/24 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/52 G01N33/573 G01N2333/914		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.C C12N5/10 C07K16/18 G01N33/53.Y C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS05 4B063/QS15 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA83X 4B065/AA86X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	山本修 宮前徹 中西 基晴		
优先权	62/051130 2014-09-16 US 62/089054 2014-12-08 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了以高亲和力特异性结合VASA的抗VASA抗体 ( mAb )，尤其是人源化mAb。提供了这些抗VASA mAb的轻链和重链的CDR的氨基酸序列，以及这些CDR的共有序列。本公开还提供了编码抗VASA mAb的核酸分子，表达载体，宿主细胞，用于制备抗VASA mAb的方法和用于表达抗VASA mAb的方法。最后，公开了使用抗VASA mAb分离和/或纯化表达VASA的细胞的方法。

Human VASAAmino Acid Sequence  
(Accession: NP\_077726; SEQ ID NO: 1)

```

1  agdedveeei nphssvppi fekdrysgn qdnfrtqas sseendgpr rdhfrkspfa
61  sgrnfgardn gecnkrntis lmggigvgs lgnrgfnsr fedqsssfz resendcedn
121  pirnrgfskr qpyrdqnnse asgpyrrgr qeirgrrgf gispsndid pdeumqrtqy
181  ifgsrnpuls qiqnqdtqs rsegsesrg ykglneavit gsgknawkse aeegsesdtq
241  qvvtylppp ppedacsifa hycgtgnfdk ydtllvevsq ndappailtf eeantqtlh
301  nrlakaytk ltpvqkysip illagrldma caqtsqkta aflipilaha mdgltasrf
361  keiqepecii vaptrelvng iylearkfsf qtcuvraviv gqtlqhsir qivogcaile
421  atpgrlndii gkekigkqn iyivideadr nldngfypen kkliscqmp skeozqlaf
481  astipaeiqr laanfkxny lfavagqevg asrdvqqlvi qvovfakrek lvallrnqg
541  ertmvivetk kkadiatfl cgektsttsi hndreqrere qaladrfrqg opvlvatava
601  argldienvg hvinfalpst idevhrigr tgrcngtqra isfildiesdn blagplvkvf
661  tdaqgqvpaw leelafstyi pglfsgstrgn vfasvdrky kstlntagfa ssqapqvad
721  eswg

```

FIG. 1