

【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】0224

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0224】

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】0226

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0226】

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、パ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(20µg/mL; 133nM)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。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019528038A5</a>	公开(公告)日	2020-06-18
申请号	JP2018563104	申请日	2017-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	An'vekuti 英韦克泰斯公司		
申请(专利权)人(译)	An'vekuti		
[标]发明人	ピエールラングラードドゥモイヤン ティエリーユエ		
发明人	ピエール・ラングラード・ドゥモイヤン ティエリー・ユエ ジュリアン・コーマルタン マリア・ルストー マリア・ヴェーブ		
IPC分类号	C12N15/13 C07K7/08 C12P21/08 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K7/64 A61K47/68 A61K39/395 A61P35/00 A61P31/12 A61K31/7088 A61K35/76 A61K48 /00 A61K31/704 A61K31/4178 A61K31/537 A61K31/475 A61K38/02 G01N33/50 G01N33/15 G01N33 /53 C07H15/252 C07D233/90 C07D498/18 C07D519/04		
CPC分类号	C07K7/08 C07K16/2833 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2317/92 A61P31/12 A61P35/00 G01N33/56983 G01N33/574 G01N2333/70539 C07K7/50		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K7/08 C12P21/08 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K7/64 A61K47/68 A61K39/395.L A61P35/00 A61P31/12 A61K31/7088 A61K35/76 A61K48/00 A61K31/704 A61K31/4178 A61K31/537 A61K31/475 A61K38/02 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D C07H15/252 C07D233/90.C C07D498/18.311 C07D519/04		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064 /DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065 /AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C057/BB02 4C057/CC04 4C057/DD01 4C057/JJ50 4C072/AA03 4C072/AA06 4C072/BB03 4C072/BB06 4C072/CC02 4C072/CC12 4C072/DD09 4C072 /EE06 4C072/FF15 4C072/GG06 4C072/GG07 4C072/QQ00 4C072/QQ07 4C072/UU01 4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/CC35 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF32 4C076/FF34 4C084/AA02 4C084 /AA03 4C084/AA13 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/DA33 4C084/DA34 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C084/ZB33 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA25 4C085/AA27 4C085 /DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC38 4C086/CB20 4C086/CB21 4C086/CB22 4C086/EA10 4C086/EA16 4C086/FA06 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA05 4C086/NA13 4C086 /NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/CA20 4C087/MA05 4C087/NA13 4C087/NA14 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4H045/AA10 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA32 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA10 4H045/FA74		
代理人(译)	山田卓司 富田健二		
优先权	2016305650 2016-06-03 EP		
其他公开文献	JP2019528038A		
摘要(译)			

本发明涉及针对人白细胞抗原-G ( HLA-G ) 蛋白和源自HLA-G蛋白的 $\alpha 3$ 结构域的免疫原性肽的抗体或其抗原结合片段。本发明进一步涉及免疫原性肽，以及产生抗-HLA-G特异性抗体的方法。