

【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】令和2年6月18日(2020.6.18)

【公表番号】特表2019-528038(P2019-528038A)

【公表日】令和1年10月10日(2019.10.10)

【年通号数】公開・登録公報2019-041

【出願番号】特願2018-563104(P2018-563104)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/13	(2006.01)
C 0 7 K	7/08	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)
C 0 7 K	16/46	(2006.01)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 0 7 K	7/64	(2006.01)
A 6 1 K	47/68	(2017.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/12	(2006.01)
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)
A 6 1 K	35/76	(2015.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/704	(2006.01)
A 6 1 K	31/4178	(2006.01)
A 6 1 K	31/537	(2006.01)
A 6 1 K	31/475	(2006.01)
A 6 1 K	38/02	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
C 0 7 H	15/252	(2006.01)
C 0 7 D	233/90	(2006.01)
C 0 7 D	498/18	(2006.01)
C 0 7 D	519/04	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/13	Z N A
C 0 7 K	7/08	
C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	

C 0 7 K	7/64	
A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/12	
A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/704	
A 6 1 K	31/4178	
A 6 1 K	31/537	
A 6 1 K	31/475	
A 6 1 K	38/02	
G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/53	D
C 0 7 H	15/252	
C 0 7 D	233/90	C
C 0 7 D	498/18	3 1 1
C 0 7 D	519/04	

**【手続補正書】****【提出日】**令和2年4月28日(2020.4.28)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0 2 2 4**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0 2 2 4】**

s c F v クローン R 4 C - C 3

s c F v R 4 C - C 3 の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図4 Aに示す。

R 4 C - C 3 重鎖ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図5 Aに示す。s c F v R 4 C - C 3 のV LおよびV H配列を分析し、軽鎖および重鎖のC D R領域を図4 Aおよび5 Aに示すように描写した。

**【手続補正2】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0 2 2 6**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0 2 2 6】**

s c F v 重鎖( )配列と既知のマウス生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列との比較は、この鎖が、マウス生殖系列 I G H V 1 S 1 2 6 由来のV Hセグメント、マウス生殖系列 I G H J 2 由来のJ Hセグメントおよびマウス生殖系列 I G H D 2 - 1 2 由来のD Hセグメントを利用する実証した。s c F v R 4 C - C 3 V Hと対応するマウス生殖系列との間の配列アライメントを図5 Bに示す。これらのアミノ酸アライメントにより、s c F v R 4 C - C 3 の軽鎖および重鎖の配列が、該生殖系列配列に対して 9 6 . 4 % および 8 2 . 8 % 相同であることが明らかとなった。軽鎖配列における変異は、主に、C D R 3 領域に位置するが(図4 B)、一方、重鎖配列における変異は、F R 1、F R 2、F R 3 および全てのC D Rに分布している(図5 B)。重鎖配列における高い突然変異率

は、s c F v R 4 C - C 3が、親和性成熟プロセスを受け、HLA-G由来ペプチドに対する強い親和性を獲得したことを証明する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0227

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0227】

実施例3：抗HLA-Gモノクローナル抗体15E7の特徴付け

タンパク質分析

15E7モノクローナル抗体をSDS-PAGEゲル電気泳動により分析した(図6A)。重鎖の分子量は、約50kDaであり、軽鎖の分子量は約25kDaである。各2個のコピーを有するため、15E7の分子量は150kDaと推定され、モノクローナル抗体15E7がマウスIgG2aクラスに属することが確認される。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0228

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0228】

アイソタイプ特定および親和性決定

15E7のアイソタイプをELISAにより評価した。15E7アイソタイプはIgG2aであると判定された。

15E7の親和性を、材料および方法セクションに記載のBLITZ技術により評価した。代表的なデータを図6Bに示す。5~600nMの範囲のBSAに結合したPC-1を種々の濃度で、バイオセンサーチップに結合した15E7と共にインキュベートした。各濃度について、結合速度( $k_a$ )および解離速度( $k_d$ )を測定し、親和性定数 $K_D$ ( $k_a/k_d$ )を計算するために用いた。親和性定数は1.57nMと評価された。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0232

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0232】

マイルドな酸処置により、細胞表面に結合したHLAクラスI不含有重鎖を残して、細胞表面2M分子を放出する(Polakova et al., 1993; Storkus et al., 1993)。未処置およびpH3.0処置されたK562-G1細胞上のHLA-G抗原の発現を、天然HLA-G/2M複合体に対するMEM-G/9mAbを用いてフローサイトメトリーにより分析した。さらに、ヒト2mに対するmAbを実験の対象として用いて、その放出を確認した。MEM-G/9mAbならびに抗2MmAbは、未処置のK562-G1細胞に結合するが、酸処置は、それらの結合を減少させた。対照的に、15E7mAbによる検出(marking)では結合が増え、このことは、それが未2M結合HLA-G重鎖を認識することを証明している(図9A)。K562-PV細胞を陰性対照として用いた(図9B)。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0233

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0233】

同じ実験を、内生 H L A - G 1 / 2 M 複合体を発現する J E G - 3 細胞について行った。1 5 E 7 m A b は、未処置の J E G - 3 細胞に結合しなかったが、酸処置後に染色が増加し、一方で、M E M - G / 9 および抗 2 M m A b の染色は、バックグラウンド値近くまで低下した(図 9 C)。

これらの結果は、1 5 E 7 M a b が免疫原性 c P C - 1 ペプチドおよび 2 M 不存在下で細胞表面 H L A - G 上に発現されるエピトープを認識することを確認する。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 3 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 3 5】

実際に、その表面上にヒト古典的 M H C - I 分子を発現するが、H L A - G を発現しない、ヒトリンパ腫細胞株( L C L - D E S 、 L C L - B R O および R P M I 8 8 6 6 )を、一定濃度の 1 5 E 7 ( 2 0  $\mu$  g / m L ; 1 3 3 n M )で染色した。この濃度は、K 5 6 2 - G 1 細胞の 8 0 % が染色され、アイソタイプ対照との非特異的結合がこの投与量で検出されなかつたために、用いた。K 5 6 2 - G 1 および K 5 6 2 - P V 細胞をそれぞれ、陽性対照および陰性対照として用いた。図 1 0 は、1 5 E 7 が、H L A - G 1 発現細胞( K 5 6 2 - G 1 )に強く結合するのに対して、古典的 M H C - I 分子を発現する H L A - G 陰性細胞は染色されなかつたことを示す。これは、1 5 E 7 モノクローナル抗体が H L A - G タンパク質に特異的であり、古典的 M H C クラス I 分子に対して交差反応性を示さないことを実証する。