【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成27年5月14日(2015.5.14)

【公表番号】特表2014-504861(P2014-504861A)
【公表日】平成26年2月27日(2014.2.27)
【年通号数】公開・登録公報2014-011
【出願番号】特願2013-547455(P2013-547455)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ４０Ｂ　40/10　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/705　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　31/12　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　Ａ
Ｃ４０Ｂ　40/10　ＺＮＡ
Ｃ０７Ｋ　14/705
Ａ６１Ｋ　37/02
Ａ６１Ｐ　31/12
Ａ６１Ｐ　35/00

【手続補正書】
【提出日】平成27年3月23日(2015.3.23)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１１５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１１５】
ループ１およびループ３の両方に挿入された結合配列を有する可溶性ＭＩＣＡ分子をコードする構築物を作製するために、我々はｐＫＫ１１５を作製した。ベクターｐＫＫ１１５は、ループ１の伸長５．１ｓｐ（配列番号８２）と、他の配列をループ３にクローン化するのに好適である都合のよいＢｓｍＢＩ部位とを含む。ベクターｐＫＫ１１５は、プライマーＡＶ１４９３（配列番号１０８）およびＡＶ１４９４（配列番号１０９）を用いたｐＫＫ４６の部位特異的突然変異誘発によって作製した。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１２２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１２２】
意図する標的タンパク質であるインテグリンαＶβ３またはαＶβ５をＥＬＩＳＡプレート上の捕捉剤として使用して、ＥＬＩＳＡより、濃縮した上清の各々において可溶性ＭＩＣＡ分子が標的分子に結合する能力を測定した。それぞれのインテグリンがＥＬＩＳＡプレートのウェルの底に接着した後、ウェルを洗浄し、本分野で周知のようにブロックした。２９３Ｔ細胞によって生成および分泌された可溶性ＭＩＣＡの各サンプル（１００μｌ）を、αＶβ３またはαＶβ５を含むウェルに加え、インキュベートし、洗浄した。Ｕｌｔｒａ　ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ基質を用いて展開したヒトＭＩＣＡに対するＨＲＰコンジ

ュゲート抗体により、インテグリンによって捕捉された可溶性ＭＩＣＡ分子を検出し、光学密度を読み取った。ＭＩＣＡ特異的ＥＬＩＳＡにより、各サンプル中の可溶性ＭＩＣＡの量を決定した。結合した可溶性ＭＩＣＡ分子から特異的なインテグリンへのシグナル（全ＭＩＣＡのｎｇ当たり）が示される。非結合陰性対照ＭＩＣＡ（ｐＳＷ２７３によって生成した）からのＥＬＩＳＡシグナルを各インテグリン結合シグナルから差し引いた。対照とともに、ｐＫＫ３５～４２およびｐＫＫ４４～５６から生成された単一ペプチドインサートを有するＭＩＣＡ産物の結果を表１に示す。それらの特異的インサートのアミノ酸配列および配列番号を表２に表す。遺伝子操作によってそれらのループのうちの１つのみに挿入された結合ペプチドを有する可溶性ＭＩＣＡ分子は、インテグリン標的に結合する。

表１．可溶性ＭＩＣＡ中の単一インサートからのインテグリン結合ＥＬＩＳＡデータ
【表１】

プラスミド名称	インサートループ１	インサートループ３	MICA (pg/ウェル)	αvβ3シグナル	αvβ5シグナル	αvβ3シグナル/ng	αvβ5シグナル/ng
pKK35	野生型	His10sp	170.00	0.419	0.392	2.46	2.31
pKK36	3.1	野生型	29.00	0.550	0.526	18.97	18.14
pKK37	3.2	野生型	34.70	0.777	0.779	22.39	22.45
pKK38	3.3	野生型	9.48	0.291	0.291	30.70	30.70
pKK39	3.4	野生型	26.79	0.482	0.528	17.99	19.71
pKK40	5.1	野生型	24.87	0.485	0.675	19.50	27.14
pKK41	5.2	野生型	29.08	0.516	0.650	17.74	22.35
pKK42	5.3	野生型	24.77	0.526	0.565	21.24	22.81
pKK44	3.2sp	野生型	45.94	0.410	0.460	8.92	10.01
pKK45	3.3sp	野生型	41.32	0.393	0.410	9.51	9.92
pKK46	5.1sp	野生型	41.75	0.384	1.065	9.20	25.51
pKK47	5.3sp	野生型	29.44	0.294	0.276	9.99	9.38
pKK48	野生型	3.2sp	78.65	0.478	0.604	6.08	7.68
pKK49	野生型	3.3sp	86.75	0.508	0.478	5.86	5.51
pKK50	野生型	5.1sp	93.26	0.546	0.721	5.85	7.73
pKK51	野生型	5.3sp	96.34	0.694	1.048	7.20	10.88
pKK52	T-3.1	野生型	38.61	0.391	0.485	10.13	12.56
pKK53	T-3.5	野生型	35.16	0.659	0.800	18.74	22.75
pKK54	T-3.3	野生型	9.06	0.177	0.175	19.54	19.32
pKK55	T-5.1	野生型	33.83	0.475	0.588	14.04	17.38
pKK56	T-5.3	野生型	28.86	0.473	0.528	16.39	18.30

表２．２９３細胞において発現されたプラスミドとファージプラスミドの相関関係、それらの慣用名、ループ１、ループ３、またはループ１および３の両方に挿入されたアミノ酸配列、ならびに対応するインサートの配列番号

【表２】

プラスミド						
293	M13					
細胞	ファージ	慣用名	ループ１	配列番号	ループ３	配列番号
SW273	KK106	WT	RSEASEGNIT	13（残基190～199）	CQGEEQRFT	13（残基250～258）
KK35	KK91	3-His10			SGGSGGGSHHHHHHHHHHSGGSGGG	38
KK36	KK92	1-3.1	SRGDHPRTQ	43		
KK37	KK93	1-3.2	RTSRGDHPRTQ	46		
KK38	KK94	1-3.3	RVPRGDSDLT	49		
KK39	KK95	1-3.4	RSARGDSDHR	52		
KK40	KK96	1-5.1	VTRGDTFTQS	55		
KK41	KK97	1-5.2	RGDTFTQS	58		
KK42	KK98	1-5.3	HLARGDDLTY	61		
KK44	KK100	1-3.2sp	SGGSGGGSTSRGDHPRTQSGGSGGG	64		
KK45	KK101	1-3.3sp	SGGSGGGSRVPRGDSDLTSGGSGGG	67		
KK46	KK102	1-5.1sp	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70		
KK47	KK103	1-5.3sp	SGGSGGGSHLARGDDLTYSGGSGGG	73		
KK48	KK104	3-3.2sp			SGGSGGGSTSRGDHPRTQSGGSGGG	76
KK49	KK105	3-3.3sp			SGGSGGGSRVPRGDSDLTSGGSGGG	79
KK50		3-5.1sp			SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	82
KK51		3-5.3sp			SGGSGGGSHLARGDDLTYSGGSGGG	85
KK52	KK107	1-T-3.1	TSRGDHPRTQ	90		
KK53	KK108	1-T-3.5	GSRGDSLIMH	93		
KK54	KK109	1-T-3.3	RVPRGDSDLT	96		
KK55	KK110	1-T-5.1	VTRGDTFTQS	99		
KK56	K111	1-T-5.3	HLARGDDLTY	102		
KK84	KK112	1-T-AMY	YQSWRYSQ	105		
KK128	KK136	1-5.1sp/3-3.2sp	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70	SGGSGGGSTSRGDHPRTQSGGSGGG	76
KK129	KK137	1-5.1sp/3-5.1sp	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	82
KK130	KK138	1-5.1sp/3-5.3sp	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70	SGGSGGGSHLARGDDLTYSGGSGGG	85
KK131	KK139	1-5.1sp/3-5.1spNH	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	70	SGGSGGGSVTRGDTFTQSSGGSGGG	82