

【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 セグメントおよびのマウス生殖系列 I G H D 2 - 1 2 由来の D H セグメントを利用することを実証した。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、H L A - 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】0 2 2 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 2 7】

実施例 3：抗 H L A - G モノクローナル抗体 1 5 E 7 の特徴付け

タンパク質分析

1 5 E 7 モノクローナル抗体を S D S - P A G E ゲル電気泳動により分析した（図 6 A）。重鎖の分子量は、約 5 0 k D a であり、軽鎖の分子量は約 2 5 k D a である。各 2 個のコピーを有するため、1 5 E 7 の分子量は 1 5 0 k D a と推定され、モノクローナル抗体 1 5 E 7 がマウス I g G 2 a 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】0 2 2 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 2 8】

アイソタイプ特定および親和性決定

1 5 E 7 のアイソタイプを E L I S A により評価した。1 5 E 7 アイソタイプは I g G 2 a であると判定された。

1 5 E 7 の親和性を、材料および方法セクションに記載の B L I T Z 技術により評価した。代表的なデータを図 6 B に示す。5 ~ 6 0 0 n M の範囲の B S A に結合した P C - 1 を種々の濃度で、バイオセンサーチップに結合した 1 5 E 7 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 . 5 7 n M 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】0 2 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 3 2】

マイルドな酸処置により、細胞表面に結合した H L A クラス I 不含有重鎖を残して、細胞表面 2 M 分子を放出する (Polakova et al., 1993; Storkus et al., 1993)。未処置および p H 3 . 0 処置された K 5 6 2 - G 1 細胞上の H L A - G 抗原の発現を、天然 H L A - G / 2 M 複合体に対する M E M - G / 9 m A b 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 2 m に対する m A b を実験の対象として用いて、その放出を確認した。M E M - G / 9 m A b ならびに抗 2 M m A b は、未処置の K 5 6 2 - G 1 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、1 5 E 7 m A b による検出 (marking) では結合が増え、このことは、それが未 2 M 結合 H L A - G 重鎖を認識することを証明している (図 9 A)。K 5 6 2 - P V 細胞を陰性対照として用いた (図 9 B)。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 3 3】

同じ実験を、内生HLA-G1/2M複合体を発現するJEG-3細胞について行った。15E7 mAbは、未処置のJEG-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、MEM-G/9および抗2M mAbの染色は、バックグラウンド値近くまで低下した(図9C)。

これらの結果は、15E7 mAbが免疫原性cPC-1ペプチドおよび2M不存在下で細胞表面HLA-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】0235

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0235】

実際に、その表面上にヒト古典的MHC-I分子を発現するが、HLA-Gを発現しない、ヒトリンパ腫細胞株(LCL-DES、LCL-BROおよびRPMI8866)を、一定濃度の15E7(20 µg/mL; 133 nM)で染色した。この濃度は、K562-G1細胞の80%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ったために、用いた。K562-G1およびK562-PV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10は、15E7が、HLA-G1発現細胞(K562-G1)に強く結合するのに対して、古典的MHC-I分子を発現するHLA-G陰性細胞は染色されなかったことを示す。これは、15E7モノクローナル抗体がHLA-Gタンパク質に特異的であり、古典的MHC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。