

(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2018-527895

(P2018-527895A)

(43) 公表日 平成30年9月27日 (2018.9.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08 Z N A	4 B 0 6 5
<b>C O 7 K 16/40 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/40	4 H O 4 5
<b>C 1 2 N 5/16 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/16	
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)		

(21) 出願番号 特願2017-568233 (P2017-568233)  
 (86) (22) 出願日 平成28年6月29日 (2016.6.29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年2月15日 (2018.2.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/040011  
 (87) 国際公開番号 W02017/004151  
 (87) 国際公開日 平成29年1月5日 (2017.1.5)  
 (31) 優先権主張番号 62/186,109  
 (32) 優先日 平成27年6月29日 (2015.6.29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 305023366  
 リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ  
 オブ ミネソタ  
 アメリカ合衆国 ミネソタ 55455-  
 2020 ミネアポリス, オーク スト  
 リートーエス・イー 200, マクナマ  
 ラ アラムナイ センター 600  
 (71) 出願人 318010960  
 ルーベン エス. ハリス  
 アメリカ合衆国, ミネソタ 55108,  
 セント ポール, キャンフィールド アベ  
 ニュ 1396

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗-APOBEC3抗体並びにその製造及び使用方法

## (57) 【要約】

ハイブリドーマ細胞株は、APOBEC3タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製する。これらの抗体は、様々な方法において使用することができる。一部の態様において、抗-APOBEC3抗体は、基板に固定されてよい。別の態様において、本開示は、APOBEC3タンパク質に特異的に結合する抗体を作製するハイブリドーマ細胞株により作製される抗体をコードしている核酸配列を含むベクターを提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

1 又は複数の A P O B E C 3 ( A 3 ) タンパク質に特異的に結合する、モノクローナル抗体。

**【請求項 2】**

前記 A P O B E C 3 ( A 3 ) タンパク質が、ヒト A P O B E C 3 B ( A 3 B ) を含む、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 3】**

前記モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ細胞株 5 2 0 6 - 2 3 5 - 0 7 により作製される、請求項 1 又は 2 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

10

**【請求項 4】**

前記モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 0 - 7 6 - 2 9 により作製される、請求項 1 又は 2 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 5】**

前記モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 0 - 0 8 - 1 5 により作製される、請求項 1 又は 2 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 6】**

前記モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 1 - 1 1 0 - 1 9 により作製される、請求項 1 又は 2 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 7】**

前記モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 1 - 1 4 2 - 1 2 により作製される、請求項 1 又は 2 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

20

**【請求項 8】**

前記モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 0 - 5 5 - 1 9 により作製される、請求項 1 又は 2 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 9】**

前記モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 により作製される、請求項 1 又は 2 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 10】**

アミノ酸配列の配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、又は配列番号 14 の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 又は 2 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

30

**【請求項 11】**

アミノ酸配列の配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、又は配列番号 28 の少なくとも 1 つを含む、請求項 1、2 又は 10 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 12】**

前記モノクローナル抗体が、重鎖及び軽鎖を含み、並びにここで該軽鎖が、3つの相補性決定領域 ( C D R ) を含み、並びにさらにここで該第一の軽鎖 C D R ( C D R 1 ) が、アミノ酸配列 Q S V Y N N N D ( 配列番号 29 )、Q S L Y R N K N ( 配列番号 32 )、Q N I Y S N ( 配列番号 35 )、Q S V Y N N K N ( 配列番号 38 )、H S V Y N N N W ( 配列番号 40 )、Q S V Y K N K N ( 配列番号 42 )、又は E S V F K K N W ( 配列番号 44 ) の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 又は 2 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

40

**【請求項 13】**

前記モノクローナル抗体が、重鎖及び軽鎖を含み、並びにここで該軽鎖が、3つの相補性決定領域 ( C D R ) を含み、並びにさらにここで該第二の軽鎖 C D R ( C D R 2 ) が、アミノ酸配列 R A S ( 配列番号 30 )、Y A S ( 配列番号 33 )、又は G A S ( 配列番号 36 ) の少なくとも 1 つを含む、請求項 1、2、又は 12 のいずれか記載のモノクローナル抗体。

50

## 【請求項 14】

前記モノクローナル抗体が、重鎖及び軽鎖を含み、並びにここで該軽鎖が、3つの相補性決定領域(CDR)を含み、並びにさらにここで該第三の軽鎖CDR(CDR3)が、アミノ酸配列LGSYDDVDTC A(配列番号31)、QGEFSCSSADCF A(配列番号34)、QSYVYSSSTADT(配列番号37)、LGEFYCSSIDCLV(配列番号39)、QGGYSSGDGIA(配列番号41)、LGEFSCHSVDCLA(配列番号43)、又はAGAFDGNIYP(配列番号45)の少なくとも1つを含む、請求項1、2、12、又は13のいずれか記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 15】

前記モノクローナル抗体が、重鎖及び軽鎖を含み、並びにここで該重鎖が、3つの相補性決定領域(CDR)を含み、並びにさらにここで該第一の重鎖CDR(CDR1)が、アミノ酸配列GFDFSS(配列番号46)、GFSSFRG(配列番号49)、GFSSFDG(配列番号52)、GFSSLS(配列番号55)、又はGFSSISS(配列番号61)の少なくとも1つを含む、請求項1、2、又は12～14のいずれか記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 16】

前記モノクローナル抗体が、重鎖及び軽鎖を含み、並びにここで該重鎖が、3つの相補性決定領域(CDR)を含み、並びにさらにここで該第二の重鎖CDR(CDR2)が、アミノ酸配列YIDPVFG(配列番号47)、DMNIIAD(配列番号50)、CIYDASG(配列番号53)、FINS DN(配列番号56)、IISSSG(配列番号:59)、又はSISSGG(配列番号62)の少なくとも1つを含む、請求項1、2、又は12～15のいずれか記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 17】

前記モノクローナル抗体が、重鎖及び軽鎖を含み、並びにここで該重鎖が、3つの相補性決定領域(CDR)を含み、並びにさらにここで該第三の重鎖CDR(CDR3)が、アミノ酸配列FCARST(配列番号48)、FCVSGS(配列番号51)、FCVKTD(配列番号54)、FCATYR(配列番号57)、FCAREG(配列番号60)、又はFCGS(配列番号63)の少なくとも1つを含む、請求項1、2、又は12～16のいずれか記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 18】

請求項1～17記載の抗体のいずれかを使用する方法。

## 【請求項 19】

前記抗体を研究試薬として使用することをさらに含む、請求項18記載の方法。

## 【請求項 20】

前記抗体を、診断試験及び予後試験の少なくとも1種のために使用することをさらに含む、請求項18記載の方法。

## 【請求項 21】

前記APOBEC3(A3)タンパク質の1又は複数の発現を検出することをさらに含む、請求項18～20のいずれか記載の方法。

## 【請求項 22】

前記APOBEC3B(A3B)の発現を検出することをさらに含む、請求項18～21のいずれか記載の方法。

## 【請求項 23】

酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、免疫プロット法(IB)、免疫沈降法(IP)、免疫組織化学法(IHC)、免疫蛍光顕微鏡(IF)、及びフローサイトメトリー(FLOW)の少なくとも1つを実行することをさらに含む、請求項18～21のいずれか記載の方法。

## 【請求項 24】

抗体の作製方法であって：

WYKFDENYAFLHRTLKEILRYLMD(配列番号64)及びCPFQP

10

20

30

40

50

WDGLEEHSQALSGRLRAILQNGN（配列番号65）の少なくとも1つで、宿主動物を、免疫化する工程；並びに

APOBEC3（A3）ファミリーの1又は複数のメンバーに対する抗体を作製する細胞を収集する工程：を含む、方法。

【請求項25】

前記WYKFDENYAFLHRTLKEILRYLMD（配列番号64）及びCPFQPWDGLEEHSQALSGRLRAILQNGN（配列番号65）の両方で、宿主動物を免疫化することを含む、請求項24記載の方法。

【請求項26】

基板に固定された、請求項1～17のいずれか記載のモノクローナル抗体を含む装置。

10

【請求項27】

ハイブリドーマ細胞株5206-235-07。

【請求項28】

ハイブリドーマ細胞株5210-76-29。

【請求項29】

ハイブリドーマ細胞株5210-08-15。

【請求項30】

ハイブリドーマ細胞株5211-110-19。

【請求項31】

ハイブリドーマ細胞株5211-142-12。

20

【請求項32】

ハイブリドーマ細胞株5210-55-19。

【請求項33】

ハイブリドーマ細胞株5210-87-13。

【請求項34】

ハイブリドーマ細胞株5206-235-07、ハイブリドーマ細胞株5210-76-29、ハイブリドーマ細胞株5210-08-15、ハイブリドーマ細胞株5211-110-19、ハイブリドーマ細胞株5211-142-12、ハイブリドーマ細胞株5210-55-19、及びハイブリドーマ細胞株5210-87-13の少なくとも1つにより作製された抗体をコードしている核酸配列を発現しているベクター。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年6月29日に出願された米国特許仮出願第62/186,109号の優先権を主張するものであり、この仮出願は引用により本明細書中に組み込まれている。

【0002】

配列表

本出願は、サイズ72キロバイトで2016年6月23日に作成された、「2016-06-23-SequenceListing\_ST25.txt」と題するASCIIテキストファイルとして、EFS-Webを介し、米国特許商標庁（USPTO）へ電子的に提出された配列表を含む。この配列表に含まれる情報は、引用により本明細書中に組み込まれている。

40

【背景技術】

【0003】

背景

APOBEC3Bは、癌変異誘発に関与している抗ウイルス酵素である。APOBEC3Bは、APOBEC3（A3）ファミリー中の7種のヒトシチジンデアミナーゼの1種である。A3ファミリーは、APOBEC3A（A3A）；APOBEC3B（A3B）

50

; A P O B E C 3 C ( A 3 C ) ; A P O B E C 3 D ( A 3 D ) 、 A P O B E C 3 F ( A 3 F ) ; A P O B E C 3 G ( A 3 G ) ; A P O B E C 3 H ( A 3 H ) を含む。

【発明の概要】

【0004】

要約

本開示は、A P O B E C 3 タンパク質に特異的に結合する抗体を説明する。一部の実施態様において、本抗体は、A P O B E C 3 B に特異的に結合することができる。

【0005】

一部の実施態様において、本抗体は、モノクローナル抗体であることができる。これらの実施態様の一部において、本モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 5 2 0 6 - 2 3 5 - 0 7 により作製される。他の実施態様において、本モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 0 - 7 6 - 2 9 により作製される。他の実施態様において、本モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 0 - 0 8 - 1 5 により作製される。他の実施態様において、本モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 1 - 1 1 0 - 1 9 により作製される。他の実施態様において、本モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 1 - 1 4 2 - 1 2 により作製される。他の実施態様において、本モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 0 - 5 5 - 1 9 により作製される。他の実施態様において、本モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 により作製される。

【0006】

一部の実施態様において、本抗体は、アミノ酸配列の配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、又は配列番号：14の少なくとも1つを含むことができる。

【0007】

一部の実施態様において、本抗体は、アミノ酸配列の配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、又は配列番号：28の少なくとも1つを含むことができる。

【0008】

一部の実施態様において、本モノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖を含むことができ、ここで該軽鎖は、3つの相補性決定領域(CDR)を含み、並びにさらに該第一の軽鎖CDR(CDR1)は、アミノ酸配列Q S V Y N N N D (配列番号：29)、Q S L Y R N K N (配列番号：32)、Q N I Y S N (配列番号：35)、Q S V Y N N K N (配列番号：38)、H S V Y N N N W (配列番号：40)、Q S V Y K N K N (配列番号：42)、又はE S V F K K N W (配列番号：44)の少なくとも1つを含む。

【0009】

一部の実施態様において、本モノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、ここで該軽鎖は、3つの相補性決定領域(CDR)を含み、並びにさらに該第二の軽鎖CDR(CDR2)は、アミノ酸配列R A S (配列番号：30)、Y A S (配列番号：33)、又はG A S (配列番号：36)の少なくとも1つを含む。

【0010】

一部の実施態様において、本モノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、ここで該軽鎖は、3つの相補性決定領域(CDR)を含み、並びにさらに該第三の軽鎖CDR(CDR3)は、アミノ酸配列L G S Y D D D V D T C A (配列番号：31)、Q G E F S C S S A D C F A (配列番号：34)、Q S Y V Y S S S T A D T (配列番号：37)、L G E F Y C S S I D C L V (配列番号：39)、Q G G Y S S G D G I A (配列番号：41)、L G E F S C H S V D C L A (配列番号：43)、又はA G A F D G N I Y P (配列番号：45)の少なくとも1つを含む。

【0011】

一部の実施態様において、本モノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、ここで該重鎖は、3つの相補性決定領域(CDR)を含み、並びにさらに該第一の重鎖CDR(CD

10

20

30

40

50

R 1 ) は、アミノ酸配列 G F D F S S ( 配列番号 : 4 6 )、G F S F S R G ( 配列番号 : 4 9 )、G F S F S D G ( 配列番号 : 5 2 )、G F S L S S ( 配列番号 : 5 5 )、又は G F S I S S ( 配列番号 : 6 1 ) の少なくとも 1 つを含む。

【 0 0 1 2 】

一部の実施態様において、本モノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、ここで該重鎖は、3つの相補性決定領域 ( C D R ) を含み、並びにさらに該第二の重鎖 C D R ( C D R 2 ) は、アミノ酸配列 Y I D P V F G ( 配列番号 : 4 7 )、D M N I I A D ( 配列番号 : 5 0 )、C I Y D A S G ( 配列番号 : 5 3 )、F I N S D N ( 配列番号 : 5 6 )、I I S S S G ( 配列番号 : 5 9 )、又は S I S S G G ( 配列番号 : 6 2 ) の少なくとも 1 つを含む。

10

【 0 0 1 3 】

一部の実施態様において、本モノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、ここで該重鎖は、3つの相補性決定領域 ( C D R ) を含み、並びにさらに該第三の重鎖 C D R ( C D R 3 ) は、アミノ酸配列 F C A R S T ( 配列番号 : 4 8 )、F C V S G S ( 配列番号 : 5 1 )、F C V K T D ( 配列番号 : 5 4 )、F C A T Y R ( 配列番号 : 5 7 )、F C A R E G ( 配列番号 : 6 0 )、又は F C G S ( 配列番号 : 6 3 ) の少なくとも 1 つを含む。

【 0 0 1 4 】

別の態様において、本開示は、先に要約した抗体のいずれかの使用に関与する方法を説明する。これらの方法の一部は、本抗体を研究試薬として使用することに関する。他の方法は、本抗体を、診断試験及び予後試験の少なくとも 1 つのために抗体を使用することに関する。

20

【 0 0 1 5 】

一部の実施態様において、本方法は、1又は複数の A P O B E C 3 ( A 3 ) タンパク質の発現を検出することを含むことができる。これらの実施態様の一部において、本方法は、A P O B E C 3 B ( A 3 B ) の発現を検出することを含むことができる。

【 0 0 1 6 】

一部の実施態様において、本方法は、酵素 - 結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A )、免疫プロット法 ( I B )、免疫沈降法 ( I P )、免疫組織化学法 ( I H C )、免疫蛍光顕微鏡 ( I F )、及びフローサイトメトリー ( F L O W ) の少なくとも 1 つを実行することを含むことができる。

30

【 0 0 1 7 】

別の態様において、本開示は、抗体を作製する方法を説明する。一般に、本方法は、W Y K F D E N Y A F L H R T L K E I L R Y L M D ( 配列番号 : 6 4 ) 及び C P F Q P W D G L E E H S Q A L S G R L R A I L Q N Q G N ( 配列番号 : 6 5 ) の少なくとも 1 つで、宿主動物を、免疫化すること；並びに、A P O B E C 3 ( A 3 ) ファミリーの 1 又は複数のメンバーに特異的に結合する抗体を作製する細胞を収集すること；を含む。一部の実施態様において、本方法は、W Y K F D E N Y A F L H R T L K E I L R Y L M D ( 配列番号 : 6 4 ) 及び C P F Q P W D G L E E H S Q A L S G R L R A I L Q N Q G N ( 配列番号 : 6 5 ) の両方で、宿主動物を免疫化することを含むことができる。

40

【 0 0 1 8 】

別の態様において、本開示は、基板に固定された、先に要約された抗体のいずれかの実施態様を含む装置を説明する。

【 0 0 1 9 】

別の態様において、本開示は、A P O B E C 3 タンパク質に特異的に結合する抗体を作製するハイブリドーマ細胞株を説明する。

【 0 0 2 0 】

別の態様において、本開示は、A P O B E C 3 タンパク質に特異的に結合する抗体を作製するハイブリドーマ細胞株により作製された抗体をコードしている核酸配列を含むベクターを説明する。

【 0 0 2 1 】

50

本明細書で使用される「抗体」及び「抗体類」（免疫グロブリン）は、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体調製物、少なくとも2種の完全な抗体から形成された多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、単鎖Fv（scFv）、単鎖抗体、単ドメイン抗体、ドメイン抗体、非限定的にFab断片、F(ab)<sub>2</sub>断片を含む抗体断片、所望の生物活性を示す抗体断片、ジスルフィド-結合したFv（sdFv）、イントラボディ(int rabody)、又は先のいずれかのエピトープ-結合断片の少なくとも1種を指す。特に、抗体は、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン分子の免疫活性断片、すなわち、抗原-結合部位を含む分子を含む。免疫グロブリン分子は、任意の型（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又はサブクラスであることができる。

10

#### 【0022】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた、先に規定した抗体を指し、すなわち、その集団に含まれた個々の抗体は、少量で存在し得る可能性がある天然に生じる突然変異以外は、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異性があり、単独の抗原性部位に対し方向づけられている。さらに、典型的には異なる抗原決定基（エピトープ）に対し方向づけられた異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単独の抗原決定基に対し方向づけられている。それらの特異性に加え、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリン産生細胞により夾雑されていない不死化ハイブリドーマ細胞により合成される点で、それらは利点がある。或いは、モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体をコードしている重鎖及び軽鎖遺伝子により、安定して又は一過性にトランスフェクションされた細胞により作製され得る。修飾語「モノクローナル」とは、抗体の実質的に均質な集団から得られるような、先に規定した抗体の特徴を示し、いずれか特定の方法により抗体の操作を必要とするように解釈されるものではない。用語「モノクローナル」は、本明細書において、それにより抗体が操作された方法ではなく、任意の真核細胞、原核細胞、又はファージのクローンを含む、細胞のクローン性集団から誘導される、先に規定した抗体を指すように使用される。

20

#### 【0023】

「抗原」及びその変形は、物質によりチャレンジされた対象において免疫応答を生じることが可能である任意の物質を指す。様々な実施態様において、抗原は、細胞性免疫応答、液性免疫応答、又は両方を生じ得る。好適な抗原は、合成又は天然であってよく、それらが天然に生じる場合は、内在性（例えば自己抗原）又は外来性であってよい。好適な抗原性物質は、ペプチド又はポリペプチド（ペプチド又はポリペプチドをコードしている、核酸、少なくともその一部を含む）；脂質；糖脂質；多糖；糖質；ポリヌクレオチド；プリオン；生存又は失活した細菌、ウイルス、真菌、又は寄生生物；並びに、細菌性、ウイルス性、真菌性、原虫性、腫瘍-由来の、又は生物体-由来の免疫原、毒素又はトキシイドを含むが、これらに限定されるものではない。抗原は、1又は複数のエピトープを含み得る。

30

#### 【0024】

「エピトープ」は、抗体に対し特異的結合を示す化学部分を指す。

40

#### 【0025】

「単離された」及びその変形は、その天然の環境から任意の程度で除去されている、ポリペプチドを指す。例えば、単離されたポリペプチドは、細胞から除去され、且つその天然の環境の他のポリペプチド、核酸、及び他の細胞の物質の多くが、最早存在しない、ポリペプチドである。用語「単離された」は、他の細胞成分が除去されるいずれか特定の程度を示唆しない。

#### 【0026】

「タンパク質」は、配列の長さに関わりなく2又はそれよりも多いアミノ酸残基の任意の配列、並びに2又はそれよりも多い個別に翻訳されたアミノ酸配列の任意の複合体を指

50

す。タンパク質はまた、糖質、脂質、ヌクレオチド配列、又は糖質、脂質、及び／もしくはヌクレオチド配列の任意の組合せを含むように化学的に修飾されたアミノ酸配列を指す。本明細書において使用される「タンパク質」、「ペプチド」及び「ポリペプチド」は、互換的に使用される。

【 0 0 2 7 】

「精製された」又はその変形は、特定の成分の存在が、未精製の出発物質に比べ、任意の程度まで濃厚化されている調製物を指す。精製は、例えば、調製物中の特定の成分の濃度の増加、特定の成分の第二の成分と比べた分子又は重量／重量比の増加など、任意の好適な用語で言及されてよい。

【 0 0 2 8 】

「特異的」及びその変形は、特定の標的に関する、任意の程度までの、示差的又は非全体的親和性を有することを指す。本明細書に使用される、ポリペプチドへ「特異的に結合する」ことができる抗体は、その抗体の合成を誘導した抗原のエピトープと相互作用する抗体、又は構造的に関連したエピトープと相互作用する抗体である。したがって抗体の説明において、用語「特異的」及び「特異的に結合する」は、抗体が、1つの又はただ1つの標的分子に結合することを暗示していないし又その必要もない。

【 0 0 2 9 】

語句「好ましい」及び「好ましく」は、ある状況下において、ある種の恩恵をもたらし得る本発明の実施態様を指す。しかし他の実施態様もまた、同じ状況又は他の状況の下で、好ましいことがある。さらに、1又は複数の好ましい実施態様の記述は、他の実施態様は有用でないことを暗示せず、本発明の範囲から他の実施態様を排除することを意図しない。

【 0 0 3 0 】

用語「含む」及びその変形は、これらの用語が本説明及び請求項において明らかにする限定的意味を有さない。

【 0 0 3 1 】

別に特定しない限りは、「ひとつ(a, an, the)」及び「少なくとも1つ」は、互換的に使用され、且つ1つ又は1よりも多くを意味する。

【 0 0 3 2 】

同じく本明細書において、端点による数字範囲の記述は、その範囲内に包含される全ての数字を含む(例えば1～5は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5などを含む)。

【 0 0 3 3 】

個別の工程を含む本明細書に開示された任意の方法に関して、これらの工程は、任意の実行可能な順番で実施されてよい。並びに好適ならば、2又はそれよりも多い工程の任意の組合せが、同時に実施されてよい。

【 0 0 3 4 】

前述の本発明の要約は、各開示された実施態様又は本発明の全ての実行を説明することを意図するものではない。より特定の例示に従う説明は、実施態様を例証している。本出願を通じ数カ所において、指針が、実例のリストを通じて提供されているが、それらの実例は、様々な組合せで使用することができる。各場合において、引用されたりリストは、代表的群としてのみ役立ち、排除的リストとして解釈されるべきではない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 5 】

【 図 1 】 図 1 は、ハイブリドーマクローン由来の m A b - 含有上清の E L I S A スクリーニングを示す。ハイブリドーマクローン ( 5 2 0 6 - 2 3 5 、 5 2 1 0 - 0 8 、 5 2 1 0 - 5 5 、 5 2 1 0 - 7 6 、 5 2 1 0 - 8 7 、 5 2 1 1 - 1 1 0 、 及び 5 2 1 0 - 1 4 2 ) 由来の細胞培地上清は、標準 E L I S A アッセイにおいて、A 3 B c t d - m y c - ( H I S ) 。精製タンパク質 ( A 3 B - C T D ) への結合に関してアッセイした。結合は、抗 - ウサギ H R P 二次抗体 ( 1 : 5 0 0 0 ) により検出し、テトラメチルベンジジン ( T M

10

20

30

40

50



B)により可視化し、並びに450nmでの分光法により定量した。このアッセイにおける陰性対照は、抗-A3Bを発現しないハイブリドーマクローン由来の無細胞培地上清であり、陽性対照は、ウサギ抗-A3G抗体(NIH AIDS試薬プログラム10201)であった。

【図2】図2は、個別のハイブリドーマクローン由来のmAb-含有上清のELISAスクリーニングを示す。ハイブリドーマ単クローン(5206-235-07、5210-08-15、5210-55-19、5210-76-29、5210-87-13、5211-110-19、及び5211-142-12)由来の無細胞上清は、標準ELISAアッセイにおいて、A3B-CTDへの結合に関してアッセイした。結合は、抗-ウサギHRP二次抗体(1:5000)により検出し、テトラメチルベンジジン(TMB)により可視化し、並びに450nmでの分光法により定量した。このアッセイにおける陰性対照は、抗-A3Bを発現しないハイブリドーマクローン由来の無細胞培地上清であり、陽性対照は、ウサギ抗-A3G抗体(NIH AIDS試薬プログラム10201)であった。

10

【図3】図3は、7メンバーのAPOBEC3ファミリーに対する各抗-A3Bモノクローナル抗体の免疫プロット法を示す。293T細胞由来の細胞溶解液を、各HA-タグ付けAPOBEC3タンパク質(A3A-HA、A3B-HA、A3C-HA、A3D-HA、A3F-HA、A3G-HA、A3H-HA)、又は発現ベクター単独により一過性にトランスフェクションし、12%SDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレンに移した。メンブレンは、各ハイブリドーマ細胞株(5206-235-07、5210-08-15、5210-55-19、5210-76-29、5210-87-13、5211-110-19、及び5211-142-12)の1/3希釈物、抗-A3G(60100、ProteinTech社、シカゴ、IL)の1/1000希釈物、抗-HA(C29F4、ウサギmAb3724、Cell Signaling Technology社、ダンバース、MA)の1/1000希釈物、又は抗-チューブリン(MMS-407R、Covance社、エメリービル、CA)の1/20,000希釈物由来の上清によりプロービングした。メンブレンをさらに、PBS-T(PBS、0.1%Tween-20)を溶媒とする50%Block(WBAVDP001、Millipore社、ダルムシュタット、独国)中の抗-ウサギIgG IR800CW(Odyssey 926-32211、LI-COR Biosciences社、リンカーン、NE)の1/20,000又は抗-マウスIgG IR800CW(Odyssey 827-08364、LI-COR Biosciences社、リンカーン、NE)の1/20,000を含む好適な二次抗体によりプロービングし、且つ画像を、LI-CORイメージング(LI-COR Biosciences社、リンカーン、NE)を用い作製した。

20

30

【図4】図4は、抗-A3Bハイブリドーマ上清により検出された、HeLa細胞において過剰発現されたA3B-GFPの免疫蛍光測定を示す。HeLa細胞は、6ウェルプレートにおいて、250,000個/ウェルで播種した。細胞は、A3B-GFP構築体(Lackeyら、J. Mol. Bio. 2012; 419(5):301-14)の200ngによりトランスフェクションした。16時間後、細胞を、8チャンバー式スライドにおいて、30,000個細胞/チャンバーで播種した。播種の24時間後に、細胞を、4%パラホルムアルデヒド(PFA)中で1時間固定し、洗浄し、且つハイブリドーマ細胞株5210-08-15、ハイブリドーマ細胞株5210-55-19、ハイブリドーマ細胞株5210-76-29、ハイブリドーマ細胞株5210-87-13、又はハイブリドーマ細胞株5211-110-19由来の上清中で、室温で一晩インキュベーションした。細胞を、1xPBSで5回洗浄し、抗-ウサギ-TRITC(1:500)(111095144、Jackson ImmunoResearch Laboratories社、ウェストグロブ、PA)中で37で1時間インキュベーションし、その後2時間かけて室温に戻した。1xPBSで5回洗浄した後、核をヘキストにより室温で15分間染色した。1xPBSで2回洗浄した後、スライドを、4で1xPBS中に浸漬させて、貯蔵した。画像は、倍率

40

50

60×で、1秒のTRITC露光時間で撮影し、(規準化するため)900×900ピクセルでトリミングし、10%サイズまで縮小した。

【図5】図5は、フローサイトメトリー(FLOW)による、2種の癌細胞株における内在性A3Bの細胞内染色を示す。OVCA R5細胞(Monksら、1991, J. Natl. Cancer Inst. 83:757-766)及びMDA-MB-468細胞(ATCC HTB-132、ATCC、マナサス、VA)を、対照shRNA又はA3B-特異的shRNAのいずれかをコードしているレンチウイルスにより、形質導入した。薬物選択(ピューロマイシン)の後、細胞を、1%パラホルムアルデヒド中で固定し、冷メタノール中で透過処理した。次に細胞を、ウサギ抗-A3B 5210-87-13と共に、室温で1時間インキュベーションし、引き続き抗-ウサギPE-コンジュゲート二次抗体と共に、暗所において室温で20分間インキュベーションした。未結合の抗体を除去するために1回PBS洗浄した後、細胞を、フローサイトメーター上で分析した。shRNAにより枯渇された内在性A3Bを伴う細胞は、有意に低い平均蛍光強度を有する。

【図6】図6は、フローサイトメトリー(FLOW)による、癌細胞株における外来性(トランスフェクションされた)A3Gの細胞内染色を示す。SupT11細胞株は、pcDNA3.1(SupT11+ベクター)又はpcDNA3.1 A3G-HA(SupT11+A3G-HA)により、安定してトランスフェクションされた。細胞を、1%パラホルムアルデヒド中で固定し、冷メタノール中で透過処理した。次に細胞を、ウサギ抗-A3B 5210-87-13又はウサギ抗-5211-10-19と共に、室温で1時間インキュベーションし、引き続き抗-ウサギPE-コンジュゲート二次抗体と共に、暗所において室温で20分間インキュベーションした。細胞を、フローサイトメーター上で分析した。

【図7】図7は、A3B shRNA又は対照shRNA(Burnら、2013, Nature 494(7437):366-370)で処理した、様々な癌細胞株における内在性A3Bの検出を示す。(A)様々な癌細胞株(子宮頸癌(DOTC2 4510、ATCC CRL-7920、ATCC、マナサス、VA)、膀胱癌(T24、ATCC HTB-4、ATCC、マナサス、VA)、乳癌(ZR-75-1、ATCC CRL-1500、ATCC、マナサス、VA)、頭頸部扁平上皮癌(JSQ3、Weichselbaumら、1988, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 15:575-579)、及び卵巣癌(OVCA R5、Monksら、1991, J. Natl. Cancer Inst. 83:757-766))からの溶解液を、SDS-PAGEにより分離し、PVD Fメンブレンへ移し、PBSを溶媒とする5%ミルク、0.1%Tween 20中で、抗-ヒトA3B mAb(5210-87-13)(1:50)により免疫プロットし、抗-ウサギHRP二次抗体により検出した。(B)骨肉腫(U-2 OS、ATCC HTB-96、ATCC、マナサス、VA)細胞を、sh対照又はshA3B構築体(Burnら、2013, Nature 494(7437):366-370)により形質導入し、8チャンバー式スライド中に、20,000個細胞/チャンバーで播種した。播種の24時間後、細胞を、4%PFA中で30分間固定した。スライドを、一次抗体(5210-87-13、1:5希釈)と共に、室温で一晩インキュベーションした。1×PBSで5回洗浄した後、細胞を、抗-ウサギ(抗-Rb)TRITC(1:500)中で、37℃で1時間インキュベーションし、その後2時間かけて室温まで冷却した。1×PBSで5回洗浄した後、核をヘキスト色素により15分間染色した。色素を除去し、細胞を、4℃で1×PBS中に浸漬させて、貯蔵した。画像は、倍率60×で、900×900ピクセルでトリミングし、10%サイズまで縮小した。

【図8A】図8Aは、抗-ヒトA3BハイブリドーマIg軽鎖配列のアラインメントを示す。(A)ハイブリドーマ細胞株5206-235-7由来のIg軽鎖ヌクレオチド配列(配列番号:1)、ハイブリドーマ細胞株5210-76-29由来のIg軽鎖ヌクレオチド配列(配列番号:2)、ハイブリドーマ細胞株5210-8-15由来のIg軽鎖ヌクレオチド配列(配列番号:3)、ハイブリドーマ細胞株5211-110-19由来のIg軽鎖ヌクレオチド配列(配列番号:4);ハイブリドーマ細胞株5211-142-12由来のIg軽鎖ヌクレオチド配列(配列番号:5)、ハイブリドーマ細胞株5210

- 55 - 19 由来の I g 軽鎖ヌクレオチド配列（配列番号：6）、及びハイブリドーマ細胞株 5210 - 87 - 13 由来の I g 軽鎖ヌクレオチド配列（配列番号：7）を含む、抗 - ヒト A3B ハイブリドーマ I g 軽鎖ヌクレオチド配列の C l u s t a l W アラインメント。ペプチド番号は、当初の免疫化に使用されたペプチドを示し；A3 結合特異性は、右側に列挙している。

【図 8 B】図 8 B は、抗 - ヒト A3B ハイブリドーマ I g 軽鎖配列のアラインメントを示す。（B）ハイブリドーマ細胞株 5206 - 235 - 7 由来の I g 軽鎖タンパク質配列（配列番号：8）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 76 - 29 由来の I g 軽鎖タンパク質配列（配列番号：9）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 8 - 15 由来の I g 軽鎖タンパク質配列（配列番号：10）、ハイブリドーマ細胞株 5211 - 110 - 19 由来の I g 軽鎖タンパク質配列（配列番号：11）、ハイブリドーマ細胞株 5211 - 142 - 12 由来の I g 軽鎖タンパク質配列（配列番号：12）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 55 - 19 由来の I g 軽鎖タンパク質配列（配列番号：13）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 87 - 13 由来の I g 軽鎖タンパク質配列（配列番号：14）を含む、抗 - ヒト A3B ハイブリドーマ I g 軽鎖タンパク質配列の C l u s t a l W アラインメント。このアラインメントは、フレームワーク（FR）ドメイン及び相補性決定領域（CDR）を示す。同一のアミノ酸（\*）及び類似のアミノ酸（:）は、配列の下側に示している。ペプチド番号は、当初の免疫化に使用されたペプチドを示し；A3 結合特異性は、右側に列挙している。

【図 9 A】図 9 A は、抗 - ヒト A3B ハイブリドーマ I g 重鎖配列のアラインメントを示す。（A）ハイブリドーマ細胞株 5206 - 235 - 7 由来の I g 重鎖ヌクレオチド配列（配列番号：15）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 76 - 29 由来の I g 重鎖ヌクレオチド配列（配列番号：16）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 8 - 15 由来の I g 重鎖ヌクレオチド配列（配列番号：17）、ハイブリドーマ細胞株 5211 - 110 - 19 由来の I g 重鎖ヌクレオチド配列（配列番号：18）；ハイブリドーマ細胞株 5211 - 142 - 12 由来の I g 重鎖ヌクレオチド配列（配列番号：19）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 55 - 19 由来の I g 重鎖ヌクレオチド配列（配列番号：20）、及びハイブリドーマ細胞株 5210 - 87 - 13 由来の I g 重鎖ヌクレオチド配列（配列番号：21）を含む、抗 - ヒト A3B ハイブリドーマ I g 重鎖ヌクレオチド配列の C l u s t a l W アラインメント。ペプチド番号は、当初の免疫化に使用されたペプチドを示し；A3 結合特異性は、右側に列挙している。

【図 9 B】図 9 B は、抗 - ヒト A3B ハイブリドーマ I g 重鎖配列のアラインメントを示す。（B）ハイブリドーマ細胞株 5206 - 235 - 7 由来の I g 重鎖タンパク質配列（配列番号：22）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 76 - 29 由来の I g 重鎖タンパク質配列（配列番号：23）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 8 - 15 由来の I g 重鎖タンパク質配列（配列番号：24）、ハイブリドーマ細胞株 5211 - 110 - 19 由来の I g 重鎖タンパク質配列（配列番号：25）、ハイブリドーマ細胞株 5211 - 142 - 12 由来の I g 重鎖タンパク質配列（配列番号：26）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 55 - 19 由来の I g 重鎖タンパク質配列（配列番号：27）、ハイブリドーマ細胞株 5210 - 87 - 13 由来の I g 重鎖タンパク質配列（配列番号：28）を含む、抗 - ヒト A3B ハイブリドーマ I g 重鎖タンパク質配列の C l u s t a l W アラインメント。このアラインメントは、フレームワーク（FR）ドメイン、相補性決定領域（CDR）、多様性ドメイン（D）及び結合ドメイン（JH）を示す。同一のアミノ酸（\*）及び類似のアミノ酸（:）は、配列の下側に示し；A3 結合特異性は、右側に列挙している。

【発明を実施するための形態】

【0036】

#### 例証的实施態様の詳細な説明

本開示は、A P O B E C 3（A3）ファミリー、特に A P O B E C 3 B における、シチジンデアミナーゼに結合する抗体；かかる抗体を作製するハイブリドーマ；並びに、A P O B E C 3（A3）ファミリーのメンバー、特に A P O B E C 3 B に結合する抗体の製造

方法を説明している。A P O B E C 3 B は、癌変異誘発に関与している抗ウイルス酵素であり、A P O B E C 3 ( A 3 ) ファミリーにおけるシチジンデアミナーゼのファミリーの一員である。A P O B E C 3 B は、精製が困難なタンパク質であり、この欠点及び関連する A P O B E C 3 ファミリーメンバーとのその相同性は、これまで A P O B E C 3 B に特異的な抗体の開発を困難にしてきた。本明細書記載の抗体は、A P O B E C 3 ( A 3 ) ファミリー、特に A P O B E C 3 B の酵素の研究のために価値のある試薬を提供する。

#### 【 0 0 3 7 】

本開示はまた、A P O B E C 3 ( A 3 ) ファミリーの 1 又は複数のメンバー、特に A P O B E C 3 B へ特異的に結合する抗体を作製する方法を説明している。一実施態様は、A P O B E C 3 B に特異的に結合する抗体の作製のために、A P O B E C 3 B に特異的なエ

10

#### 【 0 0 3 8 】

本開示はさらに、A P O B E C 3 ( A 3 ) ファミリーの 1 又は複数のメンバー、特に A P O B E C 3 B へ特異的に結合する抗体を使用する方法を説明している。

#### 【 0 0 3 9 】

#### A P O B E C 3 タンパク質に結合する抗体

一の実施態様において、本明細書記載の抗体は、A P O B E C 3 ( A 3 ) ファミリーのメンバー、特に A P O B E C 3 B へ結合する。一の実施態様において、これらの抗体は、例えば、ヒト A P O B E C 3 B ( A 3 B ) などを含むヒト A P O B E C 3 ( A 3 ) タンパク質を含む、霊長類 A P O B E C 3 ( A 3 ) タンパク質に結合する。

20

#### 【 0 0 4 0 】

一実施態様において、A P O B E C 3 ( A 3 ) ファミリーのメンバー、特に A P O B E C 3 B に結合する抗体は、以下のハイブリドーマの 1 又は複数により作製された抗体の重鎖及び軽鎖に存在する 1 又は複数の配列を有することができる：5 2 0 6 - 2 3 5 - 0 7、5 2 1 0 - 7 6 - 2 9、5 2 1 0 - 0 8 - 1 5、5 2 1 1 - 1 1 0 - 1 9、5 2 1 1 - 1 4 2 - 1 2、5 2 1 0 - 5 5 - 1 9、及び 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3。各ハイブリドーマの軽鎖に関するアミノ酸配列は、各々、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、及び配列番号：14として同定されている。各ハイブリドーマの重鎖に関するアミノ酸配列は、各々、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、及び配

30

#### 【 0 0 4 1 】

一の実施態様において、本抗体は、以下のハイブリドーマの 1 又は複数により作製された抗体の重鎖及び軽鎖に存在する 1 又は複数の相補性決定領域 ( C D R ) を含む：5 2 0 6 - 2 3 5 - 0 7、5 2 1 0 - 7 6 - 2 9、5 2 1 0 - 0 8 - 1 5、5 2 1 1 - 1 1 0 - 1 9、5 2 1 1 - 1 4 2 - 1 2、5 2 1 0 - 5 5 - 1 9、及び 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 ( 図 8 B 及び 9 B )。抗体は、同じハイブリドーマ及び / 又は異なるハイブリドーマにより作製される抗体の重鎖及び軽鎖に存在する C D R を含んでよい。

#### 【 0 0 4 2 】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列 Q S V Y N N N D ( 配列番号：29 ) ( C D R 1 )、R A S ( 配列番号：30 ) ( C D R 2 )、及び / 又は L G S Y D D D V D T C A ( 配列番号：31 ) ( C D R 3 ) を含む、ハイブリドーマ細胞株 5 2 0 6 - 2 3 5 - 0 7 により作製される抗体の軽鎖に存在する 1 又は複数の C D R を含んでよい。

40

#### 【 0 0 4 3 】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列 Q S L Y R N K N ( 配列番号：32 ) ( C D R 1 )、Y A S ( 配列番号：33 ) ( C D R 2 )、及び / 又は Q G E F S C S S A D C F A ( 配列番号：34 ) ( C D R 3 ) を含む、ハイブリドーマ細胞株 5 2 1 0 - 7 6 - 2 9 により作製される抗体の軽鎖に存在する 1 又は複数の C D R を含んでよい。

#### 【 0 0 4 4 】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列 Q N I Y S N ( 配列番号：35 ) ( C D R 1 )、G A

50

S (配列番号: 36) (CDR2)、及び/又はQSYVYSSSTADT (配列番号: 37) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5210-08-15により作製される抗体の軽鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0045】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列QSVYNNKN (配列番号: 38) (CDR1)、GAS (配列番号: 36) (CDR2)、及び/又はLGEFYCSSIDCLV (配列番号: 39) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5211-110-19により作製される抗体の軽鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0046】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列HSVYNNNW (配列番号: 40) (CDR1)、GAS (配列番号: 36) (CDR2)、及び/又はQGGYSSGDGIA (配列番号: 41) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5211-142-12により作製される抗体の軽鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0047】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列QSVYKNKN (配列番号: 42) (CDR1)、GAS (配列番号: 36) (CDR2)、及び/又はLGEFSCHSVDCLA (配列番号: 43) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5210-55-19により作製される抗体の軽鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0048】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列ESVFKKNW (配列番号: 44) (CDR1)、GAS (配列番号: 36) (CDR2)、及び/又はAGAFDGNIYP (配列番号: 45) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5210-87-13により作製される抗体の軽鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0049】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列GFDFSS (配列番号: 46) (CDR1)、YIDPVFG (配列番号: 47) (CDR2)、及び/又はFCARST (配列番号: 48) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5206-235-07により作製される抗体の重鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0050】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列GFSFSRG (配列番号: 49) (CDR1)、DMNIAD (配列番号: 50) (CDR2)、及び/又はFCVSGS (配列番号: 51) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5210-76-29により作製される抗体の重鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0051】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列GFSFSDG (配列番号: 52) (CDR1)、CIYDASG (配列番号: 53) (CDR2)、及び/又はFCVKTD (配列番号: 54) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5210-08-15により作製される抗体の重鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0052】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列GFSLSS (配列番号: 55) (CDR1)、FINSN (配列番号: 56) (CDR2)、及び/又はFCATYR (配列番号: 57) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5211-110-19により作製される抗体の重鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0053】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列GFSLSS (配列番号: 55) (CDR1)、ISSSG (配列番号: 59) (CDR2)、及び/又はFCAREG (配列番号: 60) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株5211-142-12により作製される抗体の重鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0054】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列GFSISS (配列番号: 61) (CDR1)、SI

10

20

30

40

50

S S G G (配列番号: 62) (CDR2)、及び/又は F C G S (配列番号: 63) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株 5210-55-19により作製される抗体の重鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0055】

本抗体は、例えば、アミノ酸配列 G F S L S S (配列番号: 55) (CDR1)、S I S S G G (配列番号: 62) (CDR2)、及び/又は F C G S (配列番号: 63) (CDR3)を含む、ハイブリドーマ細胞株 5210-87-13により作製される抗体の重鎖に存在する1又は複数のCDRを含んでよい。

【0056】

一部の実施態様において、A P O B E C 3ファミリーの1つのファミリーメンバーに特異的に結合する抗体はまた、例えば、A P O B E C 3 A (A3A); A P O B E C 3 B (A3B); A P O B E C 3 C (A3C); A P O B E C 3 D (A3D); A P O B E C 3 F (A3F); A P O B E C 3 G (A3G); 及び/又は、A P O B E C 3 H (A3H)を含む、A P O B E C 3ファミリーの他のメンバーにも特異的に結合するであろう(図3)。例えば、ハイブリドーマ細胞株 5210-08-15、ハイブリドーマ細胞株 5210-76-29、ハイブリドーマ細胞株 5211-110-19、及びハイブリドーマ細胞株 5211-142-12由来の抗体は、A3A及びA3Bを認識し; ハイブリドーマ細胞株 5206-235-07由来の抗体は、A3B及びA3Fを認識し; ハイブリドーマ細胞株 5210-55-19及びハイブリドーマ細胞株 5210-87-13由来の抗体は、A3A、A3B、及びA3Gを認識することができる(図3、図8B、及び図9B)。

【0057】

A P O B E C 3タンパク質に結合する抗体の作製方法

1又は複数の実施態様において、A P O B E C 3 Bに特異的なエピトープは、A P O B E C 3 Bに特異的に結合する抗体を作製するために使用することができる。例えば、A3B残基171-194を表しているW Y K F D E N Y A F L H R T L K E I L R Y L M D (配列番号: 64)及び/又はA3B残基354-382を表しているC P F Q P W D G L E E H S Q A L S G R L R A I L Q N Q G N (配列番号: 65)は、哺乳動物を免疫化し、抗体-産生細胞を作製するために使用することができる。宿主動物又はそれから培養された抗体-産生細胞の経路及びスケジュールは、一般に抗体の刺激及び産生に関する確立された従来の技術に沿うものである。宿主動物は、例えば、ウサギ、マウス、又はヒト対象もしくはそれから得られた抗体-産生細胞を含む任意の他の哺乳動物であってよい。一部の実施態様において、標的アミノ酸配列を含む抗原、エピトープ、又は断片は、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、オボアルブミンなど、免疫化された種において免疫原性であるタンパク質にコンジュゲートされてよい。加えて、当業者は、ポリクローナル抗体、並びにモノクローナル抗体の精製及び濃縮に関する免疫学技術分野において共通の様々な技術を知っているであろう。

【0058】

モノクローナル抗体の調製物もまた、当業者に周知である。例えば、Kohler及びMilstein、Nature 1975、256:495; Coliganら、第2.5.1-2.6.7節1及び、Harlowら、「抗体及び実験マニュアル(ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL)」、726頁(Cold Spring Harbor Pub. 1988)を参照されたい。簡単には、モノクローナル抗体は、抗原を含有する組成物の、例えばマウス又はウサギを含む動物への注射; 血清試料の分析による抗体産生の存在の証明; Bリンパ球を得るための、脾臓の摘出; ハイブリドーマを作製するための、Bリンパ球の骨髓腫細胞との融合; 該ハイブリドーマのクローニング; 該抗原に対する抗体を産生する陽性クローンの選択; 及び、該ハイブリドーマ培養物からの抗体の単離により得ることができる。モノクローナル抗体は、様々な良く確立された技術により、ハイブリドーマ培養物から、単離及び精製されることができる。かかる単離技術は、プロテインAセファロースによるアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及びイオン交換クロマトグラフィーを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 9 】

一部の実施態様において、抗体は、宿主細胞及び単離された細胞により産生されてよい。特定の実施態様において、細胞は、ハイブリドーマ細胞である。一部の追加の実施態様において、ハイブリドーマ細胞株は、5 2 0 6 - 2 3 5 - 0 7、5 2 1 0 - 7 6 - 2 9、5 2 1 0 - 0 8 - 1 5、5 2 1 1 - 1 1 0 - 1 9、5 2 1 1 - 1 4 2 - 1 2、5 2 1 0 - 5 5 - 1 9、及び/又は5 2 1 0 - 8 7 - 1 3である。

## 【 0 0 6 0 】

一部の実施態様において、抗体はまた、組換えDNA法により作製されてもよい。モノクローナル抗体をコードしているDNAは、従来の手順を使用し(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合することが可能であるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより)、容易に単離され並びに配列決定されてよい。ハイブリドーマ細胞又はハイブリドーマ細胞株は、かかるDNAの給源として働くことができる。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに配置され、これは次に、例えば、2 9 3 F細胞、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、そうであれば免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞などの宿主細胞へとトランスフェクションされ、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば相同配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列で置換することによるか、又は非-免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てもしくは一部を免疫グロブリンコード配列に共有的に結合することにより、修飾されてよい。

## 【 0 0 6 1 】

一部の実施態様において、発現ベクターは、ハイブリドーマ細胞株5 2 0 6 - 2 3 5 - 0 7、ハイブリドーマ細胞株5 2 1 0 - 7 6 - 2 9、ハイブリドーマ細胞株5 2 1 0 - 0 8 - 1 5、ハイブリドーマ細胞株5 2 1 1 - 1 1 0 - 1 9、ハイブリドーマ細胞株5 2 1 1 - 1 4 2 - 1 2、ハイブリドーマ細胞株5 2 1 0 - 5 5 - 1 9、及び/又はハイブリドーマ細胞株5 2 1 0 - 8 7 - 1 3により作製された抗体をコードしている核酸配列を含む。

## 【 0 0 6 2 】

抗体断片は、完全な抗体のタンパク質分解性加水分解によるか、又はその断片をコードしている核酸の発現により、調製することができる。抗体断片は、従来の方法による完全な抗体のペプシンもしくはパインによる消化により得ることができる。例えば、抗体断片は、F(a b)2を意味する5 S断片を提供するための、ペプシンによる抗体の酵素的切断により作製され得る。この断片はさらに、チオール還元剤、及び任意にジスルフィド連結の切断から生じるスルフヒドリル基のブロック基を使用し切断され、3 . 5 S F a b 一価断片を作製することができる。一部の場合において、ペプシンを使用する酵素的切断を使用し、2つの一価のF a b断片及びF c断片を直接作製することができる。

## 【 0 0 6 3 】

一価の軽重鎖断片を形成するための重鎖の分離、更なる断片の切断、又は他の酵素的、化学的若しくは遺伝的技術のような、抗体を切断する他の方法もまた、そのエピトープに結合する能力の一部を保持する(例えば選択的に結合する)断片を提供するために、使用することができる。

## 【 0 0 6 4 】

本明細書に提供される抗体は、実質的に純粋であることができる。抗体に言及して本明細書において使用される用語「実質的に純粋」とは、抗体が、それと天然に会合されている他のポリペプチド、脂質、糖質、及び核酸を実質的に含まないことを意味する。したがって実質的に純粋な抗体は、その天然の環境から取り除かれ、且つ少なくとも60%純粋である、任意の抗体である。実質的に純粋な抗体は、少なくとも約65%純粋、少なくとも約70%純粋、少なくとも約75%純粋、少なくとも約80%純粋、少なくとも約85%純粋、少なくとも約90%純粋、少なくとも約95%純粋、又は少なくとも約99%純粋であることができる。

## 【 0 0 6 5 】

A P O B E C 3 ( A 3 ) タンパク質に結合する抗体の使用法

A P O B E C 3 ( A 3 ) ファミリーの 1 又は複数のメンバーに、特に A P O B E C 3 B に特異的に結合する抗体は、例えば、分子生物学、免疫学、及び / 又は癌生物学のための研究試薬として、並びに A P O B E C 3 B 発現に関する、診断試験及び / 又は予後試験のための臨床試薬として含む、多種多様な適用において使用することができる。抗体は、例えば、酵素結合免疫吸着検定法 ( E L I S A )、免疫プロット法 ( I B )、免疫沈降 ( I P )、免疫組織化学 ( I H C )、免疫蛍光測定 ( I F )、及び / 又はフローサイトメトリーなどのために使用することができる。

**【 0 0 6 6 】**

アッセイは、定量的及び / 又は定性的であることができ、且つ例えば、細胞内、細胞膜上、組織内、及び体液内を含む、様々な位置における、1 又は複数の A P O B E C 3 ( A 3 ) ファミリーメンバーの発現を検出することができる。アッセイは、例えば、正常及び / 又は異常なタンパク質発現のレベルを決定するために使用することができる。

10

**【 0 0 6 7 】**

一部の実施態様において、装置は、1 又は複数の A P O B E C 3 ( A 3 ) タンパク質に特異的に結合する抗体を含むことができる。一部の実施態様において、装置は、1 又は複数の A P O B E C 3 ( A 3 ) タンパク質に特異的に結合する 1 又は複数の抗体を、基板に固定することを含む。一部の実施態様において、抗体又は抗体類は、抗体マイクロアレイ、抗体チップ、及び / 又はタンパク質チップの一部として基板上に固定されてよい。

**【 0 0 6 8 】**

本発明は、下記実施例により例示される。特定の実施例、物質、量、及び手順は、以下に説明するような本発明の範囲及び精神に従い、広範に解釈されるべきであることは理解されるべきである。

20

**【 実施例 】****【 0 0 6 9 】**実施例エピトープ選択

7 種のヒト A P O B E C 3 ( A 3 ) 酵素の完全タンパク質配列を、G e n B a n k から得た：A P O B E C 3 A ( A 3 A )、G e n B a n k : A A I 2 6 4 1 7 . 1 ; A P O B E C 3 B ( A 3 B )、G e n B a n k : A A W 3 1 7 4 3 . 1 ; A P O B E C 3 C ( A 3 C )、G e n B a n k : A A H 1 1 7 3 9 . 1 ; A P O B E C 3 D ( A 3 D )、G e n B a n k : A I C 5 7 7 3 1 . 1 ; A P O B E C 3 F ( A 3 F )、G e n B a n k : A A Z 3 8 7 2 0 . 1 ; A P O B E C 3 G ( A 3 G )、G e n B a n k : A A Z 3 8 7 2 2 . 1 ; A P O B E C 3 H ( A 3 H )、G e n B a n k : A C K 7 7 7 7 4 . 1 。

30

**【 0 0 7 0 】**

C l u s t a l W を使用し、A P O B E C 3 B ( A 3 B ) に独自の領域を同定した。2 つの領域を、ペプチド免疫原の合成のために選択した。ペプチドは、E p i t o m i c s 社 ( パーリングーム、C A ) により合成した。ペプチド 1 0 である W Y K F D E N Y A F L H R T L K E I L R Y L M D ( 配列番号 : 6 4 ) は、A 3 B 残基 1 7 1 - 1 9 4 を表す。ペプチド 1 2 である C P F Q P W D G L E E H S Q A L S G R L R A I L Q N Q G N ( 配列番号 : 6 5 ) は、A 3 B 残基 3 5 4 - 3 8 2 を表す。A 3 B に独自ではあるが、ファミリーメンバー間での広範な相同性は、不可避であり：ペプチド 1 0 は、A 3 F と 2 0 / 2 4 残基を共有し、並びにペプチド 1 2 は、A 3 A と 2 7 / 2 8 残基及び A 3 G と 2 5 / 2 8 残基を共有する ( 表 1 ) 。

40

**【 0 0 7 1 】**



## 【表 1】

表 1. APOBEC3タンパク質に対する免疫化ペプチドの相同性

ペプチド	長さ	A3A	A3B	A3C	A3D	A3F	A3G	A3H
ペプチド10	24	5	24	7	19	20	11	5
ペプチド12	28	27	28	7	7	9	25	6

## 【0072】

## 免疫化及びハイブリドーマ作出

2匹のウサギを、各ペプチド免疫原（E p i t o m i c s 社、バーリンゲーム、CAと契約）により免疫化した。ウサギには、10～12週間の過程で、KLH-コンジュゲートしたペプチドを用い3回注射し、その後OVA-コンジュゲートしたペプチドによりさらに2回注射した。ウサギからの被験採血物を、抗-A3B発現について、免疫プロット法（IB）により、スクリーニングした（Towbinら、Proc. Nat'l Acad. Sci. U S A. 1979; 76(9):4350-4）。 10

## 【0073】

A3-HAタンパク質を発現した293T細胞からの溶解液を、SDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレンに移し、リン酸緩衝食塩水（PBS）を溶媒とする50% B L O K（M i l l i p o r e 社、ダルムシュタット、独国）、0.1% T w e e n - 20中に、1/1000希釈した被験採血物により免疫プロットした。 20

## 【0074】

この採血物を、A3B-GFPタンパク質を発現しているHeLa細胞の免疫蛍光顕微鏡（IF）により、さらにスクリーニングした。HeLa細胞は、4%パラホルムアルデヒド（PFA）中で固定し、0.01% T r i t o n X - 100により透過処理し、次に1×PBSを溶媒とする5%ヤギ血清、1%BSA、0.2% T r i t o n X - 100中のウサギ血清（1:200）と共に、インキュベーションした。A3B結合は、抗-ウサギ-T R I T C（1:500）により可視化した。

## 【0075】

3匹の抗-A3B陽性ウサギ（5206、5210、5211）を、B細胞単離及びハイブリドーマ作製のために脾臓を摘出する前に、最終免疫化ブーストのために選択した。 30  
選択されたウサギ由来のリンパ球による、40×96-ウェルプレートのハイブリドーマ融合は、E p i t o m i c s 社（バーリンゲーム、CA）により行った。ハイブリドーマ上清は、組換えA3B c t d - m y c -（H I S）。精製タンパク質に対するE L I S Aスクリーニングにより、反応性抗-A3B抗体についてスクリーニングした（Burnsら、2013, Nature 494(7437):366-370）。代表的データは、図1に示している。候補ハイブリドーマを、増殖した。

## 【0076】

## ハイブリドーマスクリーニング

## 免疫プロット法

E L I S A - 陽性単クローンハイブリドーマ由来の培養培地上清を、免疫プロット法によりスクリーニングした。A3-HAタンパク質を発現している293T細胞（Hultquistら、J. Virol. 2011; 85, 11220-34）由来の溶解液を、SDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレンへ移し、並びにPBSを溶媒とする50% B L O K（M i l l i p o r e 社、ダルムシュタット、独国）、0.1% T w e e n 20中のハイブリドーマ細胞培地上清（1:3）により、免疫プロットし、抗-ウサギI g G I R 8 0 0 C W二次抗体（L I - C O R B i o s c i e n c e s 社、リンカーン、NE）により検出し、L I - C O Rイメージング（L I - C O R B i o s c i e n c e s 社、リンカーン、NE）により画像化した。代表的データは、図3に示している。 40

## 【0077】

## 免疫蛍光測定法

E L I S A - 陽性単クローンハイブリドーマ由来の培養培地上清を、免疫蛍光顕微鏡によりスクリーニングした。蛍光 A 3 タンパク質を発現している H e L a 細胞を、4 % パラホルムアルデヒド中で固定し、0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0 により透過処理し、次に 1 × P B S を溶媒とする 5 % ヤギ血清、1 % B S A 、0 . 2 % T r i t o n X - 1 0 0 中で細胞培地上清 ( 1 : 5 ) とインキュベーションした。A 3 B 結合を、抗 - ウサギ - T R I T C ( 1 : 5 0 0 ) により可視化した。代表的データを、図 4 に示している。

#### 【 0 0 7 8 】

##### ハイブリドーマ増殖

最強の、最も特異的な抗 - A 3 B 血清を発現している 7 種の単クローンハイブリドーマ ( 5 2 0 6 - 2 3 5 - 0 7 、 5 2 1 0 - 0 8 - 1 5 、 5 2 1 0 - 5 5 - 1 9 、 5 2 1 0 - 7 6 - 2 9 、 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 、 5 2 1 1 - 1 1 0 - 1 9 、 5 2 1 1 - 1 4 2 - 1 2 ) を、同定し、増殖させ、且つストックを凍結した。

10

#### 【 0 0 7 9 】

##### E L I S A

抗 - A 3 B m A b を発現している純粋なハイブリドーマクローンを、A 3 B c t d - m y c - ( H i s )<sub>6</sub> 精製タンパク質に対する E L I S A スクリーニングにより同定した ( Burns ら、2013, Nature 494(7437):366-370)。A 3 B c t d - m y c - ( H i s )<sub>6</sub> 精製タンパク質 ( 2 0 n g / ウェル ) を、ポリスチレンプレートとの親水性及び疎水性相互作用を介して、9 6 - ウェル E L I S A プレート上に固定した。各プレートを、3 % B S A によりブロックし、次に該ハイブリドーマクローン由来の未希釈の細胞培地上清と共にインキュベーションした。結合を、抗 - ウサギ H R P 二次抗体 ( 1 : 5 0 0 0 ) により検出し、テトラメチルベンジジン ( T M B ) で可視化し、4 5 0 n m での分光法により定量した。代表的データは、図 2 に示している。

20

#### 【 0 0 8 0 】

##### モノクローナル抗体 ( m A b ) 精製

7 種の抗 - ヒト A 3 B ハイブリドーマを、1 L まで増殖させ、次に無血清培地へ 1 週間交換した。この培地を、細胞を除去する遠心分離により透明化し、その後プロテイン A ( B o c a S c i e n t i f i c 社、ボカラトン、F L ) 上を通過させ、I g G に結合させた ( Wilchek ら、Methods Enzymol. 1984;104:3-55)。このモノクローナル抗体を、0 . 2 M グリシン ( p H 2 . 5 ) 中で溶離し、P B S に対し透析し、アジド ( 0 . 0 2 % ) を含む B S A ( 0 . 1 m g / m L ) 中で凍結保存した。

30

#### 【 0 0 8 1 】

##### 癌細胞株における内在性 A 3 B の免疫プロット

抗 - ヒト A 3 B 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 を、A 3 B を発現している様々なヒト癌細胞株に対し、免疫プロットした。様々な癌細胞株由来の溶解液を、S D S - P A G E により分離し、P V D F メンブレンへ移し、P B S を溶媒とする 5 % ミルク、0 . 1 % T w e e n 2 0 中の抗 - ヒト A 3 B m A b ( 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 ) ( 1 : 5 0 ) により免疫プロットし、抗 - ウサギ H R P 二次抗体により検出した。細胞が A 3 B s h R N A で処理された場合に ( Burns ら、2013, Nature 494(7437):366-370)、A 3 B の発現は、減少又は除去され、図 5 A に示されたように A 3 B 発現をノックダウンし、これはこの m A b の特異性を明らかにしている。

40

#### 【 0 0 8 2 】

##### 内在性 A 3 B の免疫蛍光顕微鏡

抗 - ヒト A 3 B m A b ( 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 ) を使用し、内在性 A 3 B を検出した。U 2 O S 細胞を、4 % パラホルムアルデヒド中で固定し、0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0 で透過処理し、その後 1 × P B S 中の 5 % ヤギ血清、1 % B S A 、0 . 2 % T r i t o n X - 1 0 0 中で抗 - ヒト A 3 B m A b ( 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 ) とインキュベーションした。A 3 B 結合は、抗 - ウサギ - T R I T C ( 1 : 5 0 0 ) により可視化した。A 3 B の発現は、細胞が、A 3 B s h R N A で処理された場合に、減少又は除去され、これは図 5 B に示したように A 3 B 発現をノックダウンした。

50

## 【 0 0 8 3 】

重鎖及び軽鎖配列決定

240E-W融合パートナー由来のウサギハイブリドーマ株は、変動量の内在性Ig重鎖を発現する（米国特許第7,429,487号）。これは、該Ig軽鎖に関するBリンパ球から選択されたIg重鎖と競合し、所望のmAbの低下した力価及び親和性を生じる。これらの抗-HitA3B mAbの有効性を改善するために、Ig重鎖及び軽鎖遺伝子を、以下のように配列決定した。

## 【 0 0 8 4 】

## RNA精製

ハイブリドーマ細胞（ $1 \times 10^7$ 個細胞）を、RNeasyカラム（Qiagen N.V.社、ヒルデン、独国）を通した遠心分離により剪断し、RNAを、RNeasyカラム（Qiagen N.V.社、ヒルデン、独国）を用い精製した。

## 【 0 0 8 5 】

## Ig軽鎖及び重鎖遺伝子の定常領域のcDNA配列決定

前記ウサギハイブリドーマから精製したRNAを、逆転写のための鋳型として使用し、オリゴ-dT（3' RACEアダプターGCGAGCACAGAAATTAATACGACTCTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTTVN（配列番号：66））からプライミングし、cDNAを合成した。ウサギ免疫グロブリン（Ig）重鎖及び軽鎖遺伝子の定常領域を、ウサギIg重鎖又は軽鎖遺伝子定常領域に対する5'プライマー（Hc定常5'アウタープライマーATCAGTCTTCCCACTGGCC（配列番号：67）、Hc定常5'インナープライマーGGGACACACCCAGCTCC（配列番号：68）、Ig Lc 5'アウタープライマーCATGAGGGCCCCCACT（配列番号：69）、Ig Lc 5'インナープライマーTCCTGCTGCTCTTGCTC（配列番号：70））、及び3' RACEプライマー（3' RACEアウタープライマーGCGAGCACAGAAATTAATACGACT（配列番号：71）、3' RACEインナープライマーCGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG（配列番号：72））を使用する、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅した。このDNA産物を、pJET1.2/プラントベクター（CloneJET PCRクローニングキット、Thermo Fisher Scientific社、ウォルサム、MA）に連結させ、且つ配列決定した。これらの軽鎖遺伝子のDNA配列及びタンパク質配列は、図8A及び図8Bに示している。プライマー配列の統合リストについては、表2を参照されたい。

## 【 0 0 8 6 】

10

20

30

【表 2】

表2 DNAプライマーの統合リスト ウサギハイブリドーマ由来のIg cDNAをクローニングするためのPCR反応において使用したオリゴヌクレオチドプライマー

説明	番号	配列	
3' RACEアダプター	RSH7898	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTA TAGGTTTTTTTTTTTTVN	配列番号:66
3' RACEアウタープライマー	RSH9123	GCGAGCACAGAATTAATACGACT	配列番号:71
3' RACEインナープライマー	RSH9124	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTA TAGG	配列番号:72
Ig Lc 5' アウター	RSH8352	CATGAGGGCCCCCACT	配列番号:69
Ig Lc 5' インナー	RSH8353	TCCTGCTGCTCTGGCTC	配列番号:70
Hc定常領域5' アウター	RSH8348	ATCAGTCTTCCCACTGGCC	配列番号:67
Hc定常領域5' インナー	RSH8360	GGGACACACCCAGCTCC	配列番号:68
RLM-RACE 5' RACEアダプター	RSH8512	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUU UGCUGGCUUUGAUGAAA	配列番号:73
5' RACEアウタープライマー	RSH9121	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	配列番号:74
5' RACEインナープライマー	RSH9122	CGCGGATCCGAACACTGCCTTTGCTGGC TTTGATG	配列番号:75
Ig Hc 5' アウターリバース	RSH8359	GGCCAGTGGGAAGACTGAT	配列番号:76
Ig Hc 5' インナーリバース	RSH8361	GGAGCTGGGTGTGTCCC	配列番号:77
Ig鎖アウター(リバース)	RSH9011	CCGGGAGGTAGCCTTTGACC	配列番号:78
Ig鎖インナー(リバース)	RSH9012	GAGGGTGCCCGAGTTCAG	配列番号:79
IgHc 3'-Jh3/5 リバース	RSH9046	CRGTGACCAGGGTGCCCTG	配列番号:80
IgHc 5'-Jh3/5 リバース	RSH9045	CCCCAGRGATCCAACCRRTC	配列番号:81
Kpn-5' Ig Kc	RSH8356	gaggtaccATG GAC ATG AGG GCC CC	配列番号:82
Xho-3' Ig Kc	RSH8357	AGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAGct cgagacgc	配列番号:83
5'-NheI Ig Vh	RSH9119	CAGgctagcaccATGGAGACTGGGCTGC GC	配列番号:84
3'-MluI Ig Hc	RSH8986	tagacgcgtTCAtttaCCCGGAGAGCGG GAG	配列番号:85

## 【0087】

重鎖Ig遺伝子の可変領域のcDNA配列決定

5' RLM-RACEを、FIRST CHOICE RLM-RACEキット(Ambion、Invitrogen社、カールスバッド、CA)を用いて実行した(Maruyamaら、Gene. 1994; 138(1-2):171-4)。RNAを、ウシ小腸ホスファターゼにより処理し、分解されたmRNAからリン酸分子を除去した。次に、タバコ酸性ホスファターゼ処理は、完全長mRNAからキャップを除去した。その後5' RACEアダプター(RLM-RACE 5' RACEアダプターGCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA(配列番号:73))を、このmRNAに連結した。逆転写を実行し、ランダム六量体からプライミングし、cDNAを合成した。ウサギIg重鎖遺伝子の可変領域を、5' RACEアダプターに対する5' 入れ子式プライマー(5' RACEアウタープライマーGCTGATGGCGATGAATGAACACTG(配列番号:74)、5' RACEインナープライマーCGCGGATCCGAACACTGCGTTTGTGCTGGCTTTGATG(配列番号:75))、及びウ

10

20

30

40

50

サギ I g 重鎖定常領域に対する 3' 入れ子式プライマー (I g H c 5' アウターリバー  
 ス G G C C A G T G G G A A G A C T G A T (配列番号: 76)、I g H c 5' イ  
 ンナーリバー ス G G A G C T G G G T G T G T C C C (配列番号: 77)、I g 鎖アウタ  
 ー (リバー ス) C C G G G A G G T A G C C T T T G A C C (配列番号: 78)、I g 鎖  
 インナー (リバー ス) G A G G G T G C C C G A G T T C C A G (配列番号: 79)、I  
 g H c 3' - J h 3 / 5 リバー ス C R G T G A C C A G G G T G C C C T G (配列番号  
 : 80)、I g H c 5' - J h 3 / 5 リバー ス C C C C A G R G A T C C A A C C R R  
 T C (配列番号: 81)) を使用する、2 ラウンドの P C R により増幅した。この D N A  
 産物を、p J E T 1 . 2 / プラントベクター (C l o n e J E T P C R クローニングキ  
 ャット、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社、ウォルサム、M A) にク  
 ローニングし、且つ配列決定した。これらの重鎖遺伝子の D N A 配列及びタンパク質配列  
 は、図 9 A 及び図 9 B に示している。プライマー配列の統合リストについては、表 2 を参  
 照されたい。

10

#### 【0088】

##### 重鎖及び軽鎖サブクローニング

ウサギのハイブリドーマ重鎖及び軽鎖 I g 遺伝子を、遺伝子特異的プライマー (K p n  
 - 5' I g L c g a g g t a c c A T G G A C A T G A G G G C C C C  
 (配列番号: 82)、X h o - 3' I g L c A G A G C T T C A A T A G G G G T  
 G A C T G T T A G c t c g a g a c g c (配列番号: 83)、5' - N h e 1 I g  
 H c C A G g c t a g c a c c A T G G A G A C T G G G C T G C G C (配列番号: 8  
 4)、3' - M l u 1 I g H c t a g a c g c g t T C A t t t a C C C G G A G  
 A G C G G G A G (配列番号: 85)) を使用し、p J E T 1 . 2 から、P C R により増  
 幅し、並びに p c D N A 3 . 1 + 真核細胞発現ベクター (L i f e T e c h n o l o g  
 i e s、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社、ウォルサム、M A) へ  
 サブクローニングした。プライマー配列の統合リストについては、表 2 を参照されたい。

20

#### 【0089】

##### 高力価ウサギ抗 - ヒト A 3 B m A b を発現するためのプロトコール

ウサギハイブリドーマ 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 及び 5 2 1 1 - 1 1 0 - 1 9 に関する重鎖  
 及び軽鎖 I g 遺伝子を、無血清 F r e e s t y l e 培地 (L i f e T e c h n o l o g  
 i e s、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社、ウォルサム、M A) に  
 おいて、2 9 3 F 細胞 (L i f e T e c h n o l o g i e s、T h e r m o F i s h  
 e r S c i e n t i f i c 社、ウォルサム、M A) へ、ポリエチレンイミン (P E I)  
 を、P E I : D N A 比 3 : 1 で使用し、トランスフェクションした。

30

#### 【0090】

培養培地 1 5 0 m L を収集し、且つモノクローナル抗体を、プロテイン A アフィニティ  
 クロマトグラフィー (B o c a S c i e n t i f i c 社、ボカトロン、F L) により精  
 製した。これらのモノクローナル抗体を、0 . 2 M グリシン (p H 2 . 5) で溶離し、P  
 B S に対し透析し、アジド (0 . 0 2 %) を含む B S A (0 . 1 m g / m L) 中で凍結保  
 存した。モノクローナル抗体 5 2 1 0 - 8 7 - 1 3 濃度 1 3 µ g / m L、5 2 1 1 - 1 1  
 0 - 1 9 濃度 3 6 µ g / m L。

40

#### 【0091】

本明細書に引用された全ての特許、特許出願、及び刊行物、並びに電子的に入手可能な  
 もの (例として、例えば G e n B a n k 及び R e f S e q などの、ヌクレオチド配列提出  
 物、並びに例えば S w i s s P r o t、P I R、P R F、P D B などの、アミノ酸配列提  
 出物、並びに G e n B a n k 及び R e f S e q の注釈付きコード領域からの翻訳物を含む  
 ) の完全な開示は、引用により組み込まれている。本出願の開示と引用により本明細書中  
 に組み込まれている任意の文書の開示の間に矛盾が存在する場合には、本出願の開示が支  
 配することとする。前述の詳細な説明及び実施例は、理解を明確にするためにのみ示され  
 ている。それらからの不必要な限定はないと、理解されるべきである。本発明は、示され  
 且つ説明されたまさにその詳細に限定されるものではなく、当業者に明らかな変形は、請

50

求項により規定される本発明内に含まれるであろう。

【 0 0 9 2 】

別に指定しない限りは、本明細書及び請求項において使用される成分、分子量、及びそのようなものの量を表現している全ての数字は、用語「約」により全ての場合において修飾されていると理解されるべきである。したがって、その反対であることを別に指定しない限りは、本明細書及び請求項において言及される数字パラメータは、本発明により得ようとされる所望の特性に応じて変動し得る近似値である。各数字パラメータは、少なくとも、請求項の範囲と同等の理論(doctrine)を限定することを企図するものとしてではなく、報告された有効数字の数字を考慮し、通常の丸め法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

【 0 0 9 3 】

本発明の広範な範囲を示す数字範囲及びパラメータは近似値であるにもかかわらず、特定の実施例において示された数値は、可能な限り正確に報告されている。しかし全ての数値は、それらの各試験測定値において認められる標準偏差から必ず生じる範囲を本質的に含む。

【 0 0 9 4 】

全ての見出しは、読者の便宜のためであり、そのように特定しない限りは、見出しの後の本文の意味を限定するために使用されるべきではない。

【 図 1 】

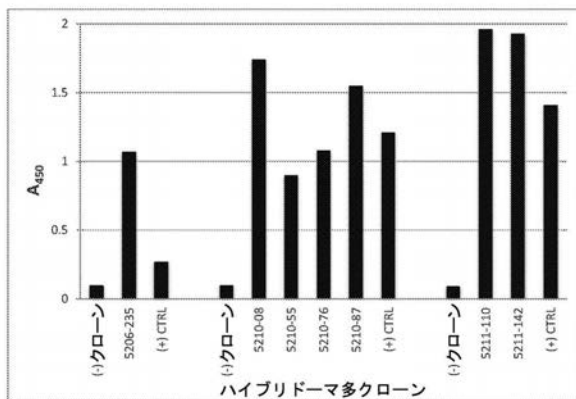


Fig. 1

【 図 2 】

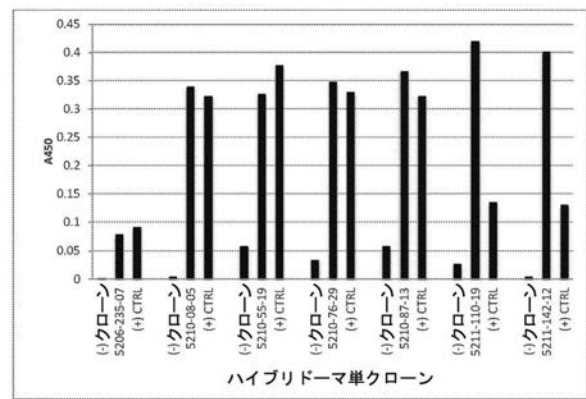


Fig. 2

【 図 3 】

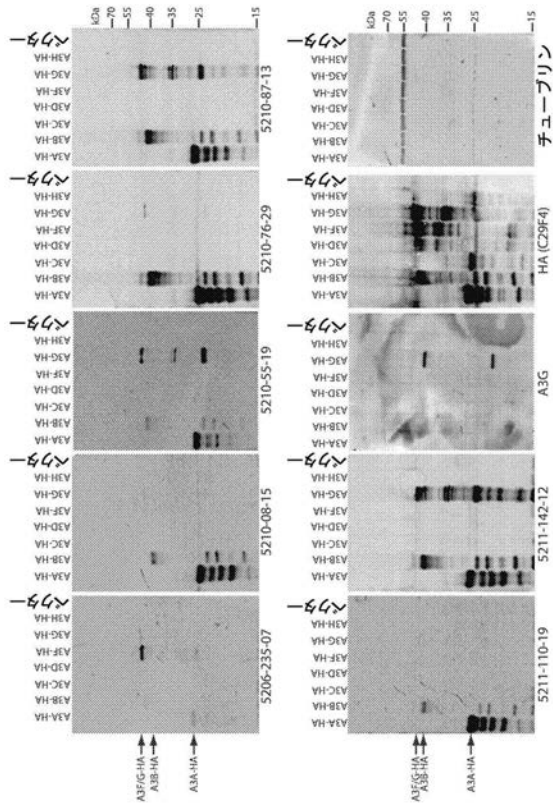


Fig. 3

【 図 4 】

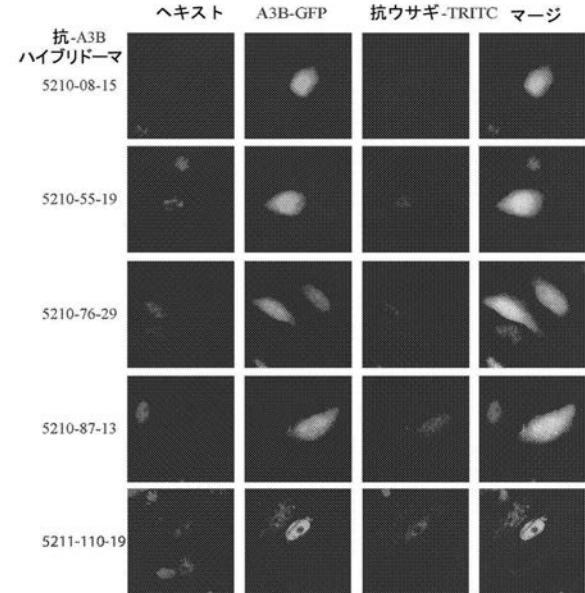


Fig. 4

【 図 5 】

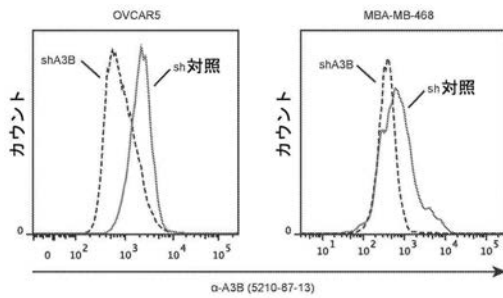


Fig. 5

【 図 6 】

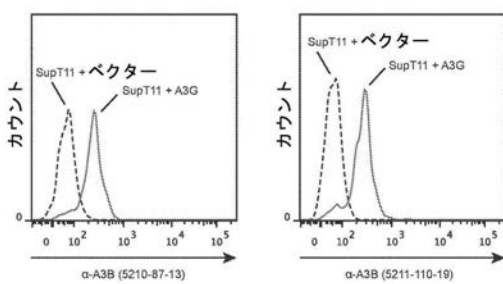
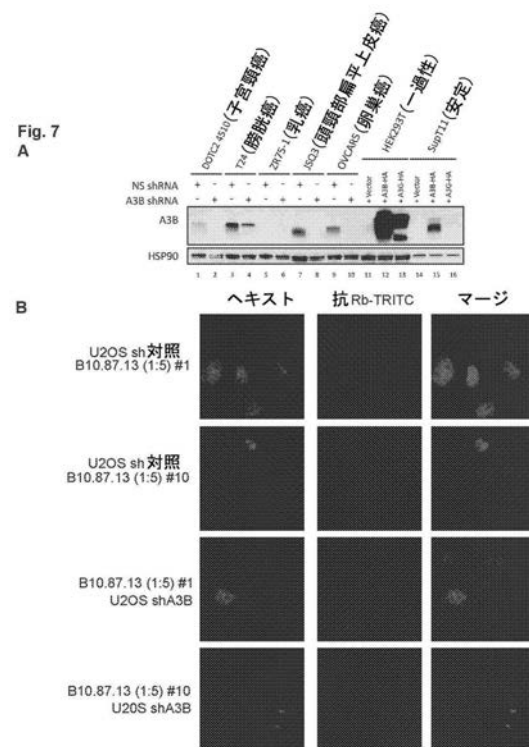


Fig. 6

【 図 7 】



【図 8 A】

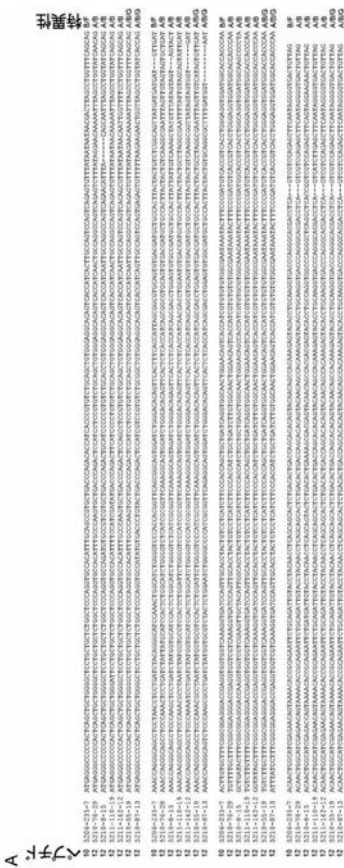


Fig. 8

【図 8 B】

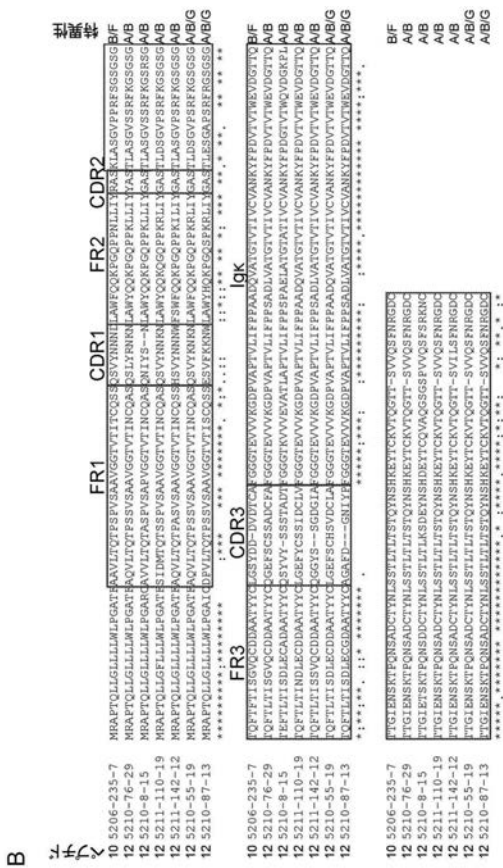


Fig. 8 (Cont.)

【図 9 A】

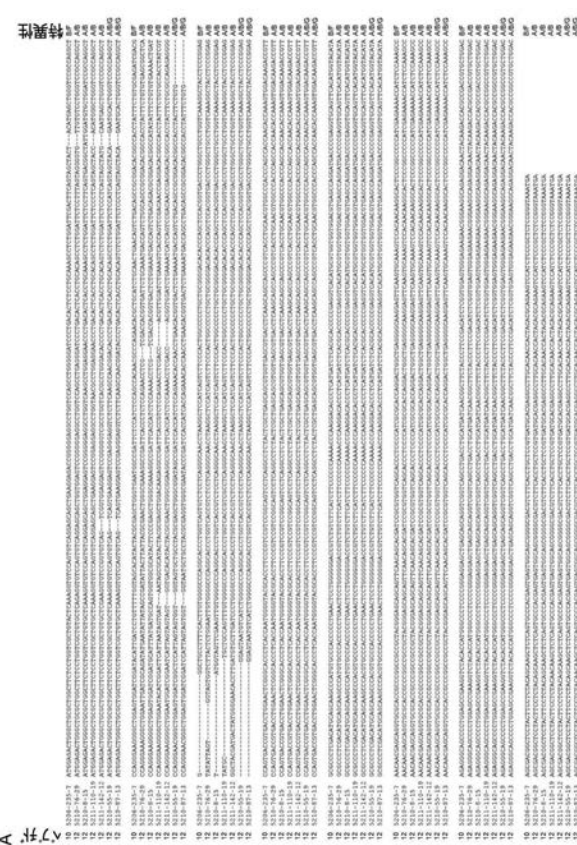


Fig. 9

【図 9 B】

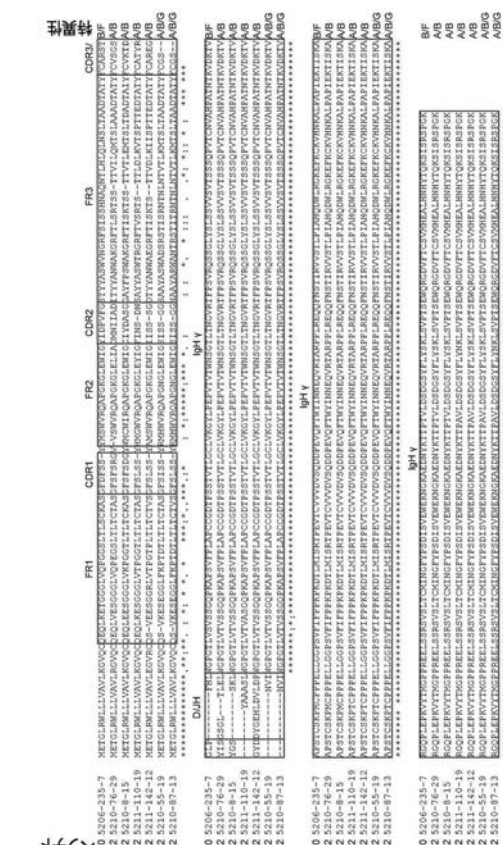


Fig. 9 (Cont.)



【配列表】

2018527895000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US16/40011
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 15/63, 15/12; C07K 16/18 (2016.01) CPC - C12N 15/63, 15/12; C07K 16/18 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(8): C12N 15/63, 15/12; C07K 16/18; G01N 33/68 (2016.01) CPC: C12N 15/63, 15/02; C07K 16/18; G01N 33/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; PubMed; EBSCO Discovery Service; Monoclonal, Antibody, APOBEC3A, APOBEC3B, hybridoma, vector		
<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	APOBEC3B mouse monoclonal antibody (hybridoma) [online]. Abnova. 2014 [retrieved on 2016-10-20]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=H00009582-M>; pages 1.	1, 2 24
Y	US 2011/0274709 A1 (NIXON, DF et al.) November 10, 2011; paragraphs [0058], [0245]-[0246]	24
A	US 2010/0197768 A1 (SMITH, HC et al.) August 5, 2010; paragraphs [0126], [0131], [0134]	3/1-2, 27, 34
A	US 2013/0245237 A1 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC.) September 19, 2013; claim 1	10/1-2
A	WO 2010/006214 A1 (AMBRX, INC.) January 14, 2010; page 335, lines 42-46; page 335, lines 42-46	10/1-2
A	US 2009/0291077 A1 (SMITH, JTL et al.) November 26, 2009; paragraph [0218]	12/1-2
A	WO 2008/144753 A2 (ALDER BIOPHARMACEUTICALS, INC.) November 27, 2008; paragraph [0267]	12/1-2
P,X	Monoclonal Antibodies [online]. NIH AIDS Reagent Program. 2016 [retrieved on 2016-10-21]. Retrieved from the Internet: <URL: http://https://www.aidsreagent.org/catalog_download_files/008_mon_antibodies.pdf>; pages 1-11.	3/1-2, 27, 34
L	Okura, R. et al. 'Expression of AID in malignant melanoma with BRAF <sup>V600E</sup> mutation.' Exper. Dermatol. 2014; 23:345-368. Provided to establish disclosure of APOBEC3B antibody, above, before the end of 2014; page 347, second column, second paragraph.	1, 2, 24
<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 21 October 2016 (21.10.2016)		Date of mailing of the international search report 12 DEC 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/40011

**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.: 11, 13-23, 26  
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:

\*\*\*-Please See Supplemental Page-\*\*\*

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.:

Groups I+, Claims 1-10, 12, 24, 25, 27-34; SEQ ID NO: 8, 29, 63; hybridoma 5206-235-07

**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**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/US16/40011

\*\*\*Continuation of 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 must be paid.

Groups I+, Claims 1-10, 12, 24, 25, 27-34; hybridoma 5206-235-07 and SEQ ID NOs: 8, 29 and 64 are directed toward a monoclonal antibody that specifically binds to one or more APOBEC3 (A3) proteins; a hybridoma producing said antibody; a method for producing said antibody; and a vector expressing a nucleic acid sequence encoding said antibody.

The antibody will be searched to the extent that it comprises an amino acid sequence encompassing SEQ ID NO: 8 (first exemplary amino acid sequence); and a CDR1 encompassing SEQ ID NO: 29 (first exemplary LCDR1 sequence). The hybridoma will be searched to the extent that it encompasses hybridoma 5206-235-07 (first exemplary hybridoma). The method will be searched to the extent that it encompasses SEQ ID NO: 64 (first exemplary antigenic polypeptide sequence). Applicant is invited to elect additional antibody and/or LCDR1 sequence(s) with specified SEQ ID NO: for each; and/or hybridoma(s) and/or antigenic polypeptide sequence(s) with specified SEQ ID NO: for each, to be searched. Additional antibody, LCDR1, and/or antigenic polypeptide sequence(s), and/or hybridoma(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-3, 10 (in-part), 12 (in-part), 24 (in-part), 27 and 34 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 8 (amino acid sequence); SEQ ID NO: 29 (LCDR1 sequence), 5206-235-07 (hybridoma) and SEQ ID NO: 64 (antigenic polypeptide sequence). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected sequence(s) and/or hybridoma(s). 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/examined. An exemplary election would be an antibody sequence encompassing SEQ ID NO: 9 (first exemplary elected antibody sequence).

No technical features are shared between the antibody sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori. No technical features are shared between the LCDR1 sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori. No technical features are shared between the antigenic sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori. No technical features are shared between the hybridomas of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: a monoclonal antibody that specifically binds to one or more APOBEC3 (A3) proteins; a hybridoma; a method of producing an antibody comprising the steps of: immunizing a host animal with at least one of WYKFDENYAFHLRTLKEILRYLMD (SEQ ID NO: 64) and CPFQPWDGLEEHSQALSGRLRAILQNQGN (SEQ ID NO: 65); and harvesting a cell that produces antibodies to one or more members of the APOBEC3 (A3) family; and a vector expressing a nucleic acid sequence encoding antibody produced by at least one hybridoma cell line.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2011/0274709 A1 to Nixon et al. (hereinafter 'Nixon') in view of US 2010/0197768 A1 to Smith et al. (hereinafter 'Smith').

Nixon discloses a monoclonal antibody (a monoclonal antibody; paragraphs [0245], [0246]) that specifically binds to one or more APOBEC3 (A3) proteins (that specifically binds to one or more APOBEC3 (A3) proteins; paragraphs [0002], [0007], [0058], [0245]); a hybridoma (a hybridoma; paragraph [0248]); a method of producing an antibody comprising the steps of: immunizing a host animal (a method of producing an antibody comprising the steps of: immunizing a host animal; paragraph [0246]) with an immunogenic fragment of an APOBEC3 polypeptide (with a contiguous stretch of amino acids of an APOBEC3 polypeptide, including from about 20 to about 25 amino acids (with an immunogenic fragment of an APOBEC3 polypeptide); paragraphs [0058], [0059]); and harvesting a cell that produces antibodies (harvesting a cell that produces antibodies; paragraph [0246]) to one or more members of the APOBEC3 (A3) family (to one or more members of the APOBEC3 (A3) family; paragraphs [0002], [0007], [0058]). Nixon further discloses nucleic acid sequences encoding the variable regions of the antibody, or antigen binding fragments (nucleic acid sequences encoding the variable regions of the antibody, or antigen binding fragments; paragraphs [0247], [0249]); as well as the use of immunogenicity prediction (use of immunogenicity prediction; paragraph [0272]).

Nixon does not disclose with at least one of WYKFDENYAFHLRTLKEILRYLMD (SEQ ID NO: 64) and CPFQPWDGLEEHSQALSGRLRAILQNQGN (SEQ ID NO: 65); and a vector expressing a nucleic acid sequence encoding antibody produced by at least one hybridoma cell line.

Smith discloses a vector expressing a nucleic acid sequence encoding antibody produced by at least one hybridoma cell line (a vector expressing a nucleic acid sequence encoding antibody produced by at least one hybridoma cell line; paragraph [0134]), wherein the antibody binds to an APOBEC3 polypeptide (wherein the antibody binds to an APOBEC3 polypeptide; paragraph [0126]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Nixon to have included the use of specific antigenic APOBEC3 polypeptides, including either of SEQ ID NO: 64 or SEQ ID NO: 65, based on the use of immunogenicity prediction, as disclosed by Nixon, and immunization with peptides of varying lengths to identify a peptide that was both immunogenic, and effective at inducing the production of antibodies. It further would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Nixon to have included the use of a vector encoding the antibody isolated from a hybridoma, as disclosed by Smith, in order to enable the production of significant quantities of the antibodies in recombinant host cells.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Nixon and Smith references, unity of invention is lacking.

## 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(71)出願人 318010971

ウィリアム ブラウン

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 2 6, ショアビュー, ノッティンガム プレイス 4 8 8 0

(71)出願人 318010982

マイケル カーペンター

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 1 8, ミネアポリス, トゥエンティセブンス アベニュー ノース イースト 1 5 0 4

(71)出願人 318010993

エミリー ロー

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 0 4, セント ポール, ローレル アベニュー 8 3 0, アパートメント 6

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ルーベン エス・ハリス

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 0 8, セント ポール, キャンフィールド アベニュー 1 3 9 6

(72)発明者 ウィリアム ブラウン

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 2 6, ショアビュー, ノッティンガム プレイス 4 8 8 0

(72)発明者 マイケル カーペンター

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 1 8, ミネアポリス, トゥエンティセブンス アベニュー ノース イースト 1 5 0 4

(72)発明者 エミリー ロー

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 0 4, セント ポール, ローレル アベニュー 8 3 0, アパートメント 6

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA14

4B065 AA90X AA90Y AB04 AC14 BA08 CA25 CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA51 FA71