

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-546842
(P2024-546842A)

(43)公表日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 5
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全112頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-535370(P2024-535370)			(71)出願人	399052796
(86)(22)出願日	令和4年12月14日(2022.12.14)				デйна ファーバー キャンサー インス
(85)翻訳文提出日	令和6年7月31日(2024.7.31)				ティチュート, インコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2022/081559				アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(87)国際公開番号	WO2023/114847				2 1 5, ボストン, ブルックライン ア
(87)国際公開日	令和5年6月22日(2023.6.22)				ベニュー 4 5 0
(31)優先権主張番号	63/289,595			(74)代理人	100102978
(32)優先日	令和3年12月14日(2021.12.14)				弁理士 清水 初志
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100205707
(31)優先権主張番号	63/368,119				弁理士 小寺 秀紀
(32)優先日	令和4年7月11日(2022.7.11)			(74)代理人	100160923
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 山口 裕孝
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			(74)代理人	100119507
		最終頁に続く			弁理士 刑部 俊
				(74)代理人	100142929
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 疾患を治療するための組成物及び方法

(57)【要約】

本発明の態様は、自己免疫疾患を治療及び予防するための組成物及び方法に向けられる。

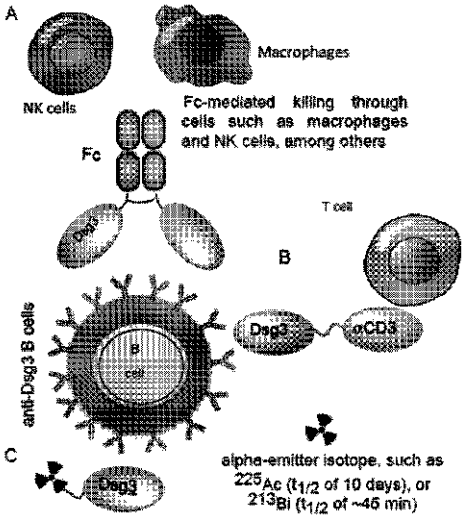


FIG. 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デスモグレイン 3 (D s g 3) の細胞外 (E C) ドメイン若しくは E C ドメインの一部、又はデスモグレイン 1 (D s g 1) の E C ドメイン若しくは E C ドメインの一部と、単離された免疫グロブリン F c 領域又はその断片と、を含む、融合タンパク質。

【請求項 2】

前記融合タンパク質が、配列番号 1 ～ 4 のうちのいずれか 1 つ又はその断片を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

配列番号 1 ～ 4 又は 2 9 ～ 3 2 に対して少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 4】

1 つ以上の B 細胞を標的とする、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記 B 細胞が、自己反応性抗 D s g 3 B 細胞又は自己反応性抗 D s g 1 B 細胞を含む、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記 F c 領域が、配列番号 1 ～ 4 又は 2 9 ～ 3 2 中の F c 領域に対して少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

前記 F c 領域が、I g G F c 領域を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 8】

前記 E C ドメインが、図 1 3 に提供される様々な配列識別子 (配列番号 8 ～ 2 8) のうちのいずれか 1 つ以上を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

前記 E C ドメインが、E C 1、E C 2、E C 4、E C 5、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 0】

治療用部分、イメージング部分、捕捉部分、又はそれらの組み合わせを更に含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 1 1】

前記捕捉部分が、親水性タンパク質、細菌トランスペプチダーゼ酵素、G S T タグ、H i s タグ、ポリエチレングリコール (P E G)、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 1 0 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 2】

前記イメージング部分が、フルオロフォア、放射性同位体、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 1 0 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 3】

前記治療用部分が、サイトカイン、毒素、放射線治療薬、T 細胞結合部分、ナチュラルキラー細胞結合部分、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 1 0 に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 1 4】

前記治療用部分が、

I L - 2、

I L - 1 5、又は

I L - 1 活性を有する分子

を含む、請求項 1 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

50

【請求項 16】

自己反応性抗 D s g 3 又は抗 D s g 1 B 細胞を枯渇させる方法であって、対象に、治療有効量の請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を投与することを含む、前記方法。

【請求項 17】

前記有効量が、前記対象において循環する抗 D s g 3 又は抗 D s g 1 抗体のレベルと正に相関する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

自己免疫疾患を治療する方法であって、対象に、治療有効量の請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を投与することを含み、前記対象が、前記自己免疫疾患を患っている、前記方法。

10

【請求項 19】

前記疾患が、自己免疫性水疱症、狼瘡、強皮症、グッドパスチャー病、グレーブス病、及び免疫介在性血管炎からなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記自己免疫性水疱症が、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、又は線状 I g A 水疱性皮膚症を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

治療有効量の融合タンパク質又は薬学的組成物が、前記対象における自己反応性 B 細胞を排除するか、又は無能力化する、請求項 18 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記融合タンパク質と反応性の自己抗体、又は前記薬学的組成物中の前記融合タンパク質の存在下で有効である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする、核酸。

【請求項 24】

請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸を含む、ベクター。

【請求項 25】

請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードするベクターを含む、細胞。

30

【請求項 26】

自己反応性抗原と、
エフェクター細胞に結合する、抗体の F c 部分、又は抗体とを含む、融合タンパク質。

【請求項 27】

前記自己反応性抗原が、デスモブラキン、エンボブラキン、ペリブラキン、プレクチン、水疱性類天疱瘡抗原 1、コルネオデスモシン、微小管アクチン架橋因子、エピブラキン及びカドヘリンからなる群からの分子又は分子の断片を含む、請求項 26 に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 28】

前記自己反応性抗原が、前記分子の細胞外 (E C) ドメイン、又はその B 細胞エピトープを含む、請求項 27 に記載の融合タンパク質。

【請求項 29】

前記 E C ドメイン、又はその B 細胞エピトープが、デスモグレイン-1 (D s g 1)、デスモグレイン-2 (D s g 2)、デスモグレイン-3 (D s g 3)、デスモグレイン-4 (D s g 4)、デスモコリン-1 (D s c 1) デスモコリン-2 (D s c 2)、及びデスモコリン-3 (D s c 3) からなるデスモソームカドヘリンの群から選択される、請求項 28 に記載の融合タンパク質。

【請求項 30】

50

前記 E C ドメイン、又はその B 細胞エピトープが、E C 1、E C 2、E C 3、E C 4、E C 5、及びそれらの組み合わせの全て又は一部分を含む、請求項 28 に記載の融合タンパク質。

【請求項 31】

前記自己反応性抗原が、自己反応性 B 細胞の B 細胞受容体 (B C R) に結合する、請求項 26 に記載の融合タンパク質。

【請求項 32】

前記自己反応性 B 細胞が、自己免疫疾患を有する動物由来である、請求項 31 に記載の融合タンパク質。

【請求項 33】

前記自己免疫疾患が、前記動物における自己抗体の産生によって特徴付けられる、請求項 32 に記載の融合タンパク質。

【請求項 34】

前記自己免疫疾患が、自己免疫性水疱症、狼瘡、強皮症、グッドパスチャー病、グレーブス病、又は免疫介在性血管炎を含む、請求項 32 に記載の融合タンパク質。

【請求項 35】

前記自己免疫性水疱症が、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状 I g A 水疱性皮膚症、落葉状天疱瘡、表皮内好中球性 I g A 皮膚症、及び腫瘍随伴性天疱瘡からなる群から選択される、請求項 34 に記載の融合タンパク質。

【請求項 36】

前記自己免疫疾患が、ヒト、イヌ、ネコ又はウマに存在する、請求項 32 に記載の融合タンパク質。

【請求項 37】

前記抗体の F c 部分が、F c 受容体 (F c R) を有する細胞に結合することができる、請求項 26 に記載の融合タンパク質。

【請求項 38】

前記 F c R が、F c - ガンマ受容体 (F c γ R)、F c - アルファ受容体 (F c α R)、又は F c - エプシロン受容体 (F c ϵ R) を含む、請求項 37 に記載の融合タンパク質。

【請求項 39】

前記 F c γ R が、F c γ R I、F c γ R I I、又は F c γ R I I I を含む、請求項 38 に記載の融合タンパク質。

【請求項 40】

前記 F c R が、B 細胞、濾胞性樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、血小板又は肥満細胞上に存在する、請求項 37 に記載の融合タンパク質。

【請求項 41】

前記 F c R が、ナチュラルキラー細胞又はマクロファージ上に存在する、請求項 37 に記載の融合タンパク質。

【請求項 42】

前記抗体の F c 部分が、配列番号 1 ~ 4 又は 29 ~ 32 の F c 部分に対して少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 26 に記載の融合タンパク質。

【請求項 43】

前記エフェクター細胞に結合する前記抗体が、T 細胞に結合する、請求項 26 に記載の融合タンパク質。

【請求項 44】

前記 T 細胞に結合する前記抗体が、抗 C D 3 抗体を含む、請求項 43 に記載の融合タンパク質。

【請求項 45】

前記抗 C D 3 抗体が、単鎖可変断片 (s c F v) を含む、請求項 44 に記載の融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 46】

前記エフェクター細胞が、T細胞を含む、請求項 26 に記載の融合タンパク質。

【請求項 47】

サイトカインを更に含む、請求項 26 に記載の融合タンパク質。

【請求項 48】

前記サイトカインが、

IL-2、

IL-15、又は

IL-1 活性を有する分子

を含む、請求項 47 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 49】

デスモグレイン又はデスモコリンタンパク質の細胞外部分由来の自己反応性 B 細胞エпитープと、

Fc-γ 受容体 (FcγR)、Fc-α 受容体 (FcαR)、又は Fc-ε 受容体 (FcεR) に結合することができる抗体の Fc 部分とを含む、融合タンパク質。

【請求項 50】

前記自己反応性 B 細胞エピトープが、前記融合タンパク質の N 末端を構成し、前記 Fc 部分が、前記融合タンパク質の C 末端を構成する、請求項 49 に記載の融合タンパク質。

【請求項 51】

前記自己反応性 B 細胞エピトープと前記 Fc 部分を接続するアミノ酸スペーサを更に含む、請求項 49 に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 52】

前記融合タンパク質が、デスモグレイン又はデスモコリンタンパク質の細胞外部分由来の少なくとも 2 つの B 細胞エピトープを含む、請求項 49 に記載の融合タンパク質。

【請求項 53】

前記融合タンパク質が、

第 1 の自己反応性抗原と、抗体重鎖由来の第 1 の C_H3 ドメインとを有する、第 1 のポリペプチドと、

第 2 の自己反応性抗原と、抗体重鎖由来の第 2 の C_H3 ドメインとを有する、第 2 のポリペプチドと

を含み、

ジスルフィド結合が、前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドを接続する、請求項 52 に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 54】

前記第 1 及び第 2 の C_H3 ドメインが、優先的にヘテロ二量体化するように構成されている、請求項 53 に記載の融合タンパク質。

【請求項 55】

前記第 1 及び第 2 の C_H3 ドメイン中のアミノ酸の相補的改変が、優先的な二量体化をもたらす、請求項 54 に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 56】

前記第 1 及び第 2 の C_H3 ドメインが、ノブ-イントゥ-ホール配置を使用して改変されている、請求項 54 に記載の融合タンパク質。

【請求項 57】

デスモグレイン又はデスモコリンタンパク質の細胞外部分由来の自己反応性 B 細胞エピトープと、

エフェクター細胞に結合する抗体とを含む、融合タンパク質。

【請求項 58】

前記エフェクター細胞が、T細胞を含む、請求項 57 に記載の融合タンパク質。

50

【請求項 59】

前記抗体が、抗CD3抗体を含む、請求項57に記載の融合タンパク質。

【請求項 60】

前記抗体が、抗CD8（細胞傷害性T細胞）又は抗CD4（ヘルパーT細胞）抗体を含む、請求項57に記載の融合タンパク質。

【請求項 61】

前記抗体が、マクロファージ（例えば、CD14、CD40、CD11b、CD64、CD68）又はナチュラルキラー（NK）細胞（CD56）に特異的な抗体を含む、請求項57に記載の融合タンパク質。

【請求項 62】

前記自己反応性B細胞エピトープが、前記融合タンパク質のN末端を構成し、前記抗体が、前記融合タンパク質のC末端を構成する、請求項57に記載の融合タンパク質。

【請求項 63】

前記自己反応性B細胞エピトープと前記抗体を接続するアミノ酸スペーサを更に含む、請求項57に記載の融合タンパク質。

【請求項 64】

前記アミノ酸スペーサが、約2～約40個のアミノ酸を含む、請求項63に記載の融合タンパク質。

【請求項 65】

前記アミノ酸スペーサが、可撓性アミノ酸スペーサである、請求項64に記載の融合タンパク質。

【請求項 66】

前記可撓性アミノ酸スペーサが、Gly及びSer残基を含む、請求項65に記載の融合タンパク質。

【請求項 67】

前記可撓性アミノ酸スペーサが、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_nを含む、請求項65に記載の融合タンパク質。

【請求項 68】

前記可撓性アミノ酸スペーサが、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃を含む、請求項65に記載の融合タンパク質。

【請求項 69】

前記自己反応性B細胞エピトープ及び前記抗体が、銅媒介性アジド-アルキン環化付加化学（図8A）を使用して作製されたC-C結合によって接続される、請求項57に記載の融合タンパク質。

【請求項 70】

前記自己反応性B細胞エピトープ及び前記抗体が、ソルターゼ（図8B）を使用して作製されたN-C結合によって接続される、請求項57に記載の融合タンパク質。

【請求項 71】

前記自己反応性B細胞エピトープ及び前記抗体が、アミノ酸配列Leu-Pro-Glu-Thr-Gly-Gly-Glyによって接続される、請求項70に記載の融合タンパク質。

【請求項 72】

デスモグレイン又はデスモコリンタンパク質の細胞外部分由来の少なくとも2つのB細胞エピトープを含む、請求項57に記載の融合タンパク質。

【請求項 73】

第1のポリペプチドを第2のポリペプチドに接続するための方法であって、

前記第1のポリペプチドのC末端を、アミノ酸配列Leu-Pro-Glu-Thr-Glyを含むように改変することと、

前記第2のポリペプチドのN末端を、アミノ酸配列Leu-Pro-Glu-Thr-Gly-Gly-Gly-Glyを含むように改変することと、

10

20

30

40

50

前記第 1 の改変されたポリペプチド及び前記第 2 の改変されたポリペプチドが、前記アミノ酸配列 $\text{Leu-Pro-Glu-Thr-Gly-Gly-Gly}$ によって接続されるように、前記改変された第 1 のポリペプチド及び前記改変された第 2 のポリペプチドを、トリグリシン (Gly-Gly-Gly) 及びソルターゼの存在下で反応させる、前記方法。

【請求項 7 4】

自己免疫性水疱症を治療するための Fc 媒介性治療薬であって、

第 1 の自己反応性抗原と、第 2 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメインと優先的にヘテロ二量体化することができる抗体重鎖由来の第 1 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメインとを含む、第 1 のポリペプチドと、

第 2 の自己反応性抗原と、第 1 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメインと優先的にヘテロ二量体化することができる抗体重鎖由来の第 2 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメインとを含む、第 2 のポリペプチドと

10

を含み、
ジスルフィド結合が、前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドを共有結合する、

前記 Fc 媒介性治療薬。

【請求項 7 5】

前記第 1 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメイン及び前記第 2 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメイン中の相補的アミノ酸が、ノブーインーホール戦略を使用して改変される、請求項 7 4 に記載の Fc 媒介性治療薬。

【請求項 7 6】

前記第 1 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメイン及び前記第 2 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメインが、前記第 1 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメインと前記第 1 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメインとの二量体化と比較して、かつ、前記第 2 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメインと前記第 2 の $\text{C}_\text{H}3$ ドメインとの二量体化と比較して、優先的に二量体化する、請求項 7 4 に記載の Fc 媒介性治療薬。

20

【請求項 7 7】

請求項 7 4～7 6 のいずれか一項に記載の Fc 媒介性治療薬と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 7 8】

自己反応性 B 細胞を枯渇させる方法であって、対象に、治療有効量の請求項 7 4～7 6 のいずれか一項に記載の Fc 媒介性治療薬を投与することを含む、前記方法。

【請求項 7 9】

30

アレルゲン、前記アレルゲンの一部分、又は前記アレルゲンを模倣する分子と、エフェクター細胞に結合する、抗体の Fc 部分、又は抗体とを含む、融合タンパク質。

【請求項 8 0】

前記アレルゲン、前記アレルゲンの一部分、又は前記アレルゲンを模倣する分子が、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドを含む、請求項 7 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 1】

前記アレルゲン、前記アレルゲンの一部分、又は前記アレルゲンを模倣する分子が、薬物、食品、昆虫、ラテックス、カビ、動物、又は植物に由来する、請求項 7 9 に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 8 2】

前記アレルゲン、前記アレルゲンの一部分、又は前記アレルゲンを模倣する分子が、IgE を産生するか、又は産生するであろう B 細胞の B 細胞受容体 (BCR) に結合することができる、請求項 7 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 3】

前記 B 細胞が、アレルギーを有する動物由来である、請求項 8 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 4】

前記アレルギーが、I 型過敏症である、請求項 8 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 5】

50

前記抗体のFc部分が、Fc受容体（FcR）を有する細胞に結合することができる、請求項79に記載の融合タンパク質。

【請求項86】

前記エフェクター細胞に結合する前記抗体が、T細胞に結合することができる、請求項79に記載の融合タンパク質。

【請求項87】

T細胞に結合することができる前記抗体が、抗CD3抗体を含む、請求項86に記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本出願は、2021年12月14日に出願された米国仮出願第63／289,595号、及び2022年7月11日に出願された米国仮出願第63／368,119号に対する優先権を主張し、その内容全体が、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本明細書に引用される全ての特許、特許出願、及び刊行物は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に記載され特許請求される本発明の日付時点での当業者に既知の最新技術をより完全に記載するために、これらの刊行物の開示は、参照により本出願に組み込まれる。

【0003】

20

本特許開示は、著作権保護の対象となる、材料を含む。著作権所有者は、米国特許商標局の特許ファイル又は記録に表れているような特許文書又は特許開示をいかなる者がファクシミリ複製することにも異議はないが、それ以外では、あらゆる全ての著作権を留保する。

【0004】

発明の分野

本発明の態様は、疾患を治療し、予防するための組成物及び方法に向けられる。複数の実施形態では、疾患は、自己免疫疾患である。

【0005】

配列表

30

本出願は、ASCII形式で電子的に提出されている配列表を含有し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。[]に作成されたこのASCIIコピーは、[]という名称であり、[]バイトのサイズである。

【背景技術】

【0006】

発明の背景

ヒトを含む動物には、様々な自己免疫疾患が存在する。自己免疫疾患を治療するための試薬及び方法が関心対象である。

【発明の概要】

【0007】

40

自己免疫性水疱症を含む、動物における自己免疫疾患を治療するための試薬及び方法が開示される。いくつかの実施形態では、試薬は、疾患動物由来の自己反応性抗原を含むドメインとエフェクター細胞に結合することができるドメインとを有する融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞結合ドメインは、エフェクター細胞上のFc受容体に結合することができる抗体のFc部分であり得る。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞結合ドメインは、エフェクター細胞に結合することができる抗体であり得る。

【0008】

本発明の態様は、デスモグレイン（遺伝子DSG1、2、3若しくは4によってコードされる）又はデスモコリン（遺伝子DSC1、2若しくは3によってコードされる）など

50

のデスモソームカドヘリン又はその断片を含む融合タンパク質に向けられる。いくつかの実施形態では、配列番号 5～28（実施例 4 及び図 13 に見出される）は、これらのアミノ酸配列の全て又は一部分を含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、デスモグレイン 3（Dsg3）、又はデスモグレイン 1（Dsg1）の細胞外（EC）ドメインなどの、デスモソームカドヘリンタンパク質の EC ドメイン、及びそれらの単離された免疫グロブリン Fc 領域又は断片を含む。複数の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 1～4、29～32、又はそれらの断片のうちのいずれか 1 つ以上を含む。複数の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 1～4 又は 29～32 に対して少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む。複数の実施形態では、融合タンパク質は、そのデスモソームカドヘリン部分を介して、1 つ以上の B 細胞を標的とする。更なる実施形態では、標的化された B 細胞は、自己反応性抗 Dsg3 B 細胞又は自己反応性抗 DSG1 B 細胞を含む。複数の実施形態では、融合タンパク質はまた、その Fc 領域を介してエフェクター細胞（例えば、NK 細胞、マクロファージ）を標的とする。複数の実施形態では、融合タンパク質の Fc 領域は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31 又は配列番号 32 の Fc 領域に対して少なくとも 80% 同一のアミノ酸配列を含む。複数の実施形態では、Fc 領域は、IgG Fc 領域を含む。複数の実施形態では、EC ドメインは、図 13 に提供される様々な配列 ID のうちのいずれか 1 つ以上を含む。更なる実施形態では、EC ドメインは、EC1、EC2、及び EC3 を含む。複数の実施形態では、融合タンパク質は、治療用部分、イメージング部分、捕捉部分、又はそれらの組み合わせを更に含む。更なる実施形態では、捕捉部分は、親水性タンパク質、細菌トランスペプチダーゼ酵素、GST タグ、His タグ、ポリエチレングリコール（polyethylene glycol、PEG）、又はそれらの組み合わせを含む。別の更なる実施形態では、イメージング部分は、フルオロフォア、放射性同位体、又はそれらの組み合わせを含む。別の更なる実施形態では、治療用部分は、サイトカイン、毒素、放射線治療薬、T 細胞結合部分、ナチュラルキラー細胞結合部分、又はそれらの組み合わせを含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、デスモソームカドヘリン又はその断片、及びエフェクター細胞に結合することができる抗体又は断片を含み得る。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、T 細胞であり得る。

【0011】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、デスモソームカドヘリン又はその断片、及び放射線同位体を含み得る。

【0012】

本発明の態様は、本明細書に記載の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組み合わせに向けられる。

【0013】

本発明の態様は、自己反応性抗 Dsg 又は抗 Dsc B 細胞を枯渇させる方法であって、対象に、治療有効量の本明細書に記載の融合タンパク質、又は本明細書に記載の薬学的組成物を投与することを含む、方法に向けられる。ある実施形態では、有効量は、対象と循環する抗 Dsg 又は Dsc 抗体のレベルと正に相関する。

【0014】

本発明の態様は、自己免疫疾患を治療する方法であって、本方法が、対象に、治療有効量の本明細書に記載の融合タンパク質、又は本明細書に記載の薬学的組成物を投与することを含み、対象が、自己免疫疾患を患っている、方法に向けられる。ある実施形態では、疾患は、自己免疫性水疱症、狼瘡、強皮症、グッドパスチャー病、グレーブス病、及び免疫介在性血管炎からなる群から選択される。複数の実施形態では、自己免疫性水疱症は、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状 IgA 水疱性皮膚症、筋肉特異的チロシンキナーゼ（muscle-specific tyrosine kinase、MuSK

）重症筋無力症（myasthenia gravis、MG）、P L A 2 R 膜性腎症、又は F V I I I 同種抗体を伴う血友病 A を含む。複数の実施形態では、対象に投与される融合タンパク質又は薬学的組成物の量は、自己免疫疾患に対する免疫応答を誘発する。

【0015】

本発明の態様は、本明細書に記載の融合タンパク質をコードする核酸に向けられる。

【0016】

本発明の態様は、本明細書に記載の融合タンパク質をコードする核酸を含むベクターに向けられる。

【0017】

本発明の態様は、本明細書に記載の融合タンパク質をコードする核酸を含むベクターを含む細胞に向けられる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

本発明に対するよりよい理解を可能にするために、特定の図示、チャート、又はフローチャートが提供されている。しかしながら、図面は、本発明の選択された実施形態のみを示しており、したがって、範囲を限定するとみなされるべきではないことに留意されたい。本発明の追加の同等に効果的な実施形態及び用途が存在する。

【図1】皮膚及び粘膜の痛みを伴う重度の水疱形成を生じ得る、患者における尋常性天疱瘡の画像を示す。

【図2】ケラチノサイト間のデスモソーム構造の表示を示す（パネルA）。パネルBは、D s g 3 タンパク質の構造の概略図を示す。抗 D s g 3 抗体は、ケラチノサイトの剥離（棘細胞離脱）を引き起こす。タンパク質の細胞外部分の5つのドメインは、異なるレベルの免疫原性を示す。各ドメインの隣に示されるパーセンテージは、そのドメインに特異的な抗体を有する P V 患者のパーセンテージである。患者は、複数のドメインに対する抗体を有し得る。

【図3】（パネルA）F c 媒介性融合タンパク質（例えば、D s g は、B細胞受容体によって結合される、N K 細胞／マクロファージは、F c 受容体によって結合される）、（パネルB）抗体媒介性融合タンパク質（例えば、D s g は、B細胞受容体によって結合される；T細胞は、抗体によって結合される；このアプローチは、「B細胞受容体（B-cell receptor、B C R）－エフェクター細胞エンゲージャ」アプローチと呼ばれてもよい）、又はエフェクター細胞がT細胞である場合、「B C R－T細胞エンゲージャアプローチ」と呼ばれてもよい）、及び（パネルC）放射線療法アプローチの概略図を示す。各々のアプローチは、病原性B細胞の標的化された死滅のために設計される。

【図4】模式的なソルターゼ反応を示す。L P E T G ソルターゼタグを備えたタンパク質は、トリグリシン含有ソルターゼ基質で標識することができる。「R」は、目的の任意の生体分子であり得る。H i s タグ（H 6）を使用してタンパク質を精製する。

【図5】受動導入疾患モデルの画像を示す。成体 B 6 マウスに A K 2 3 ハイブリドーマ細胞を注射した。周囲の脱毛パネルA。口の周囲の脱毛パネルB。眼の周囲の脱毛パネルC。背部の周囲の脱毛パネルD。ケラチノサイト細胞接着の喪失のパネルH及びE。能動免疫モデル。免疫付与 D s g 3－／－脾細胞を R a g－2－／－マウスに導入した。パネルE。D s g 3＋／－脾細胞を投与されたマウス（上）とは対照的に、D s g 3－／－脾細胞を投与されたマウス（下）では、脾細胞導入後25～35日目に有意なサイズ差があった。パネルF。D s g 3免疫付与 D s g 3－／－脾細胞を投与されたマウスの鼻及び頬の周囲の結痂性びらん。パネルG。D s g 3免疫付与 D s g 3－／－脾細胞を投与されたマウスの上部食道における上皮内水疱は、D s g 3免疫付与 D s g 3＋／－脾細胞を投与されたマウスとは対照的である（パネルH）。Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. J Clin Invest. 2000 Mar;

10

20

30

40

50

105 (5) : 625-631. PMCID : PMC292455 から。

【図6】ソルターゼによってmDsg3-IgG2aをAlexa647で標識したことを示す(パネルA)。(パネルB)mDsg3(EC1-3)-IgG2a(予想MW約80kDa)のSDS-PAGE、ゲル内蛍光及びウェスタンブロットによる特性評価。(パネルC)mDsg3-IgG2a-Alexa647、及び陰性対照としてNaIm6を用いた抗Dsg3 F779及びAK23ハイブリドーマ細胞のフローサイトメトリー分析。(パネルD)ELISA分析により、患者由来P3F3及びマウス由来AK23抗Dsg3 Abに対するmDsg3-EC1-3-IgG2aの結合が確認された。(パネルE)mDsg3-IgG2a-Alexa647によるマウスRAW264.7マクロファージ細胞の染色。NaIm6細胞を、Cに示されるように、陰性対照として使用した：紫色のヒストグラム)。

10

【図7】mDsg3-mFcキメラタンパク質の評価のためのインビトロFc媒介細胞傷害性アッセイを示す。抗Dsg3 AK23(パネルA)及びF779(パネルB)細胞、並びに無関係のハイブリドーマ又はNaIm6対照細胞を、10nMのmDsg3-IgG2a構築物を含むマウスRAW264.7マクロファージ細胞と共培養した。死滅有効性を、示された時点後に標準的な生-死アッセイを介して測定した。結果を0nM実験に対して正規化した。*** $p < 0.001$ 。

【図8】Dsg3及び抗CD3 scFvを融合するためにクリック反応を使用する(パネルA)の概略図を示す。(パネルB)Dsg3抗CD3融合タンパク質を直接作製するためにソルターゼを使用する。(パネルC)直接ソルターゼ反応後の抗CD19及び抗CD3 scFv並びに融合タンパク質のSDS-PAGE(クマシー染色)特性評価(各scFvは約35kDaのサイズである)。矢印は、融合を示す(予想質量約70kDa)。(パネルD)直接ソルターゼアプローチを介して作製された抗CD19-抗CD3融合タンパク質による、CD19発現NaIm6及びヒトCD3発現Jurkat細胞のフローサイトメトリー染色。クリック化学融合は、同様の結果を提供した。結果は代表的なものである(各々 $n = 3 \sim 5$)。

20

【図9】ソルターゼを使用してmDsg3-EC1-3をAlexa647で標識したデータを示す(パネルA)。(パネルB)mDsg3(EC1-3)及びAlexa標識産物(予想MW:約40kDa)のSDS-PAGE、ゲル内蛍光及びウェスタンブロットによる特性評価。(パネルC)mDsg3-Alexa647を有する抗Dsg3発現F779、PVB-28及びAK23ハイブリドーマ細胞のフローサイトメトリー分析。NaIm6細胞を陰性対照として使用した。結果は代表的なものである(各々 $n = 3 \sim 5$)。

30

【図10】ソルターゼを使用してmDsg3-EC1-3をDOTAで部位特定的に標識したことを示す(パネルA)。これは、示されるように225-Ac放射性同位体を使用して放射性標識される。(パネルB)mDsg3(EC1-3)のSDS-PAGE(クマシー染色)特性評価(下側のバンド、レーン2)及びDOTA標識したmDsg3(EC1-3)(わずかに高いバンド、レーン3)。レーン#1は、マーカーである。(パネルC)予想及び観察された質量を伴う、mDsg3(EC1-3)(上側)及びDOTA標識されたmDsg3(EC1-3)(下側)のLC-MS質量分光光度分析。(パネルD)DOTA標識は、結合親和性に影響を与えない。二次抗FLAG抗体染色を用いた、mDsg3(EC1-3)(陽性対照)及びDOTA標識されたmDsg3(EC1-3)(下側)による抗Dsg3発現F779細胞のフローサイトメトリー染色。

40

【図11】(パネルA)Fc媒介性及び(パネルB)BCR-T細胞エンゲージアプローチの概略図を示す。各々のアプローチは、病原性B細胞の標的化された死滅のために設計される。

【図12】自己反応性病原性B細胞を標的とし、これを死滅させるためのFc媒介性アプローチの概略図を示す(パネルA)。(パネルB)Dsg3-Fc構築物のインビトロ特性評価。F779(患者由来の抗Dsg3抗体で操作されたNaIm6-白血病細胞)を様々な濃度のmDsg3-mFc(IgG2a)(上側)又はhDsg3-hFc(Ig

50

G 1) (下側)と共にインキュベートし、フローサイトメトリーによって分析してEC50値を計算した。(パネルC)インビボ実験タイムラインの概略図。(パネルD)カプラン・マイヤー生存曲線。治療マウス及び対照マウスのlogランク生存分析は、治療を受けたマウスの改善された生存を示している。対照対治療 (** $p < 0.005$)。(パネルE) $BSC < 2$ になったら、治療又は対照から血液を採取し、治療から逃れたヒトCD19⁺GFP⁺F779細胞の表面上の抗Dsg3発現の存在についてフロー分析を行った。治療群は、ほぼ完全な抗原喪失を示した。データは5匹のマウスの代表である。

【図13】デスモソームカドヘリン外部ドメインの多重配列アラインメントを示す(配列番号8~28)。ヒト、マウス及びウシのDsg1-4(青色)及びDsc1-3(橙色)アミノ酸配列を各ECDメインについてアラインメントした。両方のファミリーにわたって保存されている残基を灰色で強調する。Dsg又はDsc内のみで保存されているものを、それぞれ青色及び橙色で強調する。ヒトDsg2構造及びヒトDsc1構造に対応する二次構造を、アラインメントの上(青色)及び下(橙色)に示す。O結合グリカンは、紫色の六角形として示されている。N結合グリカンは、小麦色の六角形として示されており、保存されていない場合、個々のグリコシル化残基は、更に四角で囲まれている。ジスルフィド結合は、Dgsについてのアラインメントの上及びDscについてのアラインメントの下の黄色の線によって示される。>10%の溶媒アクセス可能表面積が鎖交換ホモ二量体中に埋もれている界面残基は、青色(Dsg2)、橙色(Dsc1)及びサーモン色(Dsc2)のバーによって示される。EC5ドメインを欠くDsg1は、EC5アラインメントから除外される(Harrison et al., Structural basis of desmosomal cadherin adhesion, Proceedings of the National Academy of Sciences Jun 2016, 113(26) 7160-7165を参照されたい)。

【図14】粘膜に痛みを伴う重度のびらんを引き起こす粘膜優位型尋常性天疱瘡の非限定的で例示的な臨床症状を示す。

【図15】(パネルA)Fc媒介性及び(パネルB)BCR-T細胞エンゲージアプローチの概略図を示す。各々のアプローチは、病原性B細胞の標的化された死滅のために設計される。

【図16-1】ソルターゼによるDsg3-(EC1-3)-Fc構築物の部位特異的標識を示す(パネルA)。(パネルB)ゲルの右側に示される、mDsg3-mFcのSDS-PAGE、ゲル内蛍光及びウェスタンブロットによる特性評価。(パネルC)Alexa Fluor 647で標識されたマウス及びヒトDsg3-Fcを有する抗Dsg3+F779、PVB28、及びAK23ハイブリドーマ細胞のフローサイトメトリー分析。NALM6を対照として使用する。(パネルD&E~G&H)EC50値を、フローサイトメトリー分析を介して、F779(Dsg3部分について)を使用して、並びにRAW細胞及びヒトPBMC(Fc部分について)を使用して、mDsg3-mFc及びhDsg3-hFc構築物について決定した。hPBMCの約50%のみがFc-R+細胞であり、構築物の特異性を更に示していることに留意されたい。(パネルF)ELISA分析により、構築物の特異性が更に確認された。結果は、複数の実験(各実験について少なくともn=3)の代表である。

【図16-2】ソルターゼによるDsg3-(EC1-3)-Fc構築物の部位特異的標識を示す(パネルA)。(パネルB)ゲルの右側に示される、mDsg3-mFcのSDS-PAGE、ゲル内蛍光及びウェスタンブロットによる特性評価。(パネルC)Alexa Fluor 647で標識されたマウス及びヒトDsg3-Fcを有する抗Dsg3+F779、PVB28、及びAK23ハイブリドーマ細胞のフローサイトメトリー分析。NALM6を対照として使用する。(パネルD&E~G&H)EC50値を、フローサイトメトリー分析を介して、F779(Dsg3部分について)を使用して、並びにRAW細胞及びヒトPBMC(Fc部分について)を使用して、mDsg3-mFc及びhDsg3-hFc構築物について決定した。hPBMCの約50%のみがFc-R+細胞であり、構築物の特異性を更に示していることに留意されたい。(パネルF)ELISA

分析により、構築物の特異性が更に確認された。結果は、複数の実験（各実験について少なくとも $n = 3$ ）の代表である。

【図 17】 $Dsg3-Fc$ 操作されたタンパク質の有効性を評価するためのインビトロ細胞傷害性アッセイを示す。アッセイは、48 ウェルプレート中の 200,000 個のプレコーティングされたエフェクター細胞を用いて開始した。コーティングの約 4~6 時間後、20,000 個の標的細胞、 $Dsg3-Fc$ 治療（示されるように異なる濃度で）、及び 1 mM のカルシウムを添加した。生存 GFP+ 細胞を、フローサイトメトリー分析を介して 24 時間後及び 48 時間後にカウントした（全ての標的細胞は GFP+ である）。各条件について少なくとも $n = 3$ を使用した。対照細胞と比較して、全ての試験条件で有意な特異的死滅が観察された（*** $p < 0.001$ ）。

10

【図 18】抗 $Dsg3$ 自己抗体の存在が、治療のインビトロ有効性を中和しないことを示す。 Fc 媒介性細胞傷害性アッセイを、図 17 で説明したのと同じの設定であるが、示されるような AK23 抗体の存在下で行った。AK23 抗体を混合物に添加したとき、死滅有効性の差は検出されなかった。結果は、各実験について少なくとも $n = 3$ の代表である。

【図 19】 $hDsg3$ 抗 CD3e scFv 構築物が、株 F779 及び Jurkat 細胞（ヒト T 細胞）を特異的に染色するが、対照 NaIm-6 細胞は染色しないことを示す。

【図 20】自己抗体の存在が治療の有効性を阻害しないことを示す。マウスに 3 用量の IVIG を投与し（-3 日目、-2 日目、-1 日目、16 mg/kg）、ルシフェラーゼ+PVB28 細胞のより迅速な生着を可能にした（0 日目に 100 万個の細胞を注射した）。 $mDsg3-EC14-mFc$ を治療として使用する（週 3 回を 2 週間、次いで週 1 回、4 日目から開始）。対照マウスには、アイソタイプ IgG2a を与えた。Auto-Abs 群は、AK23、AK19 及び AK18 の混合物（合計で 150 μ g）を、治療開始の 1 日前から開始して 2 週間にわたって週 2 回投与された。（パネル A）BLI イメージングは、自己抗体の存在下であっても、治療レシピエントマウスにおいて、より遅いシグナル増強を示した。（パネル B）生存率は、対照群と比較して両方の治療レシピエント群において有意に高い（ P 値 = 0.0023）。また、自己抗体+治療（Auto-Abs+Tx）群の生存期間の中央値は 38 日であり、これは治療群よりも高かった（生存期間の中央値 = 35 日、 P 値 = 0.048）。（パネル C）エンドポイントでのフローサイトメトリー分析は、治療レシピエントマウスの脾臓における PVB28 細胞の完全な枯渇及び骨髄における PVB28 細胞上の抗 $Dsg3^+$ の有意な喪失を示した（各群について $n = 5$ のデータの代表）。

20

30

【図 21】受動導入モデルを示す（パネル A~D）。成体 RAG2-/- マウスに AK23 ハイブリドーマ細胞を注射した。口（パネル A）、目（パネル B）、及び背中（パネル C）の周囲の脱毛。（パネル D）ケラチノサイト細胞接着の喪失の H&E。（パネル E~H）能動免疫モデル。免疫付与 $Dsg3$ -/- 脾細胞を RAG2-/- マウスに導入した。（パネル E） $Dsg3$ +/- 脾細胞を投与されたマウス（上）とは対照的に、免疫付与 $Dsg3$ -/- 脾細胞を投与された RAG2-/- マウス（下）では、脾細胞導入後 25~35 日目に有意なサイズ差があった。（パネル F） $Dsg3$ 免疫付与 $Dsg3$ -/- 脾細胞を投与されたマウスの鼻及び頬の周囲の結痂性びらん。（パネル G） $Dsg3$ 免疫付与 $Dsg3$ -/- 脾細胞を投与されたマウスの上部食道における上皮内水疱は、 $Dsg3$ 免疫付与 $Dsg3$ +/- 脾細胞を投与されたマウスとは対照的である。（パネル H）鼻の周りの皮膚について同じ。

40

【図 22】自己抗体の存在下であっても、免疫応答性マウスにおいて治療がサイトカインストーム及び毒性を生じさせないことを示す。（パネル A）治療（ $mDsg3-EC14-mFc$ ）及び/又は自己抗体の混合物（AK23、AK19、AK18）をマウスに注射するスケジュール。（パネル B 及び C）自己抗体を伴うか、又は伴わない治療レシピエントマウスは、毒性が観察されることなく正常な体重増加を続けた（各群について $n = 6$ 、3 匹の雄及び 3 匹の雌）。（パネル D）ELISA 分析は、治療のみ、又は自己抗体のみ、又は自己抗体及び治療の両方（ELISA MAX (商標) Standard Se

50

t Mouse (BioLegend) を使用) のいずれかを受けた 3 つの群のいずれにおいても、サイトカインストームを示さなかった。何も投与されなかった 6 匹のマウスからの血清を、それぞれの性別において健康な対照のために使用した。2 mg / kg のリポ多糖 (LPS) を受けた 3 匹のマウスからの試料を使用して、それぞれの性別におけるサイトカインストームを模倣した。対応のない t 検定を使用して、群間の有意差について検定した。(ns、 $P > 0.05$; *、 $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$ 。)

【図 23】治療 (mDsg3-EC1-4-mFc) が AK23 抗体の病原性効果を阻害することを示す。全ての動物は、AK23 (12 mg / kg、皮下) を投与された。AK23 + 治療コホートは、1 時間後に mDsg3-mFc を受けた (15 mg / kg、i.p.)。パネル A 及び B は、AK23 群が、72 時間後に行われたテープストリッピングによって有意な脱毛を示し (パネル A)、5 日目に重度の PV 表現型を示した (すなわち、脱毛及び粘膜びらん (図示せず)) (パネル B) ことを示す。しかしながら、「AK23 + 治療」群は、対照健常マウスと同様であった (パネル A 及び B)。各コホートについて $n = 3$ のデータの代表。(パネル C) AK23 コホートは、体重減少を示した。しかしながら、体重増加は、AK23 及び治療を受けたマウスにおいて正常であった。(パネル D) 72 時間時点で採取された血清に対する IL6 の ELISA 分析は、AK23 コホートにおいて高レベルのサイトカインを示したが、「AK23 + 治療」群において、健常対照と同様であった。(パネル E) 実験の生存分析。全ての AK23 マウスは、重度の PV を発症し、7 日未満で安楽死させなければならなかった。全ての治療マウスは、正常に行動した。実験は、60 日目に終了した (各コホートについて $n = 3$)。

【発明を実施するための形態】

【0019】

発明の詳細な説明

自己反応性 B 細胞が罹患動物 (例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ) において自己抗体を産生する疾患又は状態を治療するための試薬及び方法が本明細書に開示される。試薬及び方法は、自己反応性 B 細胞を標的とし、枯渇させるように設計されている。いくつかの実施形態では、試薬及び方法は、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状 IgA 水疱性皮膚症、落葉状天疱瘡、表皮内好中球性 IgA 皮膚症、腫瘍随伴性天疱瘡などの自己免疫性水疱症を治療するためのものである。いくつかの実施形態では、試薬は、自己反応性 B 細胞上の B 細胞受容体に結合する自己反応性 B 細胞エピトープを含有し得る。いくつかの実施形態では、自己反応性 B 細胞エピトープは、デスモグレイン (Dsg) 又はデスモコリン (Dsc) 分子の細胞外ドメインに由来し得る。様々な実施形態では、自己反応性 B 細胞エピトープに加えて、試薬はまた、NK 細胞、マクロファージ及び T 細胞などの様々なエフェクター細胞に結合することができるエフェクター細胞結合領域を含有し得る。試薬の自己反応性エピトープが、自己反応性 B 細胞に結合する場合、試薬のエフェクター細胞結合領域に結合したエフェクター細胞は、B 細胞に近接して位置し、B 細胞を枯渇させることができる。

【0020】

いくつかの実施形態では、自己反応性 B 細胞上の B 細胞受容体に結合する自己反応性 B 細胞エピトープを有する試薬は、抗体の Fc 部分を含むエフェクター細胞結合領域を有し得る。抗体の Fc 部分は、マクロファージ、ナチュラルキラー (natural killer、NK) 細胞などのエフェクター細胞を含む、Fc 受容体 (Fc receptor、FcR) を有する細胞に結合することができる。これらのエフェクター細胞は、自己反応性 B 細胞を枯渇させることができる。これらの治療薬は、Fc 媒介性治療薬と呼ばれ得る。

【0021】

いくつかの実施形態では、自己反応性 B 細胞上の B 細胞受容体に結合する自己反応性 B 細胞エピトープを有する試薬は、エフェクター細胞に結合することができる抗体を含むエフェクター細胞結合領域を有し得る。いくつかの実施形態では、抗体は、T 細胞に特異的であり得る (抗 CD3 抗体)。抗体は、細胞傷害性 T 細胞に特異的であり得る。T 細胞は

、自己反応性B細胞を枯渇させることができる。これらの治療薬は、B細胞受容対（BCR）エフェクター細胞エンゲージャと呼ばれ得る。T細胞であるエフェクター細胞に結合する治療薬は、BCR-T細胞エンゲージャと呼ばれ得る。

【0022】

いくつかの実施形態では、上述の試薬分子は、自己反応性B細胞エピトープとエフェクター細胞結合領域との間に、又はそれらを接続するスペーサを有し得る。いくつかの実施形態では、スペーサは、アミノ酸スペーサであり得る。スペーサは、可撓性スペーサであり得る。可撓性スペーサは、グリシン及びセリンアミノ酸残基を含有し得る。いくつかの実施形態では、自己反応性B細胞エピトープとエフェクター細胞結合領域を接続するスペーサは、「クリック」化学を塩宇して作製することができる。いくつかの実施形態では、スペーサは、銅媒介性アジド-アルキン環化付加化学を使用して作製されるC-C結合を含み得る。いくつかの実施形態では、スペーサは、ソルターゼ酵素を使用して作製されたN-C結合を含み得る。

【0023】

1つ以上の実施形態の詳細な説明が本明細書に提供される。しかしながら、本発明が、様々な形態で具現化され得ることが、理解される。したがって、本明細書に開示される特定の詳細は、限定として解釈されるべきではなく、特許請求の範囲の根拠として、及び当業者に本発明を任意の適切な方法で用いるように教示するための代表的な根拠として解釈されるべきである。

【0024】

単数形「1つの（a）」、「1つの（an）」、及び「その（the）」は、文脈が明確に他のことを指示しない限り、複数の参照を含む。特許請求の範囲及び／又は明細書において「含む」という用語と共に使用されるとき「1つの（a）」又は「1つの（an）」という単語の使用は、「1つ」を意味し得るが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」、及び「1つ又は2つ以上」の意味とも一致する。

【0025】

「例えば」、「など」、「含む」などの句のいずれかが本明細書で使用される場合は常に、他に明確に記載されない限り、「限定することなく」という句が付随することが理解される。同様に、「一例」、「例示的」などは、非限定的であると理解される。

【0026】

「実質的に」という用語は、意図した目的に悪影響を与えない記述語からの逸脱を可能にする。記述用語は、「実質的に」という語が明確に列挙されていなくても、「実質的に」という用語によって変更されることが理解される。

【0027】

「含む（comprising）」及び「含む（including）」及び「有する（having）」及び「含む（involving）」（並びに同様に「含む（comprises）」、「含む（includes）」、「有する（has）」、及び「含む（involves）」）などの用語は、交換可能に使用され、同じ意味を有する。具体的には、用語の各々は、「含む（comprising）」の一般的な米国特許法の定義と一致して定義され、したがって、「少なくとも以下（at least the following）」を意味する非限定用語（open term）であると解釈され、追加の特徴、限定、態様などを除外しないとも解釈される。よって、例えば、「ステップa、b、及びcを含むプロセス」は、プロセスが少なくともステップa、b、及びcを含むことを意味する。「a」又は「an」という用語が使用されている場合は常に、そのような解釈が文脈上無意味でない限り、「1つ以上」と理解される。

【0028】

本明細書で使用される「約」という用語は、おおよそ、大まかに、おおよそ、又はその領域内を指すことができる。「約」という用語が数値範囲と共に使用される場合、それは、記載された数値の上及び下の境界を拡張することによってその範囲を変更する。一般に、「約」という用語は、本明細書では、20パーセント上又は下の（より高い又はより低い）分散によって記載された値を上回る、及び下回る数値を変更するために使用される。

【0029】

「対象」又は「患者」という用語は、本発明の態様を、例えば、実験的、診断的、予防的、及び／又は治療的目的で行うことができる任意の生物を指すことができる。本明細書に記載の方法が実施される対象は、霊長類、例えばヒトなどの哺乳動物を含む。獣医学的用途には、多種多様な対象、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、雌ウシ、ブタなどの家畜、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウなどの家禽、並びに飼育慣らされた動物、特にイヌ及びネコなどのペットが好適である。診断用途又は研究用途には、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター）、ウサギ、霊長類、及び近交系ブタなどのブタなどを含む、多種多様な哺乳動物が適切な対象であろう。「生体対象」という用語は、上記の対象又は生きている別の生物を指すことができる。「生体対象」という用語は、生体対象から切除された部分（例えば、肝臓又は他の臓器）だけではなく、対象又は生物全体を指すことができる。「正常な対象」という用語は、がん罹患していない対象など、疾患又は状態に罹患していない対象を指すことができる。

10

【0030】

本明細書で使用される場合、「治療剤」という語句は、対象に投与された場合に所望の薬理学的効果を誘発する任意の薬剤を指すことができる。いくつかの実施形態では、薬剤は、適切な集団にわたって統計的に有意な効果を示す場合、治療剤であると考えられる。いくつかの実施形態では、適切な集団は、モデル生物の集団であり得る。いくつかの実施形態では、適切な集団は、特定の年齢群、性別、遺伝的背景、既存の臨床状態などの様々な基準によって定義され得る。いくつかの実施形態では、治療剤は、疾患、障害、及び／又は状態の1つ以上の症状又は特徴を緩和、改善、軽減、阻害し、その発症を遅延させ、その重症度を低下させ、及び／又はその発生率を低下させるために使用することができる任意の物質である。

20

【0031】

「治療有効量」という用語は、本明細書で使用される場合、その投与が、関連集団で見つかった場合に、特定の治療効果の達成と相関するか、又は相関すると合理的に予測される治療剤の量を指すことができる。治療効果は、客観的（すなわち、いくつかの試験又はマーカーによって測定可能）又は主観的（すなわち、対象が効果の徴候を示すか、若しくは効果を感じる）であり得る。いくつかの実施形態では、物質の治療有効量は、疾患、障害、及び／又は状態に罹患しているか、又は罹患しやすい対象に投与された場合に、疾患、障害、及び／又は状態の1つ以上の症状を治療、診断、予防、及び／又は遅延及び／又は緩和するのに十分な量である。疾患の進行は、当業者に明らかな臨床観察、実験室及び画像化調査によってモニタリングすることができる。治療有効量は、複数の単位用量を含み得る投薬レジメンで投与される。治療剤について、治療有効量（及び／又は有効な投薬レジメン内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路、他の医薬剤との組み合わせに応じて変化し得る。また、患者に対する具体的な治療有効量（及び／又は単位用量）は、治療される障害及び障害の重症度、用いられる特定の医薬剤の活性、用いられる特定の組成物、患者の年齢、体重、全身健康状態、性別、及び食事、用いられる特定の融合タンパク質の投与時間、投与経路、及び／又は排出若しくは代謝の速度、治療期間、並びに医学分野で周知の同様の因子を含む様々な因子に依存し得る。更に、有効量は、治療レジメン内で単回用量又は複数回用量を介して投与され得る。いくつかの実施形態では、個々の用量又は組成物は、それらが治療レジメンの文脈において用量として有効な量を含む場合、「治療有効量」を含むとみなされる。当業者は、用量又は量が、患者の集団に投与されたときに統計的に有意な有効性を示すことが示されているか、又は示されていた場合、有効であるとみなされ得ることを理解するであろう。特定の結果は、本明細書に記載されるように、ある量が治療的に有効であるとみなされるために、特定の個々の患者において達成される必要はない。

30

40

【0032】

「治療する」という語は、症状又は状態の予防、治療、安定化、又は改善がもたらされるという意図での、対象、例えば、ヒトを含む動物の医学的管理を指すことができる。こ

50

の用語は、積極的治療、すなわち、特に障害の改善に向けられた治療、待期療法、すなわち、障害の治癒ではなく症状の軽減のために設計された治療、予防的治療、すなわち、障害の予防を対象とする治療、及び支持療法、すなわち、障害の改善を対象とする別の特定の療法を補うために用いられる治療を含む。「治療」という用語は、対症療法、すなわち、障害の全身症状に向けられた治療も含む。「治療する」又は「治療」という用語は、療法的治療及び予防的若しくは防御的手段の両方も指すことができ、その目的は、望ましくない生理学的変化又は障害を予防又は減速（軽減）することである。「治療」とは、治療を受けていない場合に予想される生存期間と比較して、生存期間を延長することも指すことができる。治療を必要とする者には、既に状態若しくは障害を患っている者、及び状態若しくは障害を患いやすい者、又は状態若しくは障害を予防する必要がある者が包含される。

10

【0033】

本発明の化合物により状態を「治療する」ことは、そのような化合物を、単独で、又は組み合わせで、任意の適切な手段によって患者に投与することを伴う。治療は、疾患、障害、及び／若しくは状態に関連する病状を発症するリスクを低下させる目的で、疾患、障害、及び／若しくは状態の兆候を示さない対象（例えば、特定可能な疾患、障害、及び／若しくは状態の前）、並びに／又は疾患、障害、及び／若しくは状態の初期兆候のみを示す対象に実施することができる。

【0034】

「投与」という用語は、本明細書に記載の組成物又は製剤を対象に導入することを指すことができる。組成物の投与経路の1つは静脈内投与である。しかしながら、経口、局所、皮下、腹膜、動脈内、吸入、腔、直腸、経鼻、脳脊髄液への導入、又は身体区画への点滴注入などの任意の投与経路を使用することができる。

20

【0035】

本明細書において、「アレルゲン」は、アレルギー反応を引き起こし得る物質を指すことができる。例えば、アレルゲンは、異常に強い又は活発な免疫応答（例えば、免疫系の過敏症）を生じ得る。いくつかの実施形態では、過敏症は、I型過敏症であり得る。いくつかの実施形態では、過敏症は、IgEによって媒介され得る。

【0036】

本明細書では、「抗体」は、抗原に結合する分子（複数可）を指すことができる。本明細書では、「抗体」は、全ての種類の抗体、断片及び／又は誘導体を指すことができる。抗体には、任意の適切なアイソタイプ又はアイソタイプサブクラスのポリクローナル及びモノクローナル抗体が含まれる。本明細書では、抗体は、Fab、F(ab')₂、Fab'、単鎖抗体、Fv、単鎖、単一特異性抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌーヒトキメラ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、CDR移植抗体、サメ抗体、ナノボディ（例えば、単一の単量体可変ドメインからなる抗体）、ラクダ科抗体（例えば、ラクダ科）微小体、イントラボディ（例えば、細胞内抗体）、及び／又は脱フコシル化抗体及び／又はこれらの誘導体を指すことができるが、これらに限定されない。抗体の模倣物も提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体は、血液脳関門を通過することができる本明細書に開示される化合物の一部である活性薬剤である。

30

40

【0037】

「抗体」又は「抗原結合ポリペプチド」は、抗原を特異的に認識して結合するポリペプチド又はポリペプチド複合体を指すことができる。抗体は、全抗体及び任意の抗原結合断片、又はその一本鎖であることができる。例えば、「抗体」は、抗原に結合する生物学的活性を有する免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む、任意のタンパク質又はペプチド含有分子を含むことができる。重鎖若しくは軽鎖又はそのリガンド結合部分の相補性決定領域（CDR）、重鎖又は軽鎖の可変領域、重鎖又は軽鎖の定常領域、フレームワーク（FR）領域、又はそれらの任意の部分、又は結合タンパク質の少なくとも一部である、非限定的な例。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子

50

及び免疫グロブリン (I g) 分子、すなわち、抗原と特異的に結合する (免疫反応する) 抗原結合部位を含有する分子の免疫学的に活性な部分を指すことができる。「特異的に結合する」又は「免疫反応する」とは、抗体が所望の抗原の1つ以上の抗原性決定部分と反応して、他のポリペプチドとは反応しないことを意味する。

【0038】

本明細書で使用される場合、「抗体断片」又は「抗原結合断片」という用語は、 $F(a b)_{2}$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ 、 $s c F v$ などの、抗体の一部を指す。抗体断片は、構造に関係なく、完全な抗体によって認識されるのと同じ抗原と結合する。「抗体断片」という用語には、アプタマー (シュピーゲルマーなど)、ミニボディ (mini body)、及びダイアボディ (diabody) を包含させることができる。「抗体断片」という用語にはまた、特定の抗原に結合して複合体を形成することにより抗体のように作用する、任意の合成又は遺伝子操作されたタンパク質を包含させることができる。本明細書に記載の抗体、抗原結合ポリペプチド、バリエーション、又は誘導体には、限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、ヒト、ヒト化若しくはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、 $F a b$ 、 $F a b'$ 、 $F(a b')_{2}$ 、 $F d$ 、 $F v s$ 、単鎖 $F v$ ($s c F v$)、単鎖抗体、 $d A b$ (ドメイン抗体)、ミニボディ、ジスルフィド結合 $F v$ ($s d F v$)、 $V L$ 又は $V H$ ドメインのいずれかを含む断片、 $F a b$ 発現ライブラリーによって生成された断片、及び抗イディオタイプ (抗 $I d$) 抗体などが包含される。

【0039】

「単鎖可変断片」又は「 $s c F v$ 」は、免疫グロブリンの重鎖 ($V H$) 及び軽鎖 ($V L$) の可変領域の融合タンパク質を指す。単鎖 $F v$ (« $s c F v$ ») ポリペプチド分子は、共有結合した $V H: V L$ ヘテロ二量体であり、これは、ペプチドをコードするリンカーによって連結された $V H$ 及び $V L$ コード遺伝子を含む遺伝子融合体から発現されることができる。(H u s t o n e t a l . (1988) P r o c N a t A c a d S c i U S A 85 (16): 5879-5883.) いくつかの態様では、領域は、10~約25アミノ酸の短いリンカーペプチドで連結される。リンカーは、柔軟性のためにグリシン、並びに溶解性のためにセリン又はスレオニンが豊富であってよく、 $V H$ のN末端を $V L$ のC末端と連結するか、又はその逆のいずれかであり得る。このタンパク質は、定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持している。抗体 V 領域からの自然に凝集されるが、化学的に分離された、軽及び重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造と実質的に類似する三次元構造に折り畳まれるであろう、 $s c F v$ 分子に変換するための化学構造を識別するための多くの方法が記載されている。例えば米国特許第5,091,513号、同第5,892,019号、同第5,132,405号、及び同第4,946,778号を参照されたい (それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0040】

ヒトから得られる抗体分子は、分子中に存在する重鎖の性質が互いに異なる、 $I g G$ 、 $I g M$ 、 $I g A$ 、 $I g E$ 、及び $I g D$ の5つのクラスのイムノグロブリンに分類される。当業者であれば、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロン (γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ) として分類され、それらの中にもいくつかのサブクラス (例えば、 $\gamma 1 \sim \gamma 4$) があることを理解するであろう。特定のクラスは、例えば $I g G 1$ 、 $I g G 2$ 、 $I g G 3$ 及び $I g G 4$ などのサブクラスも有する。免疫グロブリンサブクラス (アイソタイプ)、例えば $I g G 1$ 、 $I g G 2$ 、 $I g G 3$ 、 $I g G 4$ 、 $I g G 5$ などは、十分に特徴付けられており、機能的特殊化を付与することが知られている。 $I g G$ に関しては、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量が約23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチド、及び分子量が53,000~70,000の2つの同一の重鎖ポリペプチドを含む。4つの鎖は、典型的には「Y」字型にジスルフィド結合によって結合され、軽鎖は「Y」の口から始まり、可変領域を通して続く重鎖を囲む。本明細書に記載の免疫グロブリン又は抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ (例えば、 $I g G$ 、 $I g E$ 、 $I g M$ 、 $I g D$ 、 $I g A$ 、及び $I g Y$)、クラス (例えば、 $I g G 1$ 、 $I g G 2$ 、 $I g G 3$ 、 I

g G 4、I g A 1 及び I g A 2) 又はサブクラスであり得る。

【 0 0 4 1 】

軽鎖は、カッパ又はラムダ (κ 、 λ) のいずれかに分類される。各重鎖のクラスは、カッパ又はラムダ軽鎖のいずれかと結合することができる。一般に、軽鎖と重鎖は互いに共有結合し、免疫グロブリンがハイブリドーマ、B 細胞、又は遺伝子操作された宿主細胞のいずれかによって生成される場合、2 つの重鎖の「尾」(tail) 部は、共有ジスルフィド結合又は非共有結合によって互いに結合する。重鎖では、アミノ酸配列は、Y 字型に分岐した末端の N 末端から各鎖の下部の C 末端まで伸びている。

【 0 0 4 2 】

軽鎖と重鎖のいずれも、構造的及び機能的な相同性領域に分けられる。「定常」及び「可変」という用語が、機能的な意味で使用される。軽鎖部分及び重鎖部分の両方の可変ドメイン (V L 及び V H) が、抗原の認識及び特異性を決定する。逆に、軽鎖及び重鎖の定常ドメイン (C L、並びに C H 1、C H 2 若しくは C H 3) は、分泌、経胎盤移動性、F c 受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。「抗原結合部位」又は「結合部分」という用語は、抗原結合に關与する免疫グロブリン分子の部分を指すことができる。抗原結合部位は、重 (「H」) 鎖及び軽 (「L」) 鎖の N 末端可変 (「V」) 領域のアミノ酸残基によって形成される。「超可変領域」と呼ばれる、重鎖及び軽鎖の V 領域内の 3 つの高度に異なる区間は、「フレームワーク領域」又は「F R」として知られるより保存された隣接区間の間に挿入される。したがって、「F R」という用語は、免疫グロブリンの超可変領域の間、及びそれに隣接して天然に見られるアミノ酸配列を指すことができる。抗体分子において、軽鎖の 3 つの超可変領域及び重鎖の 3 つの超可変領域は、三次元空間で互いに対して配置されて、抗原結合表面を形成する。抗原結合表面は、結合した抗原の 3 次元表面に相補的であり、重鎖及び軽鎖の各々の 3 つの超可変領域は、「相補性決定領域」又は「complementarity-determining region、C D R」と呼ばれる。C D R を含有する、V H 及び V L 領域。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」又は「m A b」又は「M a b」又は「モノクローナル抗体組成物」という用語は、特有の軽鎖遺伝子産物及び特有の重鎖遺伝子産物からなる 1 つの抗体分子の分子種のみを含有する抗体分子の集団を指すことができる。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域 (C D R) は、集団の全ての分子で同一である。M A b は、それに対する特有の結合親和性を特徴とする抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位を含有する。

【 0 0 4 4 】

モノクローナル抗体は、K o h l e r a n d M i l s t e i n, N a t u r e, 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5) によって記載されるものなどの、ハイブリドーマ法を使用して調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター、又は他の適切な宿主動物は、典型的には、免疫剤で免疫化して、免疫剤に特異的に結合するであろう抗体を産生するか、又は産生することができるリンパ球を誘導する。代替として、リンパ球はインビトロで免疫化され得る。

【 0 0 4 5 】

本明細書において、「自己抗体」は、動物からの抗原 (例えば、「外来」抗原の代わりに自己抗原) と結合又は反応する、動物によって産生される抗体を指すことができる。一般に (例えば、疾患又は状態が存在しない場合)、動物は、自己抗原に対して寛容であり、自己抗体を産生しない。

【 0 0 4 6 】

本明細書において、「自己免疫」は、自己抗原に対する免疫応答 (例えば、抗体産生) を指すことができる。「自己免疫疾患」は、自己抗原に対する免疫応答から生じる疾患又は状態を指すことができる。

【 0 0 4 7 】

本明細書において、「自己反応性」とは、自己免疫応答の成分を指すことができる。例

10

20

30

40

50

えば、自己抗原に対して反応性の抗体を産生するB細胞は、自己反応性B細胞と呼ぶことができる。抗体は、自己反応性抗体と呼ぶことができる。自己抗体が反応性である自己抗原は、自己反応性抗原と呼ぶことができる。

【0048】

本明細書において、「B細胞」は、動物の体液性免疫応答において機能するリンパ球の一種を指すことができる。B細胞は、B細胞の表面上に提示される抗体を産生する。B細胞のより分化した形態である形質細胞は、抗体を分泌することができる。

【0049】

本明細書において、「B細胞受容体」又は「BCR」は、シグナル伝達部分と共に表面上に提示される、B細胞によって産生される抗体を指すことができる。

【0050】

本明細書において、「枯渇させる」とは、除去又は低下させることを指すことができる。本明細書において、枯渇させるとは、自己反応性B細胞を除去することを指すことができる。枯渇させるとは、自己反応性B細胞を死滅させることを指すことができる。

【0051】

本明細書において、「デスモグレイン」及び「デスモコリン」は、デスモソームの形成に関与するカドヘリンのファミリーを指すことができる。

【0052】

本明細書において、「エフェクター細胞」は、自己反応性B細胞を枯渇させることができる細胞を指すことができる。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、マクロファージ、NK細胞、T細胞などであり得る。

【0053】

本明細書において、「エピトープ」は、抗体（例えば、B細胞受容体）に結合する抗原の部分を指すことができる。このエピトープは、B細胞エピトープと呼ぶことができ、T細胞エピトープと区別することができる。

【0054】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリン、scFv、又はT細胞受容体に特異的に結合することができる任意のタンパク質決定因子を含み得る。可変領域は、抗体が抗原上のエピトープを選択的に認識し、特異的に結合することを可能にする。例えば、抗体のVLドメイン及びVHドメイン、又は相補性決定領域(CDR)のサブセットが組み合わされて、三次元抗原結合部位を定義する可変領域を形成する。この四次抗体構造は、Yの各アームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。エピトープ決定基は、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面グルーピングからなってもよく、通常は、特異的な三次元構造特徴、及び特異的な電荷特徴を有する。例えば、抗体は、ポリペプチドのN末端又はC末端ペプチドに対して産生され得る。より具体的には、抗原結合部位は、VH及びVL鎖の各々の上の3つのCDR（すなわち、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3）によって定義される。

【0055】

本明細書において、「細胞外ドメイン」は、細胞の細胞膜の外表面から延びる細胞膜タンパク質の部分を指すことができる。

【0056】

本明細書において、「Fc領域」（断片結晶化可能領域）は、Fc受容体に結合する抗体のテール領域を指すことができる。Fc領域は、抗体をパパイニンで消化することにより回収することができる。

【0057】

本明細書において、「Fc受容体」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合することができる受容体を指すことができる。Fc受容体は、ナチュラルキラー細胞及びマクロファージを含む特定の細胞の表面上に存在する。

【0058】

本明細書で使用される場合、「免疫学的結合」及び「免疫学的結合特性」という用語は

10

20

30

40

50

、免疫グロブリン分子と免疫グロブリンが特異的である抗原との間で生じるタイプの非共有相互作用を指すことができる。いくつかの実施形態では、これらの用語は、FcドメインのFc受容体への結合を説明し得る。免疫学的結合相互作用の強度、又は親和性は、相互作用の解離定数 (K_d) に関して表すことができ、 K_d が小さいほど、より大きな親和性を表す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当技術分野で周知の方法を使用して定量化することができる。1つのそのような方法は、抗原結合部位／抗原複合体形成及び解離の速度を測定することを伴い、それらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、及び両方向の速度に等しく影響する幾何学的パラメータに依存する。したがって、両方の「オン速度定数」 (K_{on}) 及び「オフ速度定数」 (K_{off}) は、濃度並びに会合及び解離の実際の速度の計算によって決定することができる。 (Nature 361: 186-187 (1993) を参照されたい)。 K_{off}/K_{on} の比は、親和性に関連しない全てのパラメータの相殺を可能にし、平衡結合定数 K_D に等しい。 (一般に、Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473 を参照のこと)。本発明の抗体は、動的アッセイ、例えば、放射性リガンド結合アッセイ又は当業者に公知の類似のアッセイ、例えば、BIACore又はOctet (BLI) によって測定して、平衡結合定数 (K_D) が $\leq 1 \mu M$ 、 $\leq 10 \mu M$ 、 $\leq 10 nM$ 、 $\leq 10 pM$ 、又は $\leq 100 pM \sim 約 1 pM$ である場合に、エピトープに特異的に結合することができる。例えば、いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1 E - 12 M \sim 約 1 E - 11 M$ の間の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1 E - 11 M \sim 約 1 E - 10 M$ の間の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1 E - 10 M \sim 約 1 E - 9 M$ の間の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は約 $1 E - 9 M \sim 約 1 E - 8 M$ の間の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1 E - 8 M \sim 約 1 E - 7 M$ の間の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1 E - 7 M \sim 約 1 E - 6 M$ の間の K_D である。例えば、いくつかの実施形態では、 K_D は約 $1 E - 12 M$ であり、他の実施形態では、 K_D は約 $1 E - 11 M$ である。いくつかの実施形態では、 K_D は約 $1 E - 10 M$ であり、他の実施形態では、 K_D は約 $1 E - 9 M$ である。いくつかの実施形態では、 K_D は約 $1 E - 8 M$ であり、他の実施形態では、 K_D は約 $1 E - 7 M$ である。いくつかの実施形態では、 K_D は約 $1 E - 6 M$ であり、他の実施形態では、 K_D は約 $1 E - 5 M$ である。いくつかの実施形態では、例えば、 K_D は約 $3 E - 11 M$ であり、他の実施形態では、 K_D は約 $3 E - 12 M$ である。いくつかの実施形態では、 K_D は約 $6 E - 11 M$ である。「特異的に結合する」又は「特異性を有する」は、抗体の抗原結合ドメインを介してエピトープに結合する抗体を指すことができ、結合は抗原結合ドメインとエピトープとの間のいくつかの相補性を伴う。例えば、抗体は、ランダムな無関係のエピトープに結合するよりも容易に、その抗原結合ドメインを介して、そのエピトープに結合する場合に、エピトープに「特異的に結合する」と言われる。

10

20

30

40

50

【0059】

本明細書において、「融合タンパク質」は、元々別々の遺伝子であった遺伝子を接続することによって作製されたタンパク質を指すことができる。

【0060】

本明細書において、「マクロファージ」は、貪食白血球の一種を指すことができる。

【0061】

本明細書において、「ナチュラルキラー細胞」又は「NK細胞」は、細胞傷害性リンパ球の一種を指すことができる。

【0062】

本明細書において、本明細書で使用される「ポリペプチド」は、単一の「ポリペプチド」及び複数の「ポリペプチド」を包含することができ、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって直鎖状に連結された単量体（アミノ酸）から構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の1つ以上の鎖を指し、特定の長さの生成物を指すものではない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、又は2つ以上のアミノ酸の鎖を

指すために使用される任意の他の用語は、本明細書では「ポリペプチド」を指すことができ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語の代わりに、又はこれらの用語のいずれかと交換可能に使用することができる。「ポリペプチド」はまた、限定されないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、又は天然に存在しないアミノ酸による改変などの、ポリペプチドの発現後改変産物を指すこともできる。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来することができるか、又は組換え技術によって産生されることができるが、必ずしも特定の核酸配列から翻訳される必要はない。それは、化学合成を含む任意の方法で生成させ得る。ポリペプチド（抗体など）又はポリヌクレオチドに関連する「組換え」とは、天然には存在しないポリペプチド又はポリヌクレオチドの形態を指し、その非限定的な例は、通常では一緒にはならないポリヌクレオチド又はポリペプチドを組み合わせることによって作製することができる。

10

【0063】

本明細書において、「ソルターゼ」は、一般にペプチド、ポリペプチド又はタンパク質中のカルボキシ末端認識シグナルを認識及び切断する細菌由来の酵素を指すことができる。いくつかの実施形態では、認識シグナルは、アミノ酸モチーフ $Leu-Pro-X-Thr-Gly$ を含むことができ、ここで「X」は任意のアミノ酸であり得る。

【0064】

本明細書において、「T細胞」は、動物の細胞性免疫応答において機能する種類のリンパ球を指すことができる。

20

【0065】

本明細書において、「標的とする」は、動詞として使用される場合、何か他のものを特異的に攻撃する細胞又は分子を指すことができる（例えば、融合タンパク質がB細胞に付着し、B細胞を枯渇させるエフェクター細胞を運ぶ、その融合タンパク質及びそのエフェクター細胞は、B細胞を標的とする）。「標的」は、名詞として使用される場合、例えば、枯渇したB細胞を指し得る。

【0066】

自己免疫疾患

本明細書に開示される試薬及び方法が、治療するように設計される疾患又は状態は、自己免疫状態又は疾患であり得る。治療される疾患又は状態は、自己反応性B細胞が、自己抗原又は自己反応性に特異的な自己反応性抗体を産生するものを伴い得る。疾患としては、例えば、自己免疫性水疱症、狼瘡、強皮症、グッドパスチャー病、グレーブス病、免疫介在性血管炎などが挙げられ得る。

30

【0067】

疾患は、(MuSK)重症筋無力症(MG)を含むことができ、これは、異なる病因及び異常な臨床的特徴を有する、MGの稀な、多くの場合、より重度のサブタイプである。

【0068】

疾患は、PLA2R膜性腎症を含むことができる。PLA2Rは、腎糸球ポドサイトに存在する自己抗原である。膜性腎症(Membranous nephropathy、MN)は、循環抗体が糸球体基底膜を透過し、上皮下腔において、ポドサイト膜上のエピトープと免疫複合体を形成する場合に起こり得る。

40

【0069】

その疾患は、FVIIII同種抗体を伴う血友病Aを含み得る。

【0070】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状IgA水疱性皮膚症、落葉状天疱瘡、表皮内好中球性IgA皮膚症、及び腫瘍随伴性天疱瘡などの自己免疫性水疱症を含み得る。

【0071】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、ヒト、イヌ、ネコ又はウマを含む動物に存在し得る。

50

【0072】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態を有する動物に存在する自己反応性抗体は、デスモブラキン、エンボブラキン、ペリブラキン、プレクチン、水疱性類天疱瘡抗原1、コルネオデスモシン、微小管アクチン架橋因子、エピブラキン及びカドヘリンなどの分子を含む自己反応性抗原に特異的であり得る。

【0073】

いくつかの実施形態では、自己反応性抗原は、デスモグレイン-1 (Dsg1)、デスモグレイン-2 (Dsg2)、デスモグレイン-3 (Dsg3)、デスモグレイン-4 (Dsg4)、デスコリン-1 (Dsc1)、デスコリン-2 (Dsc2)、及びデスコリン-3 (Dsc3) などのデスモソームカドヘリンであり得る。

10

【0074】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される試薬及び方法における目的の自己反応性抗原の領域は、図2B及び図13に示されるように、細胞外 (EC) ドメインである自己反応性抗原の一部分である。少なくともいくつかの実施形態では、上述の疾患及び状態における自己反応性抗体は、自己反応性抗原のECドメインに特異的であり得る。自己反応性抗体が結合する自己反応性抗原内の特異的エピトープは、自己反応性エピトープと呼ばれ得る。概して、ここでの関心は、自己反応性B細胞を標的とすることであるため、関連するエピトープは、B細胞エピトープであり得る。自己反応性抗原のB細胞自己反応性エピトープは、自己反応性B細胞のB細胞受容体 (BCR) に結合することができる。いくつかの実施形態では、それを標的とするように本明細書に開示される試薬及び方法が設計されるB細胞は、例えば、Dsg1、Dsg2、Dsg3、Dsg4、Dsc1、Dsc2、及びDsc3などの分子のECドメイン由来のこれらのエピトープに結合することができるBCRを有する、自己反応性B細胞である。

20

【0075】

一般に、上述の自己反応性抗原は、自己反応性抗体の産生を刺激する。いくつかの実施形態では、産生される自己反応性抗体は、「病原性」であり得る。いくつかの実施形態では、産生される自己反応性抗体は、「非病原性」であり得る。病原性抗体は、一般に、天疱瘡などの自己免疫疾患の症状及び／又は病状を生じる。機構に拘束されることを望まないが、病原性抗体は、それらが結合するタンパク質の機能を阻害することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される療法は、病原性自己反応性抗体を産生するB細胞を標的とすることができる。

30

【0076】

一般に、天疱瘡などのいくつかの自己免疫性水疱症について、自己反応性抗原の細胞外 (EC) ドメイン (例えば、図2B及び13を参照されたい) は、病原性又は非病原性であり得る。いくつかの実施形態では、デスモグレイン及び／又はデスコリンのECドメインは、病原性又は非病原性であり得る。いくつかの実施形態では、Dsg1、Dsg2、Dsg3及び／又はDsg4のEC1、EC2及び／又はEC4ドメインは、病原性であり得る。いくつかの実施形態では、Dsg3及びDsg1のEC1、EC2及び／又はEC4ドメインは、病原性であり得る。理論に束縛されることを望まないが、治療薬中に病原性ECドメインと共に非病原性又は低病原性ECドメインを含めることは、本明細書に開示される治療薬の有効性に影響を及ぼすとは考えられない。

40

【0077】

理論に束縛されることを望まないが、ECドメインの免疫原性のレベル (例えば、図2BにおけるECドメインに対する自己反応性抗体を有する天疱瘡患者のパーセントを参照されたい) は、病原性と高度に相関し得るか、又は相関し得ない。

【0078】

自己反応性B細胞を枯渇させる

本開示は、自己免疫疾患又は状態を有する、ヒトを含む動物における療法のための複数のアプローチを記載する。本明細書に開示される試薬及び方法は、動物における自己反応性B細胞を標的とし、枯渇させることができる。

50

【0079】

いくつかの実施形態では、自己反応性B細胞を枯渇させるために使用される試薬は、融合タンパク質であり得る。融合タンパク質は、別々のドメイン又は領域を有し得る。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、自己反応性エпитープと反応性のB細胞の表面上のB細胞受容体(BCR)に結合する1つ以上の自己反応性エпитープを含有し得る。いくつかの実施形態では、融合タンパク質はまた、エフェクター細胞に結合することができるドメインを含有し得る。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞に結合することができるドメインは、抗体のFcドメインであり得る。これらの治療薬は、Fc媒介性治療薬と呼ばれ得る。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞に結合することができるドメインは、エフェクター細胞に結合する抗体であり得る。これらの治療薬は、BCRエフェクター細胞エンゲージャと呼ばれ得る。抗体がT細胞に結合することができる実施形態では、治療薬は、BCR-T細胞エンゲージャと呼ばれ得る。

10

【0080】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、1つ以上の自己反応性B細胞エпитープを含むドメインを有し得る。自己反応性B細胞エпитープは、上述の自己反応性抗原のいずれかに由来していてもよく、いくつかの実施形態では、自己反応性抗原のECドメインに由来する。融合タンパク質という文脈の中で、自己反応性B細胞エпитープは、標的自己反応性B細胞のBCRに結合することができるように構成される。いくつかの実施形態では、自己反応性B細胞エпитープは、融合タンパク質の末端に位置し得る。いくつかの例では、B細胞エпитープは、融合タンパク質のN末端に位置し得る。

20

【0081】

いくつかの実施形態では、「ノブ-イントゥ-ホール(knob-into-hole)」戦略を使用して、複数の自己反応性B細胞エпитープを含む複数のエпитープを含むFc媒介性治療薬を生成することができる。ノブ-イントゥ-ホールは、例えば、2つのIgG重鎖由来の別個のCH3ドメイン(CH3ドメインはFc領域の一部を含有する)を、別個のCH3ドメインのヘテロ二量化が好まれるように「ノブ(knob)」又は相補的な「ホール(hole)」を含有するように変化させるアプローチである(Ridgway, John BB, Leonard G. Presta, and Paul Carter. 「『Knobs-into-holes』engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization.」Protein Engineering, Design and Selection 9.7(1996):617-621)。いくつかの実施形態では、2つの組換えポリペプチドが設計される。第1のポリペプチドは、第1の自己反応性抗原(例えば、1つ以上のECドメイン)及び「相補的」CH3ドメインのうちの1つを含有し得る。第2のポリペプチドは、第2の自己反応性抗原及び「相補的」CH3ドメインの他方を含有し得る。第1のポリペプチドを第2のポリペプチドと接触させると、2つのCH3ドメインが優先的にヘテロ二量体化し、ポリペプチド間にジスルフィド結合が形成される。ホモ二量体化は好まれない。ヘテロ二量体化した分子は、一般に、機能的Fc領域及び2つの別個の自己反応性抗原を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化した分子は、2つより多い抗原を含有し得る。

30

40

【0082】

いくつかの実施形態では、「ノブ-イントゥ-ホール」分子中の別個の抗原は、異なる自己反応性抗原に由来し得る。いくつかの実施形態では、別個の抗原は、同じ自己反応性抗原由来の異なるエпитープを含有し得る。いくつかの実施形態では、別個の抗原は、Dsg3及び/又はDsg1由来であり得る。いくつかの実施形態では、別個の抗原は、デスモグレインの異なる細胞外(EC)ドメインに由来し得る。いくつかの実施形態では、別個の抗原は、デスモグレイン分子のEC1、EC2、EC3、EC4及びEC5から選択することができる。例えば、別個の抗原は、EC1及びEC2由来であり得る。

【0083】

いくつかの実施形態では、自己反応性B細胞エпитープは、デスモソームカドヘリンの

50

EC1、EC2及び／又はEC4ドメインに由来し得る(Cho, Alice, et al. 「Single-cell analysis suggests that ongoing affinity maturation drives the emergence of pemphigus vulgaris autoimmune disease. 「Cell reports」28.4(2019):909-922を参照されたい)。いくつかの実施形態では、EC3が含まれ得る。いくつかの実施形態では、自己反応性B細胞エピトープは、Dsg3のEC1、EC2及び／又はEC4ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、自己反応性B細胞エピトープは、Dsg3のEC1及び／又はEC2ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、単一融合タンパク質は、1つ以上のデスモグレインからの複数のECドメイン(例えば、EC1、EC2及びEC3のうちの2つ以上、(例えば、EC1-EC4)を有し得る。いくつかの実施形態では、各々がDsg3のEC1、EC2、EC3又はEC4ドメインの1つを含有する別個の融合タンパク質を組み合わせて組成物とし、患者における療法に使用してもよい。

10

20

30

40

50

【0084】

理論に束縛されることを望まないが、治療薬は、患者において自己反応性抗体に結合するものに対応するECドメイン、並びに自己反応性抗体が患者において現在検出されていないものに対応するECドメインの両方を含有するように設計され得る。「エピトープ拡散」として当該分野で公知の現象では、一部の患者は、抗原上の1つのエピトープと反応性であるが、その抗原上の他のエピトープとは反応性でない自己反応性抗体を有する。しかし、時間経過と共に、患者は、最初に自己反応性抗体を刺激しなかったエピトープのうちの1つ以上に対する自己反応性抗体を発生し得る。本明細書に開示される治療薬に、自己反応性抗体が後に出現するエピトープを含めることにより、後に生じる抗体によって引き起こされる疾患の症状を予防又は軽減することができる。いくつかの実施形態では、最初にDsg3又はDsg1のEC5のみに対する自己反応性抗体を有する患者において、EC1、EC2、EC4、及びEC5を含有する治療薬を投与することは、患者にとって有益であり得る。

【0085】

いくつかの実施形態では、自己反応性B細胞エピトープは、プラキン(例えば、エンボプラキン、ペリプラキン、デスモプラキンI、デスモプラキンII、エピプラキン、プレクチン、BP230)、カドヘリン((Dsg3、Dsg1、Dsc1、Dsc2、Dsc3、 α 2-マクログロブリン様分子)、BP180(例えば、NC16A、LABD97、LAD-1ドメイン又はC末端エピトープ)、ラミニン332、 α 6 β 4インテグリン、コラーゲンVII、ラミニンガンマ1(p200)、VII型コラーゲン、表皮トランスグルタミナーゼ、組織トランスグルタミナーゼ、筋内膜又は脱アミド化グリアジンに由来し得る。

【0086】

一般に、自己反応性抗体は、任意のクラスの抗体(IgA、IgD、IgE、IgG又はIgM)であり得る。いくつかの場合では、自己反応性抗体は、IgA又はIgGであり得る。

【0087】

いくつかの実施形態では、自己反応性B細胞エピトープの代わりに、アレルゲン、アレルゲンの一部、又はアレルゲンを模倣することができる分子が、本明細書に開示されるFc媒介性治療薬又はBCR-T細胞エンゲージャの一部であり得る。多くの異なるアレルゲンが存在する。アレルゲンの非限定的な例は、薬物、食品、昆虫(例えば、昆虫刺症、チリダニ)、ラテックス、カビ、ペット／動物(例えば、鱗屑)及び花粉に由来し得る。アレルゲンは、ツタウルシ、イースタンポイズンオーク、ウェスタンポイズンオーク、毒ウルシなどの植物に見られるような、ウルシオールを含み得る。いくつかの実施形態では、アレルゲンは、Bet v 1などのカバノキ花粉アレルゲンであり得る。いくつかの実施形態では、アレルゲン／アレルゲンの一部は、タンパク質、ポリペプチド又はポリペ

ブチドであり得る。

【0088】

いくつかの例では、アレルギーは、I型過敏症であり得る。例えば、アレルギーは、IgEによって媒介され得る。B細胞は、IgEを産生することができる。次いで、IgEは、例えば、肥満細胞、好塩基球などに見出されるIgE特異的受容体に結合してもよく、これらの細胞は、サイトカイン、血管作用性アミン（例えば、ヒスタミン）、プロテアーゼ、プロスタグランジン、ロイコトリエンなどのようなアレルギーのメディエーターを放出し得る。いくつかの実施形態では、Fc媒介性治療薬又はBCR-T細胞エンゲージャの一部であるアレルゲンは、IgEを産生するB細胞に結合してこれを枯渇させることができる。いくつかの例では、アレルギーは、II型、III型又はIV型過敏症であり得る。

10

【0089】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、エフェクター細胞に結合するドメインを有し得る。自己反応性B細胞エピトープ及びエフェクター細胞結合ドメインを有する融合タンパク質では、融合タンパク質は、自己反応性B細胞エピトープのB細胞上のBCRに対する結合が、エフェクター細胞がB細胞に作用してB細胞を枯渇させることができるように、融合タンパク質のエフェクター細胞結合ドメインに結合したエフェクター細胞をB細胞に近接して共局在化させるように構成することができる。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞に結合するドメインは、抗体のFc部分であり得る。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞に結合するドメインは、エフェクター細胞に特異的な抗体であり得る。

20

【0090】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞結合ドメインは、融合タンパク質の末端に位置し得る。いくつかの例では、エフェクター細胞結合ドメインは、融合タンパク質のC末端に位置し得る。

【0091】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質のエフェクター細胞結合ドメインが結合することができるエフェクター細胞は、貪食細胞又は食細胞であり得る。食細胞は、いわゆる「プロフェッショナル」及び「非プロフェッショナル」食細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、プロフェッショナル食細胞は、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞及び肥満細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、非プロフェッショナル食細胞は、特定のT細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）及びナチュラルキラー（NK）細胞を含み得る。

30

【0092】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞に結合する融合タンパク質のドメインは、抗体のFc部分又はドメインであり得る。一般に、任意のFc部分が、本明細書に開示される試薬及び方法において使用され得る。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞（例えば、NK細胞、マクロファージなど）に結合することができる任意のFc部分を使用することができる。いくつかの実施形態では、標的病原性B細胞（例えば、自己反応性B細胞）の枯渇を媒介することができる任意のFc部分を使用することができる。Fc部分は、Fc受容体（FcR）を有する細胞に結合することができる。Fc部分は、細胞上のFcRに結合することができる。いくつかの実施形態では、FcRは、Fc-ガンマ受容体（Fc-gamma receptor、FcγR）、Fc-アルファ受容体（Fc-alpha receptor、FcαR）、又はFc-エプシロン受容体（Fc-epsilon receptor、FcεR）であり得る。いくつかの実施形態では、FcγRは、FcγRI、FcγRII又はFcγRIIIであり得る。融合タンパク質の文脈では、抗体のFc部分は、細胞上のFc受容体（FcR）に結合することができるように構成される。

40

【0093】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用される抗体のFc部分又はドメインは、改変され得る。いくつかの実施形態では、1つの改変又は複数の改変は、様々な細胞上のFc受容体に対するFc領域の結合に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、改変は、

50

Fc領域が結合する細胞の機能に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、Fc部分又はドメインは、Fcドメイン上の保存されたN-グリコシル化部位において不均一に改変され得る。いくつかの実施形態では、複雑な二分岐グリカンを、Fcドメイン上の保存されたN-グリコシル化部位に結合させることができる(Li, Tiezheng, et al. 「Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering.」 Proceedings of the National Academy of Sciences 114. 13 (2017) : 3485-3490を参照されたい)。一般に、改変されたFcドメインがエフェクター細胞(例えば、NK細胞、マクロファージなど)に結合することができる限り、任意の種類のFcドメイン改変を使用することができる。一般に、改変されたFcドメインが標的病原性B細胞(例えば、自己反応性B細胞)の枯渇を媒介することができる限り、任意の種類のFcドメイン改変を使用することができる。

10

【0094】

融合タンパク質内で、Fc部分はまた、Fc部分が結合するエフェクター細胞が、融合タンパク質の自己反応性B細胞エピトープが結合する自己反応性B細胞に近接して共局在化されるように構成され得る。FcRを有し、融合タンパク質のFc部分が結合することができるエフェクター細胞には、例えば、好中球、単球、マクロファージ、肥満細胞及び樹状細胞が含まれ得る。

【0095】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞に結合する融合タンパク質のドメインは、エフェクター細胞に結合する抗体であり得る。本明細書では、自己反応性抗原及びエフェクター細胞に結合する抗体を含有する融合タンパク質は、BCR-エフェクター細胞エンゲージと呼ばれ得る。いくつかの実施形態では、抗体は、T細胞に結合する抗体(例えば、抗CD3抗体)又は特定の種類のT細胞であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、細胞傷害性T細胞に結合する抗体(例えば、抗CD8抗体)又はヘルパーT細胞に結合する抗体(例えば、抗CD4抗体)であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、マクロファージ、ナチュラルキラー(NK)細胞又は他の食細胞に結合する抗体であり得る。いくつかの例では、NK細胞に結合する抗体又は抗体の組み合わせを使用することができる。いくつかの例では、抗CD56抗体が使用され得る。いくつかの実施形態では、抗体は、一本鎖可変断片(scFv)であり得る。

20

30

【0096】

融合タンパク質内で、エフェクター細胞に結合する抗体は、特異的なエフェクター細胞に結合することができるように構成される。いくつかの実施形態では、抗体は、1つ以上の所望のエフェクター細胞に結合することができるが、他の細胞には結合しないか、又はより低い効率で結合する。融合タンパク質内で、エフェクター細胞に結合する抗体はまた、抗体が結合するエフェクター細胞が、融合タンパク質の自己反応性B細胞エピトープが結合する自己反応性B細胞に近接して共局在化するように構成される。この共局在化は、エフェクター細胞が自己反応性B細胞と相互作用/作用する能力を促進する。

【0097】

本明細書に開示される融合タンパク質は、スペーサ又はリンカーを更に有し得る。一般に、スペーサは、自己反応性B細胞エピトープドメインとエフェクター細胞に結合するドメインとの間の融合タンパク質内に位置し得る。スペーサは、融合タンパク質内の別個のドメインがそれぞれ所望の機能を果たすことを促進し得る。例えば、自己反応性B細胞エピトープを含む融合タンパク質のドメインとエフェクター細胞に結合するドメインとの間に位置するスペーサは、自己反応性B細胞上のBCRに結合する自己反応性B細胞エピトープを提供することができ、同時に、エフェクター細胞結合ドメインは、自己反応性B細胞に近接したエフェクター細胞に結合し、共局在化することができる。スペーサは、自己反応性B細胞を枯渇させるための共局在化したエフェクター細胞を提供することができる。

40

【0098】

50

いくつかの実施形態では、スペーサは、アミノ酸スペーサであり得る。いくつかの実施形態では、スペーサは、約 2～50 アミノ酸長であり得る。いくつかの実施形態では、スペーサは、約 5～45、6～40、7～35、8～30、9～25、又は 10～20 アミノ酸長であり得る。いくつかの実施形態では、スペーサは、融合タンパク質の可撓性を増加させることができる可撓性スペーサであり得る。

【0099】

いくつかの実施形態では、可撓性ペプチドスペーサは、小さい極性（例えば、Ser、Thr）又は非極性（例えば、Gly）アミノ酸を含み得る。可撓性ペプチドスペーサは、Gly 及び Ser 残基の配列（例えば、「GS」リンカー）を有し得る。例示的な GS リンカーアミノ酸配列は、 $(\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ser})_n$ を含み得る。例示的なペプチドスペーサは、 $(\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ser})_3$ であり得る。他の種類の可撓性スペーサとしては、KESGSGSVSSEQLAQFRSLD、EGKSSGSGSGSESKST、 $(\text{Gly})_8$ 、GSAGSAAGSGEF 及び $(\text{GGGGGS})_4$ を挙げることができる（Chen, Xiaoying, Jennica L. Zaro, and Wei-Chiang Shen. 「Fusion protein linkers: property, design and functionality.」 *Advanced drug delivery reviews* 65. 10 (2013): 1357-1369）。他の例示的な種類のスペーサは、剛性スペーサ又は切断可能スペーサであり得る。

【0100】

融合タンパク質のいくつかの実施形態では、自己反応性 B 細胞エピトープ及びエフェクター細胞結合ドメインを含むドメインは、種々の化学を使用して互いに接続され得る。いくつかの実施形態では、いわゆる「クリック」化学を使用することができる。いくつかの実施形態では、ソルターゼ酵素を使用することができる。

【0101】

いくつかの実施形態では、ドメインは、C-C 融合化学を使用して接続され得る。例えば、ソルターゼを用いて、自己反応性 C 細胞エピトープドメインの C 末端及びエフェクター細胞結合ドメインにクリック「ハンドル」を導入することができる。2つの改変されたドメインを、例えばアジド-アルキンクリック化学を用いて一緒に「クリック」して、C-C 融合体を生成することができる（図 8A）。

【0102】

いくつかの実施形態では、ドメインは、N-C 融合化学を使用して接続され得る。例えば、ソルターゼ酵素の可逆性を使用して、トリグリシン分子 $(\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly})$ は、2つのドメインの N-C 融合体の形成を触媒するために使用され得る。ドメインの 1 つ（第 1 のドメイン）は、その C 末端に $\text{Leu}-\text{Pro}-\text{Glu}-\text{Thr}-\text{Gly}$ を有するように改変することができる。他方のドメイン（第 2 のドメイン）は、その N 末端に $\text{Leu}-\text{Pro}-\text{Glu}-\text{Thr}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}$ を有するように改変することができる。トリグリシン及びソルターゼの存在下で 2つの改変ドメインを反応させることによって、 $\text{Leu}-\text{Pro}-\text{Glu}-\text{Thr}$ セグメントが第 2 の改変ドメインから除去され、 Gly_3 に変換される。次いで、 Gly_3 -第 2 のドメインは、改変された第 1 のドメインと反応して、融合タンパク質を形成することができる（図 8B）。

【0103】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される融合タンパク質は、治療用部分、イメージング部分、捕捉部分、及びそれらの組み合わせなどの追加の部分／ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、クリック化学及び／又はソルターゼ酵素を使用して、これらの部分を融合タンパク質に付加することができる。いくつかの実施形態では、治療用部分は、細胞毒素、毒素、放射線療法剤、T 細胞結合部分、ナチュラルキラー（NK）細胞結合部分、又はそれらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、治療用部分は、IL-2 又は IL-1 活性を有する分子を含み得る。いくつかの実施形態では、イメージング部分は、フルオロフォア、放射性同位体、又はそれらの組み合わせを含み得る。い

くつかの実施形態では、捕捉部分は、親水性タンパク質、細菌トランスペプチダーゼ酵素、GSTタグ、Hisタグ、ポリエチレングリコール（PEG）、又はそれらの組み合わせを含み得る。

【0104】

本明細書中に開示される融合タンパク質及びそれらのタンパク質の個々のドメイン（例えば、自己反応性エпитープ、Fc領域、エフェクター細胞に結合する抗体）に関して、当業者は、ペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質配列に対する、又は核酸配列のヌクレオチドに対するアミノ酸の個々の置換、欠失又は付加であって、コードされる配列中の単一のアミノ酸又はわずかな割合のアミノ酸を改変、付加、欠失、又は置換する置換、欠失又は付加が、本明細書中で集合的に「保存的に改変されたバリエーション」と呼ばれることを容易に認識するであろう。いくつかの実施形態では、改変は、アミノ酸を、化学的に類似したアミノ酸に置換する。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該技術分野において周知である。本明細書に開示されるFcドメイン又は抗体のそのような保存的に改変されたバリエーションは、改変されていない配列と比較して、エフェクター細胞結合の増加を示すことができる。

【0105】

例えば、「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野では、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）として定義されている。したがって、免疫グロブリンポリペプチドの非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。別の実施形態では、アミノ酸鎖は、側鎖ファミリーメンバーの順序及び／又は組成が異なる構造的に類似する鎖で置換することができる。

【0106】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞間に結合する自己反応性エпитープ、Fc領域、又は抗体は、本明細書に記載の自己反応性エпитープ、Fc領域、又はエフェクター細胞結合抗体のアミノ酸配列又はヌクレオチド配列に対して、指定されたパーセンテージの同一性又は類似性を有し得る。例えば、「相同性」又は「同一性」又は「類似性」は、2つのペプチド間又は2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、各配列の位置を比較することによって決定することができ、比較の目的で整列させ得る。比較される配列の位置が同じ塩基又はアミノ酸で占められている場合、その分子はその位置において相同である。配列間の相同性の程度は、配列によって共有される一致する又は相同な位置の数の関数である。例えば、本明細書に記載の分子は、本明細書に記載の分子のいずれか1つの特定の領域又は全長と比較した場合に、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高いアミノ酸配列同一性を有し得る。例えば、本明細書に記載の分子は、本明細書に記載の抗体のいずれか1つの特定の領域又は全長と比較した場合に、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高い核酸同一性を有し得る。本発明の核酸及びタンパク質に対する配列同一性又は類似性は、例えば、Ausubel et al. 編（2007）Current Protocols in Molecular Biologyに記載されているような、当該技術分野で既知のソフトウェアプログラムを使用する、当該技術分野で既知の方法による配列比較及び／又はアラインメントによって決定することができる。（2007）Current Protocols in Molecular Biologyに記載されているものなどの当該技術分野で知られている

ソフトウェアプログラムを使用する配列比較及び／又はアラインメントにより決定することができる。例えば、配列比較アルゴリズム（すなわち、BLAST又はBLAST2.0）、手動アラインメント、又は目視検査を利用して、本発明の核酸及びタンパク質の配列同一性又は類似性パーセントを決定することができる。

【0107】

治療製剤

本発明の態様は、治療製剤に向けられる。本明細書で使用される場合、「治療製剤」という用語は、治療効果のために使用又は投与することができる任意の化合物又は組成物（例えば、細胞を含む）を指すことができる。本明細書で使用される場合、「治療効果」という用語は、症状の改善、例えば、関連する医学的狀態を治療、治癒、予防若しくは改善する、又はそのような狀態の治療、治癒、予防若しくは改善の速度を増加させるのに十分な効果を指すことができる。

10

【0108】

本明細書に記載の実施形態は、意図される投与経路のために調製された医薬組成物又は治療製剤の形態で対象に投与することができる。このような組成物及び製剤は、例えば、活性成分（複数可）及び薬学的に許容される担体を含むことができる。このような組成物及び製剤は、経口、皮下、非経口（例えば、静脈内、腹腔内）、筋肉内、直腸、硬膜外、気管内、鼻腔内、皮膚、膣、頬側、眼、又は肺投与に適合した形態、例えば、末梢経路による投与に適合した形態、又は経口投与に適した形態、又は非経口投与に適した形態であることができる。他の投与経路は、皮下、腹腔内及び静脈内であり、そのような組成物は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Science」, 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, Pa., U. S. A., 1985及びより最近の版並びに「Drugs and the Pharmaceutical Sciences」series, Marcel Dekkerのモノグラフに一般的に記載されているように、当業者に周知の方法で調製することができる。組成物及び調製物は、従来の形態、例えば、注射用の溶液及び懸濁液、カプセル剤及び錠剤、例えば、米国特許第5,350,741号に開示されているような腸溶性製剤の形態、及び経口投与用の形態で見られることができる。

20

【0109】

非経口、皮内、又は皮下適用に使用される溶液又は懸濁液は、以下の、無菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒、ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤、アスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝剤、及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの張度を調整するための薬剤の成分を含むことができる。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整することができる。非経口調製物は、アンプル、使い捨て注射器、又はガラス若しくはプラスチック製の複数用量バイアルに封入することができる。

30

【0110】

注射可能な使用に適した医薬組成物には、滅菌水溶液（水溶性の場合）又は分散液、及び滅菌注射液又は分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。静脈内投与について、適切な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EM（商標）（BASF, Parsippany, N. J.）、又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合では、組成物は、無菌であってもよく、容易な注射針通過性が存在する程度に流動性であってもよい。複数の実施形態では、製造及び貯蔵の条件下で安定であり得、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用に対して保存され得る。担体は、例えば、水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールのような薬学的に許容されるポリオール、及びそれらの適切な混合物を含有する、溶媒又は分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合

40

50

における必要な粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、及びチメロサルによって達成することができる。多くの場合、組成物において等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、塩化ナトリウムを含めることが有用であり得る。注射可能な組成物の持続的吸収は、組成物において、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによって達成することができる。

【0111】

滅菌注射液は、必要量の化合物を、必要に応じて、本明細書に列挙した成分の1つ又は組み合わせと共に適切な溶媒に組み込むこと、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。概して、分散液は、活性化合物を、基本的な分散媒及び本明細書に列挙されるものからの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、有用な調製方法の例は、真空乾燥及び凍結乾燥であり、これにより、活性成分及び任意の追加の所望の成分の粉末が、以前に滅菌濾過されたその溶液から得られる。

【0112】

経口組成物は、不活性な希釈剤又は可食性の担体を含む。それらはゼラチンカプセルに封入するか、又は錠剤に圧縮することができる。経口治療投与の目的のために、活性化合物は、賦形剤と共に組み込まれ、錠剤、トローチ、又はカプセルの形態で使用され得る。経口組成物はまた、洗口剤としての使用のための流体担体を使用して調製することができる。流体担体中の化合物は、経口的に適用され、口の中で回され、吐き出されるか、又は飲み込まれる。薬物の経口処方物は、例えば、薬物の半減期に応じて、1日1回、1日2回、1日3回又は1日4回投与することができる。

【0113】

薬学的に適合性の結合剤、及び／又はアジュバント材料を対象に投与される組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の、微結晶セルロース、トラガカントゴム又はゼラチンなどの結合剤；デンプン又はラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、Primogel（登録商標）（デンプングリコール酸ナトリウム）、又はコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム又はステアリン酸などの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロース又はサッカリンなどの甘味剤；又はペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ香味料などの香味剤の成分、又は同様の性質の化合物のいずれかを含有することができる。

【0114】

全身投与はまた、経粘膜的又は経皮的手段によるものであり得る。経粘膜又は経皮投与について、浸透させる障壁に適した浸透剤が製剤に使用される。そのような浸透剤は、当技術分野で一般に既知であり、例えば、経粘膜投与について、洗浄剤、胆汁塩、及びフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔スプレー又は坐剤の使用を通して達成することができる。経皮投与について、活性化合物は、当技術分野で一般に既知の軟膏、膏薬、ゲル、又はクリームに製剤化される。

【0115】

実施形態では、投与することは、所望の効果が生じるような、所望の部位での組成物の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法又は経路による、対象への医薬組成物の配置を含むことができる。

【0116】

例えば、医薬組成物は、ボーラス注射又は注入によって投与することができる。ボーラス注射は、シリンジがIVアクセスデバイスに接続され、薬物が対象に直接注射される投与経路を指すことができる。「注入」という用語は、血管内注射を指すことができる。

【0117】

本明細書に記載の実施形態は、対象に1回（例えば、単回注射、ボーラス、又は沈着として）投与することができる。あるいは、投与は、対象に1日1回又は2回、ある期間、

10

20

30

40

50

例えば約2週間～約28日間であることができる。投与は最大1年まで継続することができる。複数の実施形態では、投与は、対象の生涯にわたって継続することができる。実施形態は、対象に年に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12回、又はそれらの組み合わせの期間1日1回又は2回投与することもできる。

【0118】

複数の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、対象に慢性的に投与されることができる。「慢性投与」は、長期間にわたって治療効果（活性）を維持するためなどの、連続的な投与を指すことができる。

【0119】

特定の患者に対する特定の投与量及び治療計画は、使用される具体的な抗体、そのバリエーション又は誘導体、患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、及び食事、及び投与時間、排泄頻度、薬物の併用、及び治療を受けている特定の疾患の重症度など、様々な要因に依存する。医療従事者によるそのような要因の判断は、当業者の技量の範囲内である。その量はまた、治療される個々の患者、投与経路、製剤の種類、使用される化合物の特性、疾患の重症度、及び所望の効果にも依存すると考えられる。使用される量は、当該技術分野で周知の薬学的及び薬物動態学の原理によって決定することができる。

【0120】

本発明の試薬又は治療組成物の治療有効量は、治療目的を達成するために必要な量とすることができる。上に示されるように、これは、特定の場合には標的の機能を妨害する、試薬又は治療組成物とその標的との間の結合相互作用とすることができる。投与する必要のある量は更に、その特異的な標的についての試薬又は治療組成物の結合親和性に依存し、また、投与された試薬又は治療組成物が、それが投与される他の対象の自由体積から枯渇する速度にも依存する。対象（例えば、患者）に投与される本明細書に記載の結合ポリペプチドの投与量は、典型的には、 $0.1 \text{ mg/kg} \sim 100 \text{ mg/kg}$ 患者体重、 $0.1 \text{ mg/kg} \sim 20 \text{ mg/kg}$ 患者体重、又は $1 \text{ mg/kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$ 患者体重である。ヒト抗体は、外来ポリペプチドに対する免疫応答のため、他の種由来の抗体よりもヒト体内での半減期が長い。したがって、少ない投薬量及び少ない頻度でのヒト抗体の投与が可能ことも多い。更に、本開示の試薬又は治療組成物の投薬量及び投与頻度は、例えば、脂質化などの改変によって抗体の取り込み及び組織への（例えば脳への）浸透を増強することによって低減され得る。本発明の抗体又は抗体断片の治療上有効な投与のための一般的な範囲は、非限定的な例として、約 0.1 mg/kg 体重～約 50 mg/kg 体重であり得る。一般的な投与頻度は、例えば、1日2回～1週間に1回の範囲であり得る。

【0121】

断片（例えば、抗体断片）が使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の阻害性断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。そのようなペプチドは、化学的に合成することができ、かつ／又は組換えDNA技術によって產生することができる。（例えば、Marasco et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 (1993) を参照されたい）。製剤はまた、治療しようとする具体的な適応症に必要な2つ以上の活性化合物、例えば、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するもの、を含有することができる。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、その機能を増強する薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤、サイトカイン（例えば、IL-15）、化学療法剤又は成長阻害剤など）を含み得る。そのような分子は、意図された目的に有効な量で組み合わせて好適に存在する。

【0122】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技法によって、又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）における、又はマクロエマルジョンにおける、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに

封入することができる。徐放性製剤を調製することができる。

【0123】

使用される薬学的又は治療的担体又は希釈剤は、従来の固体又は液体担体であることができる。固体担体の非限定的な例は、ラクトース、白土、スクロース、シクロデキストリン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はセルロースの低級アルキルエーテルである。液体担体の非限定的な例は、シロップ、落花生油、オリーブ油、リン脂質、脂肪酸、脂肪酸アミン、ポリオキシエチレン及び水である。同様に、担体又は希釈剤は、単独で、又はワックスと混合された、モノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリルなどの当技術分野で公知の任意の徐放材料を含むことができる。

10

【0124】

経口投与用に固体担体を使用する場合、製剤を錠剤化し、粉末若しくはペレット形態の硬質ゼラチンカプセルに入れるか、又はトローチ若しくはロゼンジの形態であることができる。固体担体の量は広く変動するが、通常、約25mg～約1gである。

【0125】

液体担体を使用する場合、製剤は、シロップ、エマルジョン、軟ゼラチンカプセル又は水性若しくは非水性の液体懸濁液若しくは溶液などの滅菌注射液の形態であることができる。

【0126】

組成物及び／又は調製物はまた、局所又は全身注射又は注入に適した形態であることもでき、それ自体、滅菌水又は等張生理食塩水又はグルコース溶液を用いて製剤化することができる。組成物は、中枢投与可能な形態を除いて、末梢投与のみに適合した形態であることができる。組成物及び／又は製剤は、中枢投与に適した形態であることができる。

20

【0127】

組成物及び／又は製剤は、当該分野で周知である従来の滅菌技術によって滅菌されることができる。得られた水溶液は、使用のために包装されることができるか、又は無菌条件下で濾過されることができ、そして凍結乾燥されることができ、凍結乾燥製剤は、投与前に滅菌水溶液と合わせられる。組成物及び／又は製剤は、生理的条件下に近づけるために必要とされる薬学的及び／又は治療的に許容される補助物質、例えば、緩衝剤、等張性調整剤など、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなどを含有することができる。

30

【0128】

天疱瘡などの自己免疫性水疱症を含む自己免疫疾患を有する患者は、血液と共に循環する自己反応性抗体を有する。本明細書に記載される治療薬は、患者における自己反応性抗体がおそらく結合し得る自己反応性エピトープを含有する。潜在的な懸念は、自己反応性抗体が、患者に投与された後に治療薬に結合し、かつ／又はそれを不活性化する可能性があることであり得る。しかしながら、本明細書に提示されるデータ（例えば、実施例7、図17及び18を参照されたい）は、自己反応性抗体がこれらの治療薬の有効性を減少させないことを示す。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される治療薬の有効性は、治療薬が投与される患者における自己反応性抗体の存在によって減少しないか、又は最小限に減少する。

40

【0129】

融合タンパク質を発現する核酸、ベクター及び細胞

本明細書に記載される融合タンパク質の全て又は一部をコードする核酸も開示される。核酸を含む種々のベクター（例えば、プラスミド、ウイルスなど）もまた開示される。核酸又はベクターを含有し、融合タンパク質を発現することができる様々な細胞（例えば、原核細胞、真核細胞）も開示される。

【実施例】

【0130】

実施例は、本発明のより完全な理解を促進するために以下に提供される。以下の実施例

50

は、本発明を作製及び実施する例示的な様式を例示する。しかしながら、本発明の範囲は、これらの実施例に開示されている特定の実施形態に限定されず、代わりの方法を使用して同様の結果を得ることができるため、例示のみを目的としている。

【0131】

実施例 1

自己免疫疾患の標的化治療のための非免疫抑制性の免疫ベースの治療薬の開発

尋常性天疱瘡（PV）は、皮膚及び粘膜の痛みを伴う水疱形成を特徴とし得る、破壊的な自己免疫性水疱症である。PVは、Dsg1に対する抗体の有無にかかわらず、デスモグレイン3（Dsg3）に対する自己抗体の産生によって引き起こされ、上皮剥離（棘細胞離開）を引き起こす。PVの治療法は存在しない。治療戦略は、全身性ステロイド及び免疫抑制剤を含み得る。抗CD20抗体（例えば、リツキシマブ）は、中等度から重度の疾患に対するファーストラインの選択肢となっているが、従来の免疫抑制剤よりも低いとはいえ感染のリスクの増加及び治療後の再発の高いリスクを含む、オフターゲット免疫抑制効果を引き起こし得る。PVの再発は、最初の治療中に枯渇していない同じ自己反応性細胞の拡大に起因し得る。したがって、自己反応性B細胞の完全な枯渇は、治療法となり得る。現在臨床試験中の新生児Fc受容体及びブルトン型チロシンキナーゼ阻害剤は、オフターゲット免疫抑制効果を回避することができない。自己ポリクローナル調節性T細胞及びキメラ自己抗原受容体（CAAR）T細胞などの初期段階の細胞ベースの療法は、有効であることが証明されたとしても、全体的に免疫抑制性とはなり得ない。しかしながら、細胞ベースの療法は、個別化されなければならない、製造、貯蔵及び輸送のための特定の要件を有し、これは、資源が乏しい地域では実現不可能である。

10

20

【0132】

PVの治療法は存在しない。本明細書に記載の治療は、既存の適応免疫機構の特異性を利用するため、根治的なものとなる可能性があり、正確なものであり得る。提案された治療は、全体的に免疫抑制性であるとは予想されず、したがって、既存の治療の主要な副作用を回避する。加えて、PVの標的が普遍的なものであるため、個別化の必要がない。重要なことに、現在のプロジェクトは、PVの治療のためのプラットフォームを提供するだけでなく、従来の非特異的な免疫抑制治療で主に治療される既知の抗原を用いた全ての抗体駆動性自己免疫疾患において使用されるように改変することができる。

30

【0133】

既存の腫瘍学的治療に基づいて、本願発明者らは、自己反応性抗Dsg3 B細胞を正確に枯渇させるための2つのアプローチ、すなわち、（1）Fc媒介性、及び（2）BCR-T細胞結合を設計した（図11を参照されたい）。

【0134】

Fc媒介性アプローチ：このアプローチは、PVにおけるリツキシマブの使用に類似しており、抗Dsg3 B細胞を標的とするという主な利点を有する。

【0135】

BCR-T細胞エンゲージャプローチ：Dsg3抗CD3ε構築物は、標的抗Dsg3 B細胞とT細胞との間の分子クラスター化及び免疫学的シナプスの形成を確立することができ、その結果、T細胞の増殖及び活性化をもたらして、標的化された抗Dsg3 B細胞を特異的に死滅させ、他のB細胞を無傷なままに残す。腫瘍学的用途とは異なり、サイトカイン放出症候群は、自己反応性B細胞の負荷が悪性クローンよりも低いことを考慮すると、自己免疫疾患の治療においては予想されない。

40

【0136】

Dsg3-Fcを作製する1つの戦略は、安全なものであり得、リツキシマブの使用に取って代わることができる。他のアプローチは、利用可能な治療に応答しない患者にとって魅力的な代替選択肢を提供する。したがって、このプロジェクトは、PVの治療を変えただけではなく、他の自己免疫性水疱症（例えば、水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状IgA水疱性皮膚症）、狼瘡、強皮症、グッドパスチャー病、グレーブス病のサブタイプから免疫介在性血管炎に及ぶ既知の抗原標的に対するいくつかの自己

50

抗体／免疫複合体媒介性疾患の治療を開発するための道を開く可能性を有する。したがって、理論に束縛されることを望むものではないが、本明細書に開示される治療薬は、自己免疫疾患のための治療ツールボックスへの画期的な追加とみなすことができる。

【0137】

本願発明者らの治療薬は、抗Ds g 3力価を低下させる他の薬物と同時に使用することができる。更に、確かに、モノクローナル及びポリクローナル抗Ds g 3 Ig Gは、Ds g 3自己抗体産生B細胞に特異的なCAAR T細胞の死滅能力に対して有意な効果を有さないことが見出された。

【0138】

実施例 2

尋常性天疱瘡（PV）は、皮膚及び粘膜の痛みを伴う水疱形成を特徴とする自己免疫性水疱症である（図1）。PVは、Ds g 1に対する抗体の有無にかかわらず、デスモグレイン3（Ds g 3）に対する自己抗体の産生によって引き起こされ、上皮剥離（棘細胞離開）を引き起こす（図2のパネルA～B）。PVの治療法は存在しない。治療戦略は、全身性ステロイド及び免疫抑制剤を含み得る。B細胞に対する抗CD 20抗体（例えば、リツキシマブ）は、中等度から重度の疾患に対するファーストラインの選択肢となっているが、従来の免疫抑制剤よりも低いとはいえ感染のリスクの増加及び治療後の再発の高いリスクを含む、オフターゲット免疫抑制効果と関連がある。現在臨床試験中の新生児Fc受容体及びブルトン型チロシンキナーゼ阻害剤は、オフターゲット免疫抑制効果を回避することができない。自己ポリクローナル調節性T細胞14及びキメラ自己抗原受容体（CAAR）T細胞16などの初期段階の細胞ベースの療法は、有効であることが証明されたとしても、全体的に免疫抑制性とはなり得ない。しかしながら、細胞ベースの療法は、個別化することができ、製造、貯蔵及び輸送のための特定の要件を有し、これは、資源が乏しい地域では、実行可能な場合もあり、実現不可能な場合もある。PVの再発は、典型的には、最初の治療中に枯渇していない同じ自己反応性細胞の拡大に起因する。自己反応性B細胞の完全な枯渇は、潜在的な治療法を与える。自己反応性抗Ds g 3 B細胞を正確に枯渇させるために、3つのアプローチ、すなわち、（1）Fc媒介性、（2）BCR-T細胞結合、及び（3）放射線療法アプローチを設計した（図3のパネルA～C）。現在のプロジェクトは、PVだけでなく、既知の抗原による潜在的にいくつかの抗体駆動性自己免疫疾患の治療のためのプラットフォームを提供する。

【0139】

Fc媒介性：このアプローチは、B細胞が標的化されるという意味で、PVにおけるリツキシマブの使用に類似しており、抗Ds g 3 B細胞のみを標的化するという主な利点を有する。

【0140】

BCR-T細胞エンゲージャ：Ds g 3抗CD 3 e構築物は、標的抗Ds g 3 B細胞とT細胞との間の分子クラスター化及び免疫学的シナプスの形成を確立することができ、その結果、T細胞の増殖及び活性化をもたらして、標的化された抗Ds g 3 B細胞を特異的に死滅させ、他のB細胞を無傷なままに残すことができる。腫瘍学的用途とは異なり、サイトカイン放出症候群は、自己反応性B細胞の負荷が悪性クローンよりも低いことを考慮すると、自己免疫疾患の治療においては予想されない。

【0141】

放射線療法：臨床診療では、組織内のアルファ粒子の範囲が短い（＜0.1 mm）ことで、隣接組織に損傷を与えることなく標的細胞を選択的に死滅させることが可能である。死滅は、酸素化状態、細胞周期、細胞内在化及び以前の治療とは無関係である。したがって、放射線療法は、従来の療法、リツキシマブ、又は本願発明者らのDs g 3-Fc及びDs g 3抗CD 3アプローチに対して耐性である患者にとって魅力的な代替法を提供することができる。

【0142】

アプローチ

タンパク質の部位特異的改変。ソルターゼは、「L P E T G」モチーフを認識し、トレオニンとグリシンとの間の結合を切断してチオーアシル中間体を形成する細菌性トランスペプチダーゼ酵素であり、チオーアシル中間体は、トリグリシン含有プローブ（G G G - プローブ）で置換される。それにより、ソルターゼは、「タンパク質-L P E T G」を「タンパク質-L P E T - G G G - プローブ」産物に変換することができ、ここで、プローブは、目的の任意の生体分子であってもよく（図4）、ほぼ完全な収率で迅速に変換することができる。本願発明者ら及び他の研究者らは、ソルターゼを使用して、フルオロフォア、ポリマー、放射性同位体又は二次タンパク質を生体分子に導入した。本願発明者らは、ソルターゼを使用して、D s g 3 タンパク質及び抗体断片上にキレート剤及びフルオロフォアを導入し、他の方法では従来の遺伝的アプローチを使用して生成することが困難又は不可能であるN - C及びC - C融合タンパク質を作製することができる。

10

【0143】

D s g 3 外部ドメインの免疫原性。P V患者に関する試験は、患者の91%、71%、51%、19%及び12%が、それぞれ外部ドメインE C 1、E C 2、E C 3、E C 4及びE C 5に対する自己抗体を有することを示した（図2のパネルB、図13）。D s g 3 - E C 1 - 3はP V患者における生理学的抗D s g 3抗体の大部分を網羅し、その産生は完全サイズのE C 1 - 5構築物よりも複雑ではないため、本願発明者らは、D s g 3 - E C 1 - 3を使用した。本願発明者らはまた、E C 1 - 4及び1 - 5構築物を使用し得る。

【0144】

プラスミド及び細胞株。本願発明者らは、以下の3つの細胞株を使用した：（1）マウスにおいてP Vを誘導する抗マウスD s g 3抗体を産生するA K 2 3ハイブリドーマ細胞。A K 2 3抗体は、E C 1ドメインを認識し、ヒトD s g 3 - E C 1と交差反応する。（2及び3）N a l m - 6 F 7 7 9及びN a l m - 6 P V B - 2 8がん細胞株。N a l m - 6は、B細胞前駆体白血病細胞株であり、F 7 7 9及びP V B - 2 8は、それぞれD s g 3 - E C 1及びD s g 3 - E C 2ドメインを認識する患者由来の抗D s g 3抗体を発現するように操作された細胞である。更に、本願発明者らは、P V患者から特定された抗ヒトD s g 3抗体（P 3 F 3）のためのプラスミドを得た。P 3 F 3抗体は、ヒトD s g 3 - E C 1ドメインに特異的に結合するI g G 1抗体であり、ヒトケラチノサイトに添加されると強い棘細胞離開を誘導する。

20

【0145】

動物試験。治療薬の有効性は、下記の2つの検証されたP Vマウスモデルにおいて試験することができる。

30

【0146】

受動導入モデル。このモデルでは、本願発明者らは、確立された天疱瘡誘導性ハイブリドーマ細胞株（A K 2 3、既に所有）を移植することによって、受動モノクローナル天疱瘡マウス疾患モデルを作製した。以前に記載したように、本願発明者らは、天疱瘡表現型を引き起こす抗D s g 3抗体を分泌する約500万～1000万個のA K 2 3ハイブリドーマ細胞、又は対照としての無関係なハイブリドーマ細胞を、2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（プリスタン）でプライミングした8週齢のC 5 7 B L / 6 Jマウスに注射した（各群n = 10）。動物は、全ての実験において、u r n無作為化法に基づいて治療／対照群に割り当てられた。本願発明者らは、血清抗D s g 3力価（3日目及び10日目に標準的なE L I S Aによって）、及び皮膚疱疹（2日目、5日目及び10日目に盲検化された研究者によって評価される）を分析することによって疾患の確立について試験した。E L I S Aデータに基づいて、棘細胞離開を観察するために（H & E染色によって）組織採取の時点を決めた。ピーク疾患時間は、約7日目であり得；マウスは、脱毛、体重減少を示す場合があり、かつ、生理的抗D s g 3 I g Gレベル（300～400 R U / m l）で表皮ケラチノサイトに結合するA K 2 3細胞によって産生されるA K 2 3自己抗体を伴って、毛包及び口腔粘膜に水疱形成を有する場合がある（図5のパネルA～D）。

40

【0147】

50

能動導入モデル。A K 2 3 モデルは利点を有するが、治療により、急速に増殖するハイブリドーマ細胞に打ち勝つことができる。したがって、第2のモデルとして、本願発明者らは、ヒト疾患の臨床表現型を厳密に模倣し、臨床的に起こるものに類似する自己反応性 D s g 3 特異的 B 細胞の頻度が低く、最終的に高い血清ポリクローナル自己抗体レベルを有する、能動 P V 免疫モデルを使用した。このモデルでは、本願発明者らは、まず、D s g 3 - / - マウス (J A X - 0 0 2 9 1 1) をマウス D s g 3 の組換え細胞外ドメインで免疫付与し、続いて脾細胞を R A G 2 - / - マウスに導入することによって、能動ポリクローナル天疱瘡マウス疾患モデルを開発した。導入された細胞は、概して、D s g 3 反応性細胞を含み得る T 細胞及び B 細胞を含んでいた。文献で行われた観察と同様に、理論に束縛されることを望むものではないが、動物は、抑制された成長を有している可能性があり (図5のパネル E)、基底上の棘細胞離開及び水疱を伴う皮膚粘膜びらんを発症する場合がある (図5のパネル F ~ H)。臨床指標を評価するために、E L I S A を使用して、本願発明者らは、自己抗体レベルを P V 患者における生理学的レベル (3 0 0 ~ 4 0 0 R U / m l) と比較した。D s g 3 反応性抗体が、(理論に束縛されることを望むものではないが) 3 ~ 4 週間で起こり得るそのレベルに等しいか又はそれを超えた場合、治療を開始した。D s g 3 免疫付与 D s g 3 + / - 動物由来の細胞の養子導入を対照として使用した 3 8 (n = 1 0 匹のマウス / 群)。

10

【0148】

モニタリング

副作用：動物は、本明細書に記載されるように、適切な対照と共に尾静脈を介して静脈内に治療を受けた。10匹のマウスを、治療後少なくとも6ヶ月間、両方の疾患モデルから各治療のために維持した。抗 D s g 3 レベルを2~3週間ごとに E L I S A によって測定して、長期間続く寛解を試験した。マウスは、皮膚病変をチェックして疾患再発がないことを確実にするために、盲検研究者によって試験された。理論に束縛されることを望むものではないが、マウスは、完全寛解を維持することができる。F c 媒介性アプローチは、リツキシマブと同様に、いくらかの再発を示す場合があるか、又は示さない場合があるが、理論に束縛されることを望むものではないが、再治療で応答可能である。臨床的解釈を考慮すると、D s g 3 - F c 治療に応答することができない少数の患者は、放射線療法及び / 又は B C R - T 細胞エンゲージャアプローチの選択肢を有し得る。

20

【0149】

感染感受性：本願発明者らの療法が免疫系を全体的に抑制するかどうかを試験するために、C 5 7 B L / 6 マウスを活性 L C M V - C l 1 3 に感染させることができる。動物に A K 2 3 ハイブリドーマを感染21日後に注射し、続いて本明細書に記載の実験計画に従って本願発明者らの治療戦略を行うことができる。感染マウス及び対照マウスについてのウイルス負荷を、注射の30日後に比較することができる。あるいは、本願発明者らの P V 療法の7日後に、マウスに、リステリア・モノサイトゲネス (L i s t e r i a m o n o c y t o g e n e s) 4 0 により経口的に、又は L C M V 感染により静脈内にチャレンジすることができる。肝臓及び脾臓における微生物負荷を感染10日後にチェックし、感染のみのマウスと比較する。いずれの実験においても、理論に拘束されることを望むものではないが、ウイルス負荷に差はない。

30

【0150】

抗 D s g 3 B 細胞の死滅を媒介する D s g 3 - F c 融合タンパク質の能力を試験する

非限定的で例示的な結果。本願発明者らは、マウス及びヒトの両方の F c 融合タンパク質である m D s g 3 - E C 1 - 3 - I g G 2 a (m F c) 及び h D s g 3 - E C 1 - 3 - I g G 1 (h F c) を作製した。ヒト I g G 1 及びマウス I g G 2 a 由来の F c 領域を、それらの高い F c 媒介性死滅活性について選択した。タンパク質は、C 末端に F L A G タグ、ソルターゼ認識モチーフ及び H i s 6 タグを有するように操作された。8 アミノ酸配列 (D Y K D D D D K) である F L A G は、ウェスタンブロット及びフローサイトメトリー分析のために使用することができ、その後、インビボで使用される場合、構築物の代謝運命の分析のために使用することができる。H i s 6 タグを精製に使用し、ソルターゼタ

40

50

グを部位特異的に改変を導入するために使用した。本願発明者らは、哺乳動物 Expi293F細胞を使用して両方の構築物を発現させ、Ni-NTAアフィニティーカラムを介して精製し、SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング分析を使用して特性評価して、構築物の形成を確認した（図6のパネルA～B）。Gly3-Alexa647ソルターゼ基質を合成し、これを使用して、融合タンパク質をAlexa Fluor 647で部位特異的に標識した。ソルターゼ反応は、構築物（50 μM）、Gly3-Alexa647基質（500 μM）、及びソルターゼ（5 μM）を4℃で1時間混合することによって行った。Alexa647標識された構築物をサイズ排除カラムクロマトグラフィーによって精製し、構築物のゲル内蛍光スキャンによって標識を更に確認した（図6のパネルB）。構築物の機能性を特性評価するために、本願発明者らは、Alexa647標識されたmDsg3-EC1-3-mFcを使用して、抗mDsg3 AK23ハイブリドーマ及び抗hDsg3 F779細胞を染色した。細胞を親和性及び特異性（低nM濃度での）により染色し（図6のパネルC）、これは、F779細胞上の患者由来BCRがマウスDsg3タンパク質と交差反応することを示している。対照として使用したNalm-6細胞は、いかなる結合も示さなかった（図6のパネルC）。Alexa647標識されたhDsg3-EC1-3-IgG1（hFc）を使用して同様の実験を行い、これは、構築物がF779細胞に結合し、マウスAK23細胞も染色したことを示した（図6のパネルB～Cと同様）。構築物を更に特性評価するために、本願発明者らは、まず、プレートをAK23 Abでコーティングし、別のプレートをP3F3（抗ヒトDsg3）でコーティングすることによって、ELISAアッセイを行った。その結果は更に、本願発明者らが作製したヒト及びマウス構築物が両方の抗体に特異的に結合することを示した（図6のパネルD）。P3F3抗体を、製造業者のプロトコルに従って、Expi293F細胞において作製した。AK23抗体をAK23ハイブリドーマ培地から精製した。同様のアプローチに従って、本願発明者らは、ヒト及びマウスFcに融合したマウス及びヒトDsg3-EC1-4及びDsg3-EC1-5を生成し、それらの結合を完全に特性評価する。

10

20

30

40

【0151】

Fc媒介性インビトロ死滅アッセイの確立：まず、本願発明者らは、Dsg3-Fc融合体が、そのFc（IgG2a）を介して、低いnM親和性でマウスマクロファージのFcγ受容体に結合することを確認した（図6のパネルE）。対照Nalm6細胞は、染色されないままであった。融合タンパク質がFc媒介性死滅を引き起こし得るかどうかを決定するために、マウスRAW264.7マクロファージ細胞と共培養したF779又はAK23標的細胞を、mDsg3-mFc融合タンパク質で処置した。10 nM用量は、24時間後に、F779及びAK23細胞のそれぞれ65%及び60%の死滅を引き起こし、Nalm6又はハイブリドーマ対照細胞のいずれも死滅させなかった。48時間の時点で、本願発明者らは、F779細胞の94%の死滅を観察し、対照Nalm-6細胞には変化はなかった（図7）。AK23ハイブリドーマ細胞は、抗Dsg3抗体を培地中に放出し、これにより、PV患者における生理学的条件と同様に、構築物を中和することができる。これにもかかわらず、本願発明者らは、10 nM用量でAK23細胞とF779細胞との間で同様の有効な死滅を依然として観察し、Dsg3に対する抗体が融合タンパク質の死滅有効性に対して最小限の負の影響を有することを示している。死滅の用量依存性を評価することができるが、これは、これが動物試験及び臨床的解釈に影響を及ぼすためである。同様の実験を、マウス骨髄由来マクロファージ自己抗体を使用して、標準的なELISAによって行うことができる。また、正常なBリンパ球数は、PBMC採取時にCD19及びCD20によって示すことができる。

【0152】

動物試験

治療：Dsg3-Fc治療のインビボ有効性を試験するために、融合タンパク質をAK23注射の0、2又は5日後に静脈内注射することができる（モデル1）。これらの時点は、本願発明者らが、疾患負荷と治療の有効性との間の関係を特定すること、すなわち、

50

治療が予防的であるかどうか、及び／又は重度の疾患表現型をレスキューすることができるかどうかを決定するのを助けることができる。治療タンパク質は、最適条件を見出すために、種々の濃度（尾静脈 I V 注射を介して 100 μ l の最終体積中 5 mg / kg ~ 15 mg / kg 46、47）で使用され得る。範囲は、自己免疫マウスモデルにおける B 細胞枯渇のために使用される抗体濃度に基づいて決定され得る。能動疾患モデル（モデル 2）の場合、以前の試験では、循環抗 D s g 3 I g G が早くも 4 日目にレシピエント R a g 2 - / - マウスの血清中に存在し、その後急速に増加し、21 日目頃にプラトー状態になったことが報告されているため、治療を、R a g 2 - / - マウスにおける養子細胞導入の 0 日後、14 日後、又は 21 日後に行う。抗 D s g 3 E L I S A、体重減少、及び皮膚病変／びらんなどの非侵襲的読み出しを、様々な時点（治療後 4 日目、10 日目、17 日目、25 日目、及び 35 日目）で行うことができる（治療群及び対照群について n = 10 匹のマウス）。これらのデータから得られた傾向を使用して、治療を受けなかった対照マウスにおけるピークを確立することができる。試験により、ピークが 10 日目と 20 日目との間にあることを確立した。ピーク後の時点で、粘膜関門の免疫蛍光及び組織学的染色のために皮膚生検を得ることができる。モデル 1 及び 2 の両方で、可溶性抗 D s g 3 抗体は、本願発明者らの構築物の死滅能力を部分的に中和し得る。そうである場合、本願発明者らは、異なる量の構築物を使用して、最適用量（最も低いオフターゲット率で最も高い死滅）を見出す。対照：陰性対照については、D s g 1 - F c 及び D s g 3 変異 F c（F c 機能性を有さない）を、治療タンパク質と同じ濃度で使用する。更に、陽性対照として、本願発明者らは、マウスにおいて B 細胞を効果的に枯渇させることが示されているため 48（A K 2 3 ハイブリドーマ細胞が、抗 C D 2 0 抗体により完全に枯渇される場合、又はされない場合があるため、モデル 2 においてより効果的であり得る）、動物当たり 250 μ g の濃度で抗 C D 2 0 I g G（クローン S A 2 7 1 G 2）を使用して調査する。読み出し：モデル 1 実験の読み出しは、A K 2 3 ハイブリドーマ細胞（ルシフェラーゼ陽性であるため）の生物発光イメージング（I V I S）であり、これにより、A K 2 3 細胞の高感度の縦断的測定を可能にする。更に、モデル 1 及び 2 の両方について、治療の開始後 5 日目及び 14 日目に測定した血清抗 D s g 3 力価、皮膚びらの盲検調査、I g G 沈着を検出するための粘膜試料の免疫蛍光、及び粘膜関門の組織学的評価を行うことができる。B 細胞カウントも同様に実施して、それらが治療の間正常レベル内に維持されることを確実にすることができる。理論に拘束されることを望むものではないが、治療は、疾患の臨床的解決及び組織学的解決をもたらす。

10

20

30

【0153】

追加の試験

インビトロ試験：ソルターゼペプチドのタンパク質操作及び発現、クローニング、並びに合成は、P I の研究室において日常的であり、理論に束縛されることを望むものではないが、タンパク質発現及びペプチド合成の生成及びスケールアップに困難はない。しかしながら、タンパク質発現収率が特定の構築物について低い場合、本願発明者らは、この問題に対処するために以下の異なる経路を調査することができる：（1）発現に使用されるコドン再最適化する、（2）異なるシグナルペプチド配列を使用する、（3）E x p i 2 9 3 F 細胞の代わりにタンパク質発現のための他の系、例えば C H O 細胞又は昆虫細胞を使用する。理論に束縛されることを望むものではないが、可溶性ポリクローナル抗 D s g 3 抗体は、本願発明者らの構築物の効果を完全にではなく部分的に中和する。したがって、本願発明者らは、ポリクローナル P V 血清 I g G の存在下で、F 7 7 9、P V B 2 8 及び A K 2 3 細胞に対する本願発明者らの構築物の死滅能力を評価することができる。更に、これらの構築物の投薬は、オマリズマブ（I g E レベルに基づいて使用される I g G 1 k 抗ヒト I g E）などの薬物と同様であるが、直接的には類似しておらず、患者依存性であり、循環抗 D s g 3 力価のレベルに基づき得るので、本願発明者らは、これを臨床診療における制限とは考えない。加えて、現実世界の状況では、本願発明者らの治療薬は、抗 D s g 3 力価を低下させる他の薬物と同時に使用することができる。更に、モノクローナル及びポリクローナル抗 D s g 3 I g G は、D s g 3 自己抗体産生 B 細胞に特異的な

40

50

C A A R T細胞の死滅能力に対して有意な効果を有さないことが見出された¹⁶。この融合タンパク質の有効性を更に増加させるために、本願発明者らは、I L - 2と融合したD s g 3 - F cを設計し、首尾よく発現させたが、これは（理論に束縛されることを望むものではないが）より多くの細胞に結合し、死滅を増強することができる。他のサイトカイン（例えば、I L - 15）も同様に調査することができる。しかし、これらのアプローチは、いくつかの副作用を有する場合があります、又は有さない場合がある。陰性対照実験のために、抗D s g 3抗体の発現を欠く細胞に加えて、代替法として、本願発明者らが同様に発現及び使用することができるD s g 1融合体の合成のためのプラスミドを設計し、作製した。インビボ試験：長期モニタリング及び任意の潜在的副作用を、上で説明したように実施することができる。本願発明者らは、治療の用量依存性及びそれが抗D s g 3自己抗体力価の存在とどのように相関するかを（E L I S Aを介して）注意深く調べることができる。生物製剤の広範な使用により、抗薬物抗体は、抗T N F αからリツキシマブまで及ぶ複数の薬剤について報告されている。免疫複合体沈着などの主要な免疫有害事象が理論化されているが、臨床診療では実現されていない。オマリズマブの場合のように、生物製剤が高循環抗体に直接結合する場合、高いI g Eレベルを有する患者への投薬は、免疫有害事象を生じなかった。同様に、理論に束縛されることを望むものではないが、血清中の抗D s g 3 I g Gの存在は、いかなる主要な免疫有害事象も生じさせないが、これをモニタリングする。

10

【0154】

抗D s g 3 B細胞の死滅を媒介するD s g 3抗C D 3融合体の能力を試験する

20

抗C D 3 e s c F vに対するD s g 3融合体の合成。N - C D s g 3抗C D 3 e融合発現プラスミドを、h D s g 3 - E C 1 - 3及びO K T 3抗C D 3 e s c F vのc D N Aを含有するように設計した。O K T 3クローンは、二重特異性T細胞エンゲージャの抗C D 3部分として臨床で使用されてきた。C D 3 eは、全ての成熟Tリンパ球上に見出される。構築物は、他の二重特異性T細胞エンゲージャと同様に、N末端にD s g 3及びC末端に抗C D 3 eを有するように設計された。更に、この構造は、E C 1 - E C 3ドメインがD s g 3反応性B細胞による認識に利用可能であることを確実にすることができる。他の二重特異性T細胞エンゲージャと同様に、可撓性（G 4 S）3スペーサをD s g 3タンパク質とs c F vタンパク質との間に含めた。E x p i 293 F細胞を使用してタンパク質を発現させた。

30

【0155】

クリック化学を用いたC - C融合：理論に束縛されることを望むものではないが、ソルターゼを使用することにより、D s g 3及び抗C D 3 e s c F vタンパク質のC末端にクリックハンドルを部位特異的に導入することができ、これにより、アジド-アルキンクリック化学を使用してそれらを一緒に「クリック」することができる。これにより、C - C融合体の産生が起こり、これは、伝統的な遺伝的アプローチを介して作製することが不可能である。そのようなアプローチは部位特異的であり、それによって、産物は、その機能性を保持することができる。このアプローチを確立するために、本願発明者らは、ブリナツモマブに類似した、抗C D 19によって抗C D 3 s c F vをクリックする融合体を合成することができ、本願発明者らはそれを死滅アッセイの陽性対照として使用することができる。本願発明者らは、両方のs c F v（抗C D 3 O K T 3クローンからなる）についてブリナツモマブの同じ配列を使用した。本願発明者らはまず、そのC末端にソルターゼ認識タグ（L P E T G）を備えた抗C D 3 e s c F vを細菌により発現させた。抗C D 19 s c F vを同様に作製した。次に、G l y 3 - アルキン及びG l y 3 - アジドソルターゼ基質を合成した。抗C D 3 e s c F vをアルキン基質と共に導入し、抗C D 19 s c F vをアジド基質と共に導入し、両方ともソルターゼを介してそれらのC末端に導入した。クリック官能化s c F vをF P L Cによって精製し、その後、銅媒介性アジド-アルキン環化付加化学によって一緒にクリックした（図8のパネルA）。生成物をF P L Cにより精製し、S D S - P A G E及びフローサイトメトリー分析を用いて特性評価し、クリックされたC - C融合体がN a l m 6細胞及びヒトT細胞の両方を強い親和性で染

40

50

色することを確認した。本願発明者らは、同様に D s g 3 抗 C D 3 e の C - C 融合体を作製するためのアプローチを使用する。2. N - C の融合体のソルターゼ媒介性合成：クリック化学アプローチは、遺伝子的に融合されたヘテロ二量体タンパク質の発現が困難であることが判明した場合、従来の遺伝的融合の代替法である。しかしながら、第2の代替法を提供するために、また、理論に束縛されることを望むものではないが、ソルターゼを介してより「天然の」融合体を作製するために、本願発明者らは、以下のように、いずれのタンパク質にも事前の改変を行うことなく、D s g 3 抗 C D 3 e の N - C 融合体を作製することができる。ソルターゼ反応可逆性を利用して（理論に束縛されることを望むものではないが）、トリグリシン分子（G G G）を使用して、C - N タンパク質融合体の形成を触媒することができる。タンパク質 A は、C 末端に「L P E T G」モチーフを有するように操作され、タンパク質 B は、N 末端に「L P E T G G G」を有するように操作される。ソルターゼ及びトリグリシン分子の添加により、タンパク質 B から「L P E T」部分を除去し、それを「G l y 3 - B」に変換することができる。次いで、系内で産生された G l y 3 - B タンパク質は、タンパク質 A と反応して、クリック化学が関与しない融合産物「A - L P E T - G G G - B」を形成し得る（図8のパネルB）。反応は、過剰の G G G 触媒が反応混合物を離れることを可能にする透析カセット中で行うことができ、これは更に反応を融合産物の形成の方へと移動させる。このアプローチを確立するために、本願発明者らは、このような「抗 C D 1 9 抗 C D 3 s c F v 融合体」を作製した。抗 C D 1 9 s c F v は、その C 末端に「L P E T G」ソルターゼタグを有する。本願発明者らは、以下の配列「M H i s 6 - L P E T G G G - a n t i - C D 3 s c F v」を有するように、抗 C D 3 s c F v タンパク質を操作した（メチオニンコドン（A T G）が開始コドンとして働くので、タンパク質は常に M で開始する、精製を容易にするために H i s 6 を使用した）。次に、本願発明者らは、抗 C D 1 9 及び抗 C D 3 s c F v、G l y 3、並びにソルターゼを混合し、反応を 4 °C で一晩進行させた。産物形成を S D S - P A G E 分析により確認し、融合タンパク質を F P L C サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した（図8のパネルC）。融合体を使用して、N a l m 6 細胞（C D 1 9 +）及び J u r k a t 細胞（C D 3 +）を染色した。フローサイトメトリーの結果は、融合体が高い親和性で細胞を染色することを確認した（図8のパネルD）。この戦略は、遺伝子融合体として発現させることが困難である C - N タンパク質融合体を作製するために、社会において広範な適用を有し得る、未公開のアプローチである。c D N A プラスミドへのソルターゼタグの導入を除いて、いずれのタンパク質に対しても事前の改変が必要とされない。このアプローチにより、D s g 3 抗 C D 3 e 融合体を作製する。

10

20

30

40

50

【0156】

マウス及びヒト D s g 3 - E C 1 - 3 を作製し、同様に特性評価した（図9のパネルA～B）。次に、ソルターゼを使用して、それらの C 末端に A l e x a 6 4 7 を導入した（図9のパネルA）。生成物を特性評価するために、本願発明者らは、抗 D s g 3 細胞（F 7 7 9、及び A K 2 3 細胞）を染色した。A l e x a 6 4 7 標識された m D s g 3 - E C 1 - 3 は、高い親和性及び特異性で細胞を染色することができた（図9のパネルC）。対照として使用した N a l m 6 細胞は、いかなる染色も示さなかった。本願発明者らは、クリック及び直接ソートタグ化アプローチの両方に従って、D s g 3 抗 C D 3 融合（マウス及びヒト）タンパク質を作製し、これを完全に特性評価する。本願発明者らは、同様に抗マウス C D 3 e s c F v を作製し、特性評価した（クローン 2 C 1）⁶¹。

【0157】

構築物の死滅有効性を測定する。陽性抗 D s g 3 細胞株（A K 2 3、F 7 7 9 及び P V B - 2 8）及び陰性細胞株（N a l m 6 及び無関係のハイブリドーマ）を、新鮮なヒト C D 8 + 細胞傷害性 T 細胞と共培養する（E : T 比は 1 : 1、5 : 1、及び 1 0 : 1）。キメラ D s g 3 抗 C D 3 e 融合タンパク質を標準的な細胞インキュベーター内で 3 7 °C でインキュベートする。融合タンパク質は、最適条件を見出すために様々な濃度（1 0 µ g / m L ~ 1 n g / m L）で使用される。第2の対照として、抗 D s g 3 細胞と対照細胞との間に細胞死の差がないと予想して、細胞を培地単独でインキュベートする。フローサイト

メトリー分析を使用して、細胞の標準的な生－死分析を行う。T細胞活性化の指標としてのIFN- γ の産生を、ELISpotアッセイを使用して評価する。インビトロアッセイにおける患者PBMCに対するアプローチの有効性を描写する：目的1と同様に、hDsg3抗hCD3e融合タンパク質を、PV患者から得たヒトPBMC培養物に添加することができる。健常PBMCを対照として使用することができる。（理論に束縛されることを望むものではないが）患者自身のT細胞が、標的化された抗Dsg3 B細胞を死滅させるように指向され、活性化されるため、更なるT細胞は混合物に添加されない。様々な濃度の融合体を使用して、最適条件を見出すことができる（10 μ g/mL～1 ng/mL）。融合体の添加の4時間後、12時間後及び24時間後に、死滅有効性を分析することができる（各実験についてn=10）。分析は、Fcアプローチと同様に行うことができる。

10

【0158】

Dsg3抗CD3eアプローチを用いた動物試験。組換えタンパク質を、AK23細胞注射（モデル1）の0、2又は5日後に、様々な濃度（0.5 mg/kg～1 mg/kg）で静脈内に注射することができ、これは、最適条件を見出すために最終体積100 μ lの腫瘍学的治療設定で使用されるものと同様である。能動疾患モデル（モデル2）については、組換えタンパク質を、養子細胞導入後0日目、14日目、又は21日目にRag2- α マウスに注射した（前述の通り）。陰性対照として、Dsg1抗CD3e複合体を治療タンパク質と同じ濃度で使用することができる。読み出し（目的1に記載される通り）のために、ルシフェラーゼ（モデル1について）、免疫蛍光及び組織学的イメージング、並びに抗Dsg3 ELISA力価と共に、細胞を、治療したマウス及び治療していないマウスの皮膚生検から単離することができる。CD3+細胞の正規化されたカウントを、治療後5日目、14日目及び20日目にフローサイトメトリー分析によって分析する。Dsg3抗CD3e治療を注射されたマウスにおいてT細胞カウントが増加する場合があります、これは、組換えタンパク質がT細胞を動員することができることを確認するものである。長期モニタリング及び任意の潜在的副作用を、本明細書中で説明されるように実施する。

20

【0159】

追加の試験

インビトロ試験：ソルターゼ反応は、SDS-PAGE及び／又は質量分析を介してモニタリングすることができる。典型的には、ソルターゼ基質で標識されたタンパク質の90%より多くが得られたら、産物をサイズ排除クロマトグラフィーによって精製することができる。アジド－アルキン環化付加は、ほぼ完全な収率で、タンパク質のバイオコンジュゲーションのために広く使用される、十分に特性評価された反応である。最終的な融合構築物は、質量分析、SDS-PAGE、フローサイトメトリー及び免疫ブロット分析によって更に特性評価され得る。様々な改変ペプチドの合成は、実験室において日常的であり、（理論に束縛されることを望むものではないが）改変ペプチドの製造及び合成のスケールアップにおいて、何らかの困難性がある。しかし、一部のタンパク質は、疎水性基質の添加により可溶性が低下する可能性がある。それが問題になる場合、本願発明者らは、非常に親水性である小さなポリエチレングリコール（PEG）スペーサを、Gly3とアルキン官能基との間に含める（例えば、Gly3-PEG 5-プロパルギルアルキン）。更に、アルキン－アジドクリック反応が所与の構築物に対して高い生成物収率をもたらさない場合、本願発明者らは、安定なオキシム生成物を形成する、より親水性のアルデヒド及びアミノオキシクリックハンドルなどの代替的なクリックハンドルを使用することができ、本願発明者らはこれについて広範な経験を有している。本願発明者らは、ソルターゼ基質分子中のGly3とアルキン又はアジド官能基との間に小さなPEG3スペーサを含ませた。理論に束縛されることを望むものではないが、PEGスペーサは、構築物のより高い安定化をもたらすことができる。このPEGスペーサのサイズは、所与の融合体が低い安定性を有するか、又は低い溶解度を有する場合に変化させることができる。更に、本願発明者らは、スペーサのサイズが構築物の死滅能力に影響を及ぼすかどうかを分析す

30

40

50

ることができる。本願発明者らは、本願発明者らのマウス及びヒト D s g 3 - E C 1 - 3 構築物が、細菌により発現され、次いでリフォールディングされて、本願発明者の手持ちの全ての抗 D s g 3 細胞及び抗体に対して高い親和性（低ナノモル濃度）で結合することを示した。更に、D s g 3 のグリコシル化は、患者の抗 D s g 3 抗体に対するその結合において重要な役割を果たさないことが示された。したがって、本願発明者らは、D s g 3 構築物を作製するために本願発明者らの確立されたアプローチを使用し続ける。本願発明者らは、臨床的解釈を考慮する場合により関連がある可能性があるため、目的 1 において既に議論された代替（コドン最適化、異なるシグナル配列、及び異なる発現系など）を通して遺伝子融合発現の収率を増加させるために、本願発明者らの最適化の試みを続ける。

目的 1 で考察した F c 構築物については、グリコシル化が F c 機能性に重要であり、F c 構築物について良好な発現収率（E x p i 2 9 3 細胞 1 0 0 m L 当たり約 1 m g）が既に得られているので、全てのタンパク質を哺乳動物 E x p i 2 9 3 F 細胞で発現させたか、又は発現させる。インビボ試験：理論に束縛されることを望むものではないが、抗 C D 3 治療の副作用は、C D 4 T 細胞、例えば、T 濾胞性ヘルパー細胞（T f h）と自己反応性 B 細胞との結合であり得、これにより、それらの拡大、したがって疾患の増悪を引き起こす場合がある。理論に束縛されることを望むものではないが、臨床で使用される二重特異性 T 細胞エンゲージャは、C D 8 細胞傷害性 T 細胞を動員して標的細胞を死滅させるのに有効であるため、これは起こらない。理論に束縛されることを望むものではないが、C D 8 T 細胞動員の頻度は、動員された T f h 細胞の頻度よりも高い可能性がある。これは、全てではないがほとんどの C D 8 T 細胞は、任意の T C R と共に、自己反応性 D s g 3 細胞を死滅させるために動員され得るが、C D 4 T 細胞（無関係の T C R を発現する）と自己反応性 B 細胞との結合は、B 細胞の拡大をもたらすとは予想されないためである。おそらく、D s g 3 由来ペプチド-M H C 複合体に対する反応性を有するほんの数個の C D 4 T 細胞の結合が、自己反応性 B 細胞の拡大をもたらし得る。更に、二重特異性 T 細胞エンゲージャ（例えば、ブリナツモマブ）を投与された患者における自己免疫の発生の報告はなく、異なる種類の B 細胞媒介性自己免疫疾患の発生率がわずかではないことを考慮すると、この観察は、そのような事象の発生がありそうもないことを示唆する。それにもかかわらず、本願発明者らは、この問題をモニタリングする。P V の能動免疫モデル（モデル 2）は、この問題を研究するための理想的なモデルであり得るが、これは、抗 D s g 3 力価、D s g 3 自己反応性 B 細胞の数、及び C D 4 T 細胞、特に T f h 細胞の数及び表現型をモニタリングすることによって注意深く評価される。F c 媒介性アプローチと同様に、この治療に対する抗 D s g 3 抗体の効果は、臨床的有意性を有する可能性が低い。加えて、現実世界の状況では、本願発明者らの治療薬は、抗 D s g 3 力価を低下させる他の薬物と同時に使用することができる。それにもかかわらず、この問題をモニタリングし、評価することができる。

10

20

30

40

50

【0160】

アルファ放射標識 D s g 3 が抗 D s g 3 B 細胞を死滅させる能力の調査

デスモグレイン-3 タンパク質の放射性標識。利用可能な同位体のうち、アクチニウム-225 (^{225}Ac) ($t_{1/2} = 9.9 \text{ d}$) は、臨床で使用されてきた 25、71。 ^{225}Ac による抗体の標識は、十分に特性評価された D O T A キレート剤分子を介して行うことができる。本願発明者らは、G l y 3 - D O T A ソルターゼ基質及び基質を用いて部位特異的に改変された m D s g 3 - E C 1 - 3 タンパク質を合成し、その産物を特性評価し、タンパク質が抗 D s g 3 細胞に対して高い結合親和性を有して機能的なままであることを確認した（図 10）。次に、D O T A 標識された D s g 3 を ^{225}Ac 放射性同位体と共に導入する。生成物の形成及び放射化学収率は、放射性 H P L C 分析を使用して決定される。精製された ^{225}Ac - D s g 3 構築物の安定性を、P B S 中及びヒト血清中、37℃でインキュベートすることによって評価する。放射性標識がデスモグレインタンパク質の機能性に影響を及ぼさないことを確実にするために、陽性抗 D s g 3 細胞及び陰性細胞を ^{225}Ac - D s g 3 と共に 30 分間インキュベートする。細胞を 3 回洗浄し、放射活性を測定する。本願発明者らは、抗 D s g 3 細胞が放射性であるのに対して、陰

性細胞は、何らかの放射活性も有し得るか、又は有し得ないと予想する。これにより、放射性標識手順がDs g 3タンパク質の結合能力を損なわなかったことを確認することができる。

【0161】

確立された抗Ds g 3細胞を使用して、放射性標識された構築物の死滅有効性を測定する。陽性抗Ds g 3ハイブリドーマ細胞及び陰性細胞を丸底48ウェルプレート中で培養する。放射性標識した ^{225}Ac -Ds g 3タンパク質を37℃で細胞に加える。放射性標識組換え構築物は、最適条件を見出すために様々な濃度(10 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ~ 1 nCi / mL)で使用される。対照として、細胞を同量の ^{225}Ac -DOTA単独(Ds g 3にコンジュゲートしていない)と共にインキュベートし、これは抗Ds g 3細胞を死滅させないと予想される。放射性標識されたDs g 3又は対照同位体とのインキュベーションを20分間行い、続いて非結合試薬/同位体を洗い流して(3回)、照射による非特異的な細胞死を防ぐ。細胞及び放射性標識されたDs g 3のインキュベーションの4時間後、16時間後、24時間後及び48時間後に、フローサイトメトリー及び標準的な生-死分析によって分析を行う。

10

【0162】

インビトロアッセイにおけるPV患者PBMCに対する ^{225}Ac -放射性標識Ds g 3構築物の有効性を評価する。目的1及び2と同様に、 ^{225}Ac 放射性標識されたDs g 3構築物をヒトPBMC細胞(健常試料及び患者試料の両方)に添加し、混合物を標準的な細胞インキュベーター内で37℃でインキュベートする。様々な濃度の構築物を使用して、最適条件を見出す(10 mCi / mL ~ 1 nCi / mL)。対照として、細胞を同量の ^{225}Ac -DOTA単独と共にインキュベートする。放射性標識されたDs g 3又は対照同位体とのインキュベーションを20分間行い、続いて非結合試薬/同位体を洗い流して(3回)、照射による非特異的な細胞死を防ぐ。分析は、放射性標識されたDs g 3とのインキュベーションの4、16、24及び48時間後に、抗原特異的IgG B細胞枯渇及び総IgG B細胞枯渇についてのELISpotアッセイによって行う。本願発明者らは、自己反応性抗Ds g 3 IgG及び総IgGレベルの減少パーセンテージを測定する。更に、フローサイトメトリー、並びにアッセイの内部標準として作用するB細胞及びT細胞を含む非特異的細胞に対する標準的な生-死分析を介して分析を行う。対照、包含基準及び除外基準は、目的1及び2で言及したものと同一である。予想される結果は、Ds g 3自己反応性B細胞の標的化された死滅を確認する。

20

30

【0163】

放射線療法アプローチを用いた動物試験。放射性標識された組換えタンパク質を、AK 23細胞注射(モデル1)の0、2又は5日後に、 ^{225}Ac 標識されたDs g 3構築物と共に静脈内注射する(約30 kBqの活性及び動物当たり50 μg のDs g 3⁷²)。本願発明者らは、 ^{225}Ac -DOTA(キレート剤分子)を対照として使用するであろう(同量の活性(約30 kBq)、動物当たり約3.0 μg のDOTA)。ルシフェラーゼ、免疫蛍光及び組織学的イメージング、並びに抗Ds g 3 ELISA力価と共に読み出すために、治療したマウス及び治療していないマウスの皮膚生検から細胞を単離し、ガンマカウンターを使用して活性を測定する。同様の実験を、目的1で説明した実験戦略に従って、能動免疫モデル²について実施する。エキスピボ生体内分布試験を、本願発明者らが記載したように実施する^{29、30}。注射の2、6、24、及び48時間後に動物を安楽死させる。次に、それらの主要な臓器及び組織を単離し、秤量し、それらの放射活性を、注射標準(対照としての ^{225}Ac -DOTA)の放射活性と共に測定する。結果を分析し、組織1グラム当たりの注射用量のパーセンテージ(%ID/g)として報告する。循環半減期の測定は、複数の時点で血液の液滴を収集し、続いてそれらの活性測定を行うことによって行われる。

40

【0164】

追加の試験

インビトロ試験：本願発明者らは、タンパク質を放射性標識することにおいて広範な経

50

験を有する。放射性標識は、D s g 3 タンパク質に対する自己反応性抗体の結合親和性に影響を及ぼし得る。これは、アクチニウムカチオン（ $3+$ ）の高い正電荷に起因するものであり得る。放射性標識がD s g 3 タンパク質の結合能力に影響を及ぼす場合、本願発明者らは、P E G スペーサを有するソルターゼ基質（例えば、G l y 3 - P E G 5 - D O T A）を合成する。これは、A c カチオン（ $3+$ ）とD s g 3 タンパク質との間の適切な距離を可能にするはずである。ペプチドの合成は、本願発明者らの実験室において日常的である。本願発明者らは、 ^{225}Ac 同位体を使用することを選択したが、これは、それが臨床で使用されているという理由だけでなく、それが他の既存の同位体に対して特有の利点、例えば、組織における限定された範囲、良好な線形エネルギー移動、比較的短い半減期（約10日）、及び崩壊ごとに放出される複数の（正味4つの）アルファ粒子を有する
10
という理由による。 ^{225}Ac - アクチニウムの使用が他の予期せぬ問題を有することが明らかになった場合、本願発明者らは、代替として、臨床設定においても使用される ^{213}Bi - ビスマスを使用することができる。インビボ試験：放射線療法の問題は、腎毒性である。本願発明者らは、腎毒性についてモニタリングし、腎臓取り込みを減少させるための生物学的に不活性で親水性のポリマーであるポリエチレングリコール（P E G）の結合などのアプローチを使用する。本願発明者らは、P E G 化が前臨床研究において放射性標識抗体断片の腎臓取り込みを減少させる（10倍より多く）ことを示した。更に、いくつかの承認されたP E G 化タンパク質治療薬が存在するため、P E G 化は臨床において安全であることが示されている。異なるサイズのP E G（5、10及び20 k D a）を使用して、
20
腎臓クリアランスに対するP E G 化の効果を評価する。あるいは、本願発明者らは、150 m g / k g のゲロフシン（これは、腎臓取り込み及び腎臓毒性を減少させることが示されている）をマウスに同時注射し得る。本願発明者らは、P E T 同位体（それぞれ約12・7時間及び約3・3日の $t_{1/2}$ を有する ^{64}Cu 及び ^{89}Zr ）で構築物を標識することによって、構築物の薬物動態及びインビボでの組織生体内分布を試験することができ、これに関して本願発明者らは広範な経験を有している。全身P E T 画像は、組織の生体分布及び動態を明らかにするだけでなく、構築物のいずれかが任意の臓器において潜在的に捕捉され得るかどうかにも明らかにし、構築物は次に臓器損傷をもたらし得る。したがって、P E T イメージング実験は、潜在的な副作用がある場合、その潜在的な副作用が何であり得るかを明らかにする。本願発明者らは、P E T イメージングに関する広範な経験を有している。エキスピボオートラジオグラフィーも同様に実施して、非常に高感度で組織
30
生体内分布を定量的に測定する。先の2つのアプローチと同様に、この治療薬に対する抗D s g 3 自己抗体の効果を注意深く評価する。 ^{225}Ac の半減期は、比較的短い（約10日）。しかしながら、 ^{225}Ac - D s g 3 の循環半減期の増加が、自己抗体との複合体形成及びF c R n を介した再利用に起因して起こり、それによって複合体を取り込み得る細胞に対する副作用が増強される場合、非常に短い半減期（約45分）を有する臨床的に使用される ^{213}Bi 同位体を使用することができる。これは、放射性標識されたD s g 3 と自己抗体との間の複合体形成から生じる副作用の問題に対処するはずである。臨床的解釈を考慮すると、このアプローチは、既存の治療に失敗した患者のための選択肢であり得、潜在的な将来の適用は、他の自己免疫性水疱症、例えば、免疫抑制の使用がより悪い転帰と関連する場合、腫瘍随伴性又は免疫療法誘導性の自己免疫性水疱症に拡大される
40
 ^{83}Kr 。加えて、F c 媒介性及び二重特異性T細胞エンゲージャアプローチと同様に、現実世界の状況では、放射線療法アプローチは、抗D s g 3 力価を低下させ、かつ／又はI V I G などのF c R n を飽和させる他の薬物と同時に使用することができる。

【0165】

追加のインビボ試験：受動導入モデルは、R a g 2 - / - マウスにおいて確立されている32、34。本願発明者らは、それを免疫応答性W T マウスにおいて確立し、それに必要なハイブリドーマ細胞の数を最適化することができる。あるいは、R a g 2 - / - におけるA K 2 3 受動導入モデルは、免疫応答性宿主に類似し得るW T C 5 7 B L / 6 脾細胞を投与される。更に、提案された治療について、本願発明者らは、初代ヒト細胞及びハイスループット膜プロテオームアレイを使用することによって毒物学スクリーニングを実
50

施して、開発された治療の各々について任意のオフターゲット細胞傷害性相互作用を特定する。理論に束縛されることを望むものではないが、D s g 3 含有構築物は、潜在的な長期安定性のために膜貫通ドメインを含む細胞表面上に完全な構造が存在することを必要とするので、それ自体を皮膚内のデスモソームに組み込まない。更に、動物モデルにおける D s g 3 - C A A R T 細胞についての広範な試験は、動物皮膚における D s g 3 - C A A R のいかなる蓄積も示さず、同様に、ヒト皮膚がマウス皮膚に移植された場合、h D s g 3 - C A A R T 細胞は、移植された皮膚において検出されず、これは、D s g 3 構築物が、それ自体をデスモソームに組み込むことが予測されないことを示している。これは、組織学的分析を通して試験される。本願発明者らは、既存の抗 D s g 3 抗体が試薬に結合するかどうか、生体内分布に影響を及ぼすかどうか、又は D s g 3 自己抗体 F c 受容体を発現する細胞との相互作用をもたらすかどうかを決定することができる。これは、両方の動物モデルにおいて、並びに広範な組織学、P E T 及びフローサイトメトリー分析によって、試験される。理論に束縛されることを望むものではないが、本願発明者らが開発中の生物製剤は循環半減期が短く、C A A R T 細胞治療などの養子細胞療法とは異なり、レシピエント（マウス又は最終的には患者）に留まらないので、これは大きな問題ではない。開発された治療薬の半減期は、放射線療法剤及び抗 C D 3 融合体についてはわずか数時間以内であり得、D s g 3 - F c 構築物（F c R n を介して再利用することができる）については数時間から潜在的に数日間、又は更に数週間以内であり得る。本願発明者らの治療が、他の免疫細胞区画に対して何らかの有害作用を有したかどうかを試験するために、本願発明者らが提案した療法を受けたマウスから P B M C を収集し、T h 1、T h 2、T h 1 7、T r e g、及び C D 8 T 細胞のパーセンテージをフローサイトメトリー分析によって分析する。年齢及び性別を一致させた非操作 W T B 6 マウスを対照として使用する。理論に束縛されることを望むものではないが、免疫細胞集団のパーセンテージに差はなく、治療の有害な長期効果がないことを示唆している。

10

20

【0166】

自己反応性 B 細胞を標的とするための本明細書中のアプローチ、並びにこれらの治療薬を開発するための本願発明者らの戦略（放射性同位体の部位特異的導入、C - C 融合体の合成及び N - C ソルターゼ媒介性融合体）は、独特である。D s g 3 - F c を作製する本願発明者らの戦略は、安全なものであり、リツキシマブの使用に取って代わることができる。他の 2 つのアプローチは、利用可能な治療に回答しない患者にとって代替選択肢を提供する。したがって、本明細書に記載の組成物及び方法は、P V の治療を変えるだけでなく、他の自己免疫性水疱症（例えば、水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状 I g A 水疱性皮膚症）、狼瘡、強皮症、グッドパスチャー病、グレーブス病のサブタイプから免疫介在性血管炎に及ぶ既知の抗原標的に対するいくつかの自己抗体／免疫複合体媒介性疾患の治療を開発するための道を開くことができる。したがって、本願発明者らは、提案された治療薬は、自己免疫疾患の治療ツールボックスへの画期的な追加とみなすことができると考える。

30

【0167】

実施例 3

尋常性天疱瘡は、破壊的な B 細胞媒介性自己免疫性疾患である。皮膚及び粘膜の細胞間接着に重要なデスモソームタンパク質であるデスモグレイン 3（D s g 3）を標的とする自己抗体は、疾患表現型の原因である。標準的な治療には、免疫系を全身的に抑制する免疫抑制剤が含まれる。本願発明者らは、D s g 3 を認識する自己反応性 B 細胞のみを特異的かつ正確に標的化して枯渇させる標的化免疫療法アプローチを開発した。本願発明者らのインビトロ及びインビボ試験は、このアプローチが、自己反応性 B 細胞の効率的かつ特異的な枯渇をもたらすことを示す。本願発明者らは、疾患の異なる期にある P V 患者から得られた末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell、P B M C）を使用してアプローチの有効性及び特異性を決定し、受動疾患及び能動疾患のマウスモデルを使用して更なるインビボ試験を行うことができる。本願発明者らは、ヒトと同様の病因及び表現型を有する疾患を発症するイヌにおいて試験を行う。理論に束縛されることを望む

40

50

ものではないが、本方法は、臨床設定に変換することができる。本明細書中で開発された技術は、全体的な免疫抑制を引き起こすことなく自己反応性細胞を標的化することによって、全ての自己抗体駆動疾患に対してより広い適用を有し得る。

【0168】

背景

尋常性天疱瘡（PV）は、皮膚及び粘膜の痛みを伴う水疱形成及びびらんを特徴とし得る、致命的な自己免疫性水疱症であり、日常生活の活動（例えば、食べる、飲む）を制限し、人の全体的なウェルビーイングに影響を与え、罹患率及び死亡率が高い^{1~3}。PVは、Dsg1に対する抗体の有無にかかわらず、デスモグレイン3（Dsg3）に対する自己抗体の産生によって引き起こされ、上皮剥離（棘細胞離開）を引き起こす^{2、4~6}。天疱瘡治療には治療上の需要が存在する。PVの治療法は存在しない。治療戦略は、多数の全身性副作用を伴う全身性ステロイド及び免疫抑制剤に大きく依存する^{7~9}。抗CD20抗体（例えば、リツキシマブ）³は、中等度から重度の疾患に対するファーストラインの選択肢となっているが、従来の免疫抑制剤よりも低いとはいえ、現在の現実の人生の意義を有するワクチンに対する液性応答を減らすこと、及び感染のリスクの増加^{10、11}、並びに治療後の再発の高いリスク^{10~12}を含む、オフターゲット免疫抑制効果と関連がある。現在臨床試験中の新生児Fc受容体及びブルトン型チロシンキナーゼ阻害剤は、オフターゲット免疫抑制効果を回避することができない。自己ポリクローナル調節性T細胞13及びキメラ自己抗原受容体（CAAR）T細胞¹⁴などの初期段階の細胞ベースの療法は、有効であることが証明されたとしても、全体的に免疫抑制性とはなり得ない。しかしながら、細胞ベースの療法は、個別化されなければならず、製造、貯蔵及び輸送のための特定の要件を有し、これは、資源が乏しい地域では実現不可能である。PVの再発は、典型的には、最初の治療中に枯渇していない同じ自己反応性細胞の拡大に起因する²。理論に束縛されることを望むものではないが、自己反応性B細胞の完全な枯渇は、治療を与える。本明細書において、本願発明者らは、自己抗原自体（Dsg3）及び一般的に使用されるFc媒介性死滅を使用することによって、特定の自己反応性B細胞を標的とする治療を記載する。この方法は、全体的な免疫機能に影響を及ぼすことなく、自己反応性の疾患を引き起こす細胞を選択的に標的とする。

【0169】

尋常性天疱瘡は、他の自己免疫性水疱症と比較して、若い健常の患者群（すなわち、若年／中年成人、平均40~60歳）が罹患する。現在の既存の治療戦略は、免疫抑制医薬、例えば、全身性ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、アザチオプリン、及びリツキシマブに限定されており、感染のリスク、長期的には悪性腫瘍のリスクがより高いこと、及び現在の現実の人生の意義を有する新たなワクチン接種に対する応答を減らすことを伴う。この疾患は、免疫抑制の強い期間で寛解させることができるが、再発のリスクは80%と高い¹⁰。試験は、天疱瘡を有する患者が、がん診断後の患者と同様の外傷後ストレスのリスクを有し、両方の状態が、頻繁な再発を伴って生命を脅かすことを示す¹⁶。この疾患群を有する患者は、その全体的な健康及び免疫機能に影響を与えることなく自己反応性細胞を除去する標的化治療を必要とする。これらを治療する臨床医は、提供する治療のレパートリーが限られており、これらの全てが、毒性、短期及び長期の健康への悪影響（生命を脅かす感染を含む）の多くを有している。保険支払人の観点では、標的化療法は、即時型感染のリスク、長期的な悪性腫瘍のリスクを低下させることによって、全体的な世界的医療費を低下させ、来院、補助的治療及び入院の数を減らすことができる。この標的化された非免疫抑制治療は、患者、臨床医及び保険支払者にとって同様に魅力的なものであり得る。

【0170】

治療薬の臨床効果は、ヒトの目で見ることができ、再発をモニタリングするための血清試験が市販されている。米国における疾患有病率は、100,000人の成人当たり5.2症例であると推定される¹⁵。患者は、生涯を通して再発する可能性があり、反復治療を必要とする。ユダヤ人の祖先のものにおいて、より高い発生率が存在する（平均よりも

約4倍～10倍高い)^{15、17}。既存の治療(すなわち、プレドニゾン、ミコフェノール酸モフェチル、アザチオプリン、リツキシマブ)及び今後の治療(例えば、新生児Fc受容体アンタゴニスト、Burtonのチロシンキナーゼ阻害剤)は、免疫抑制性であるか、又は世界市場(例えば、CAART)に一般化することが困難である。本明細書中の方法は、個別化の必要なく製造することができる共通の共有自己抗原に基づく。

【0171】

非限定的な例示的な製品／溶液

本明細書に記載される治療は、リツキシマブ(外来注入センターで投与することができる)と類似の様式で外来患者環境において使用することができる。この治療は、治療の初期段階及び再発の両方において使用される。疾患集団は、粘膜優位型尋常性天疱瘡を有する患者であり、次のステップで、落葉状天疱瘡(主な自己抗原がDsg1である)などの将来の他の自己免疫性水疱症に拡張するための明確な目標を有する。この治療は、選択的であり、リツキシマブによるB細胞プールの完全な枯渇からのオフターゲット効果／全体的な免疫抑制を有さないため、現在の標準治療であるリツキシマブ(抗CD20)に取って代わることができる。抗原-Fc(Dsg3-Fc)融合タンパク質は、Dsg3認識細胞を効果的かつ特異的に死滅させる。構築物のDsg3部分は、自己反応性病原性B細胞の抗Dsg3 BCRに結合し、Fcドメインは、貪食細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞の動員によってDsg3認識細胞のFc媒介性死滅を誘導する(図12のパネルA)。本願発明者らは、最大のFc媒介性細胞傷害性を達成するために、マウスIgG2a及びヒトIgG1 Fcドメインとそれぞれ融合したマウスDsg3及びヒトDsg3構築物を操作し、作製した。本願発明者らは、インビトロ試験及びインビボ試験の両方において、治療が自己反応性B細胞を標的とし、その死滅を媒介することができることを示した。

【0172】

非限定的で例示的なアプローチ

本願発明者らは、マウス及びヒトの両方のFc融合タンパク質であるmDsg3-mIgG2a(mFc)及びhDsg3-hIgG1(hFc)を作製した。本願発明者らは、Dsg3タンパク質の外部ドメイン1-3(EC1-3)が免疫原性及び病原性部分であり得るので、これらを使用した(図13)¹⁸。ヒトIgG1及びマウスIgG2aを、それらの高いFc媒介性死滅活性について選択した^{19~21}。タンパク質は、C末端にFLAGタグ、ソルターゼ認識モチーフ22、23及びHis6タグを有するように操作された。8アミノ酸配列(DYKDDDDK)であるFLAGは、ウェスタンブロット及びフローサイトメトリー分析のために使用することができ、その後、インビボで 사용되는場合、構築物の代謝運命の分析のために使用することができる。His6タグを精製するために使用し、ソルターゼタグを部位特異的に改変(例えば、フルオロフォアの結合)を導入するために使用した。構築物の機能性を特性評価するために、本願発明者らは、Alexa647-mDsg3-mFcを使用して、抗mDsg3 AK23ハイブリドーマ²⁴及び抗hDsg3 F779細胞¹⁴、患者由来の病原性抗Dsg3抗体で操作されたBリンパ腫細胞株(Nalm6)を染色した。細胞を、より多くの親和性及び特異性(低nM濃度での)により染色し(図12のパネルB)、これは、F779細胞上の患者由来BCRがマウスDsg3タンパク質と交差反応することを示唆している。対照として使用したNalm-6細胞は、いかなる結合も示さなかった。Alexa647標識されたhDsg3-hFcを使用して同様の実験を行い、これにより、構築物がF779細胞に強く結合し(図12のパネルB)、マウスAK23細胞も染色したことを確認した(図12のパネルBと同様)。

【0173】

まず、本願発明者らは、Dsg3-Fc融合体が、そのFc(IgG2a)を介して、低いnM親和性でマウスマクロファージ上のFc-g受容体に結合することを確認した。対照Nalm6細胞は、染色されないままであった。融合タンパク質がFc媒介性死滅を引き起こし得るかどうかを決定するために、マウスRAW264.7マクロファージ細胞

と共培養した F 7 7 9 又は A K 2 3 標的細胞を、m D s g 3 - m F c 融合タンパク質で処置した。1 0 n M 用量は、2 4 時間後に、F 7 7 9 及び A K 2 3 細胞のそれぞれ 6 5 % 及び 6 0 % の死滅を引き起こし、N a l m 6 又はハイブリドーマ対照細胞のいずれも死滅させなかった。4 8 時間の時点で、本願発明者らは、F 7 7 9 細胞の印象的な 9 4 % の死滅を観察し、対照 N a l m - 6 細胞には変化はなかった。A K 2 3 ハイブリドーマ細胞は、抗 D s g 3 抗体を培地中に放出し、これにより、P V 患者における生理学的条件と同様に、構築物を中和することができる。これにもかかわらず、本願発明者らは、1 0 n M 用量で A K 2 3 細胞と F 7 7 9 細胞との間で同様の有効な死滅を依然として観察し、これは、D s g 3 に対する抗体が融合タンパク質の死滅有効性に対して最小限の影響を有することを示している。

10

【0174】

D s g 3 - F c 構築物のインビボ有効性を確立する。ルシフェラーゼ陽性 F 7 7 9 細胞 (1 0 0 万個) の尾静脈静脈内 (i . v .) 注射の 2 日前に、N S G (N O D - s c i d - ガンマ) マウスを 6 0 0 m g / k g の I V I G で前治療した (F c γ R を介した非特異的死滅をブロックするため) (図 1 2 のパネル C)。F 7 7 9 注射後 4 日目に、全てのマウスに、機能的マクロファージを有する $1 0 \times 1 0^6$ 個の R a g 2 - / - 脾細胞を i . v . 注射し、続いて、治療群に 3 0 μ g の融合タンパク質及び対照群に P B S を腹腔内 (i . p .) 注射した (各コホートについて n = 5)。m D s g 3 - m F c を週に 5 回注射して、試験期間中、循環中で十分な薬物が利用可能であることを確実にした。疾患の進行を、生物発光イメージング及びマウスボディスコアリングによってモニタリングした。B S C < 2 になったら、P B M C を顎下出血を介して収集し、動物を安楽死させた。その結果は、対照群が 2 6 日の平均生存期間を有したのに対して、治療群は 5 7 日の生存期間を有したことを示した。(図 1 2 のパネル D。) 2 つの群からの P B M C のフローサイトメトリ分析は、治療群がほぼ 1 0 0 % の抗原喪失を有したことを明らかにし (図 1 2 のパネル E)、これは、治療が抗原陽性 F 7 7 9 細胞の枯渇を媒介するのに有効であったことを示している。注目すべきことに、F 7 7 9 細胞は悪性であり、したがって急速に増殖する。このことは、病原性 B 細胞が正常な増殖能力を有する診療所の症例には当てはまらない。更に、抗原喪失は患者において問題ではない。自己抗原が病原性 B 細胞上で失われた場合、それはもはや病原性ではない。本願発明者らは、より低い用量の治療を用いて実験を繰り返して、完全応答に必要な用量の下限を決定することができる。

20

30

【0175】

非限定的で例示的な戦略

疾患の異なるマウスモデルにおいて、抗 D s g 3 B 細胞の死滅を媒介する D s g 3 - F c 融合タンパク質の能力を更に試験すること。

【0176】

受動導入モデル。このモデルでは、本願発明者らは、確立された天疱瘡誘導性ハイブリドーマ細胞株 (A K 2 3、既に所有) を移植することによって、受動モノクローナル天疱瘡マウス疾患モデルを開発することができる。確立されたように²⁴、²⁵、本願発明者らは、天疱瘡表現型を引き起こす抗 D s g 3 抗体を分泌する約 1 0 0 万個の A K 2 3 ハイブリドーマ細胞を N S G マウスに注射する²⁴、²⁵。動物は、全ての実験において、u r n 無作為化法に基づいて治療／対照群に割り当てられる。本願発明者らは、血清抗 D s g 3 力価 (3 日目及び 1 0 日目に標準的な E L I S A によって)、及び皮膚疱疹 (2 日目、5 日目及び 1 0 日目に盲検化された研究者によって評価される) を分析することによって疾患の確立について試験する。E L I S A データに基づいて、棘細胞離開を観察するために (H & E 染色によって) 組織採取の時点を決める。ピーク疾患時間は、約 7 日目であると予想される²⁴；本願発明者らは、マウスが、脱毛²⁴、体重減少を示し、かつ、生理的抗 D s g 3 I g G レベル (3 0 0 ~ 4 0 0 R U / m l) で表皮ケラチノサイトに結合する A K 2 3 細胞によって産生される A K 2 3 自己抗体を伴って、毛包及び口腔粘膜に水疱形成を有すると予想する²⁶。

40

【0177】

50

能動導入モデル。AK23モデルは、読み出しが容易であるなどの利点を有するが、治療は、急速に増殖するハイブリドーマ細胞に打ち勝つことができる。したがって、第2のモデルとして、本願発明者らは、ヒト疾患の臨床表現型を模倣し、臨床的に起こるものに類似する自己反応性Dsg3特異的B細胞の頻度が低く、最終的に高い血清ポリクローナル自己抗体レベルを有する、能動PV免疫モデルを使用する。このモデルでは、本願発明者らは、まず、Dsg3-/-マウス(JAX-002911)をマウスDsg3の組換え細胞外ドメインで免疫付与し、続いて脾細胞をRAG2-/-マウスに導入することによって、能動ポリクローナル天疱瘡マウス疾患モデルを開発することができる^{27、28}。導入された細胞は、Dsg3反応性細胞を含むT細胞及びB細胞を含有する。文献²⁷~²⁹においてなされた観察と同様に、本願発明者らは、動物が抑制された成長を有し、基底上の棘細胞離開及び水疱を伴う皮膚粘膜びらんを発症すると予想する。臨床指標を評価するために、ELISAを使用して、本願発明者らは、自己抗体レベルをPV患者における生理学的レベル(300~400RU/ml)と比較する²⁶。Dsg3反応性抗体が、3~4週間で起こると予想されるそのレベル以上になったら^{26、30}、治療を開始する。Dsg3免疫付与Dsg3+/-動物由来の細胞の養子導入を対照として使用する²⁹(n=10匹のマウス/群)。

10

20

30

40

【0178】

イヌにおける自己反応性B細胞の枯渇を媒介する抗原-Fc融合タンパク質の能力を試験すること。イヌ、ネコ及びウマは、ヒトと同様の病因を有する天疱瘡を発症する^{31~37}。天疱瘡は、獣医学において診断される最も一般的な自己免疫皮膚疾患であり、それに対する治療法は存在せず、予後は不良のままである^{31~37}。イヌ天疱瘡における一般的な自己抗原は、Dsg3(尋常性天疱瘡)及びDsc1(デスモコリン-1、落葉状天疱瘡(pemphigus foliaceus、PF))である^{31、38~41}。

【0179】

イヌにおける天疱瘡は、デスモソームタンパク質に対する自己反応性のために発生し、ヒトと類似の表現型を有するため、イヌモデルは、前臨床試験とヒト試験との間の橋渡しとして役立ち得る。本願発明者らの標的化治療の能力を更に評価し、臨床的解釈のための段階を設定するために、本願発明者らは、マウスにおいて本願発明者らの予備試験アプローチを使用して、天疱瘡と診断されたイヌを治療する。本願発明者らは、ヒトIgG1と等価であるイヌIgG1と融合したイヌDsg3及びDsg1を使用して、類似の構築物を作製する⁴²。このようなタンパク質の産生は、現在本願発明者らの研究室では簡単であり、大量のこれらのタンパク質を作製する際に障害がないと予想される。治療の最初の3ヶ月間の病変及び循環中の自己抗体力価の改善を注意深く評価する。

【0180】

成功した完了により、アプローチの臨床的解釈のための段階を設定することができる。本明細書に記載の組成物及び方法は、天疱瘡の治療を変えるだけでなく、他の自己免疫性水疱症(例えば、落葉状天疱瘡、水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状IgA水疱性皮膚症)、狼瘡、乾癬、強皮症、グッドパスチャー病、グレーブス病のサブタイプから免疫介在性血管炎に及ぶ既知の抗原標的に対するいくつかの自己抗体/免疫複合体媒介性疾患の治療を開発するための道を開くことができる。代替として、本願発明者らは、臨床で利用可能な二重特異性T細胞エンゲージャ治療薬と同様に、T細胞を標的化細胞に結合させるために、抗原抗CD3抗体(抗CD3 scFv抗体に融合したDsg3)の融合体を作製した。本願発明者らは、天疱瘡のための標的化療法を開発しているが、本明細書に記載される組成物及び方法は、自己免疫疾患のための治療ツールボックスであり得る。

【0181】

本実施例で引用されている参考文献

1. Regezi JA, Sciubba J, Jordan RC. Oral pathology: clinical pathologic correlations. Elsevier Health Sciences; 2016.

2. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. Pemphigus. Nat Rev Dis Primers. 2017 May 11;3:17026. PMID: PMC5901732

10

3. Murrell DF, Peña S, Joly P, Marinovic B, Hashimoto T, Diaz LA, Sinha AA, Payne AS, Daneshpazhooh M, Eming R, Jonkman MF, Mimouni D, Borradori L, Kim S-C, Yamagami J, Lehman JS, Saleh MA, Culton DA, Czernik A, Zane JJ, Fivenson D, Ujiie H,

20

30

40

50

Wozniak K, Akman-Karakaş A, Bernard P, Korman NJ, Caux F, Drenovska K, Prost-Squarcioni C, Vassileva S, Feldman RJ, Cardones AR, Bauer J, Ioannides D, Jedlickova H, Palisson F, Patsatsi A, Uzun S, Yayli S, Zillikens D, Amagai M, Hertl M, Schmidt E, Aoki V, Grando SA, Shimizu H, Baum S, Cianchini G, Feliciani C, Iranzo P, Mascaró JM, Kowalewski C, Hall R, Groves R, Harman KE, Marinkovich MP, Maverakis E, Werth VP. Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol*. 2020 Mar;82(3):575-585.e1. PMID: PMC7313440

10

4. Mascaró JM, España A, Liu Z, Ding X, Swartz SJ, Fairley JA, Diaz LA. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 Oct;85(1):90–96. PMID: 9325074

5. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med*. 1982 May 20;306(20):1189–1196. PMID: 7040962

20

6. Furue M, Kadono T. Pemphigus, a pathomechanism of acantholysis. *Australas J Dermatol*. 2017 Aug;58(3):171–173. PMID: 28211055

7. Ahmed AR, Moy R. Death in pemphigus. *J Am Acad Dermatol*. 1982 Aug;7(2):221–228. PMID: 7130483

30

8. Tavakolpour S, Mahmoudi H, Balighi K, Abedini R, Daneshpazhooh M. Sixteen-year history of rituximab therapy for 1085 pemphigus vulgaris patients: A systematic review. *Int Immunopharmacol*. 2018 Jan;54:131–138. PMID: 29132070

9. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, Caillot F, Golinski ML, Labeille B, Picard-Dahan C, Paul C, Richard M-A, Bouaziz JD, Duvert-Lehembre S, Bernard P, Caux F, Alexandre M, Ingen-Housz-Oro S, Vabres P, Delaporte E,

40

Quereux G, Dupuy A, Debarbieux S, Avenel-Audran M, D’Incan M, Bedane C, Bénéton N, Jullien D, Dupin N, Misery L, Machet L, Beylot-Barry M, Dereure O, Sassolas B, Vermeulin T, Benichou J, Musette P, French study group on autoimmune bullous skin diseases. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet*. 2017 May 20;389(10083):2031–2040. PMID: 28342637

10

10. Kushner CJ, Wang S, Tovanabutra N, Tsai DE, Werth VP, Payne AS. Factors Associated With Complete Remission After Rituximab Therapy for Pemphigus. *JAMA Dermatol*. 2019 Dec 1;155(12):1404.

11. Wang H-H, Liu C-W, Li Y-C, Huang Y-C. Efficacy of rituximab for pemphigus: a systematic review and meta-analysis of different regimens. *Acta Derm Venereol*. 2015 Nov;95(8):928–932. PMID: 25881672

20

12. Mahmoudi H, Balighi K, Tavakolpour S, Daneshpazhooh M. Unexpected worsening of pemphigus vulgaris after rituximab: A report of three cases. *Int Immunopharmacol*. 2019 Jun;71:40–42. PMID: 30877872

13. Esensten JH, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Regulatory T-cell therapy for autoimmune and autoinflammatory diseases: The next frontier. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Dec;142(6):1710–1718. PMID: 30367909

30

14. Ellebrecht CT, Bhoj VG, Nace A, Choi EJ, Mao X, Cho MJ, Di Zenzo G, Lanzavecchia A, Seykora JT, Cotsarelis G, Milone MC, Payne AS. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science*. 2016 Jul 8;353(6295):179–184. PMCID: PMC5343513

40

15. Wertenteil S, Garg A, Strunk A, Alloo A. Prevalence Estimates for Pemphigus in the United States: A Sex- and Age-Adjusted Population Analysis. *JAMA Dermatol.* 2019 May 1;155(5):627–629. PMCID: PMC6506879
16. Wei EX, Li SJ, Mostaghimi A. Post-traumatic stress disorder in patients with autoimmune blistering diseases. *Br J Dermatol.* 2020 Apr;182(4):1044–1045. PMID: 31545508 10
17. Vodo D, Sarig O, Sprecher E. The Genetics of Pemphigus Vulgaris. *Front Med.* 2018 Aug 14;5:226.
18. Ohyama B, Nishifuji K, Chan PT, Kawaguchi A, Yamashita T, Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Koga H, Tsuruta D, Amagai M, Hashimoto T. Epitope spreading is rarely found in pemphigus vulgaris by large-scale longitudinal study using desmoglein 2-based swapped molecules. *J Invest Dermatol.* 2012 Apr;132(4):1158–1168. PMID: 22277941 20
19. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 2012 Jun 14;119(24):5640–5649. PMID: 22535666
20. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520. PMCID: PMC4202688 30
21. Yu J, Song Y, Tian W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *J Hematol Oncol.* 2020 May 5;13(1):45. PMCID: PMC7201658
22. Cong M, Tavakolpour S, Berland L, Glöckner H, Andreiuk B, Rakhshandehroo T, Uslu S, Mishra S, Clark L, Rashidian M. Direct N- or C-Terminal Protein Labeling Via a Sortase-Mediated Swapping Approach. *Bioconjug Chem.* 2021 Nov 17;32(11):2397–2406. PMID: 34748323 40

23. Guimaraes CP, Witte MD, Theile CS, Bozkurt G, Kundrat L, Blom AEM, Ploegh HL. Site-specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions. *Nat Protoc.* 2013 Sep;8(9):1787–1799. PMID: 23989673
24. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol.* 2003 Feb 15;170(4):2170–2178. PMID: 12574390 10
25. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, Saito H, Oka H, Tsunoda K, Amagai M, Nishikawa T. *In vivo* ultrastructural localization of the desmoglein 3 adhesive interface to the desmosome mid-line. *J Invest Dermatol.* 2005 May;124(5):984–989. PMID: 15854040 20
26. Schmidt E, Dähnrich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stöcker W, Hashimoto T, Bröcker E-B, Recke A, Rose C, Zillikens D. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol.* 2010 May;19(5):458–463. PMID: 20163452
27. Takae Y, Nishikawa T, Amagai M. Pemphigus mouse model as a tool to evaluate various immunosuppressive therapies. *Exp Dermatol.* 2009 Mar;18(3):252–260. PMID: 18643850 30
28. Aoki-Ota M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Koyasu S, Amagai M, Nishikawa T. A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. *Br J Dermatol.* 2004 Aug;151(2):346–354. PMID: 15327541 40

29. Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest.* 2000 Mar;105(5):625–631. PMCID: PMC292455
30. Lee J, Lundgren DK, Mao X, Manfredo-Vieira S, Nunez-Cruz S, Williams EF, Assenmacher C-A, Radaelli E, Oh S, Wang B, Ellebrecht CT, Fraietta JA, Milone MC, Payne AS. Antigen-specific B cell depletion for precision therapy of mucosal pemphigus vulgaris. *J Clin Invest.* 2020 Dec 1;130(12):6317–6324. PMCID: PMC7685721 10
31. Tham HL, Linder KE, Olivry T. Deep pemphigus (pemphigus vulgaris, pemphigus vegetans and paraneoplastic pemphigus) in dogs, cats and horses: a comprehensive review. *BMC Vet Res.* 2020 Dec;16(1):457.
32. Mueller RS, Krebs I, Power HT, Fieseler KV. Pemphigus foliaceus in 91 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2006 Jun;42(3):189–196. PMID: 16611930 20
33. Levy BJ, Mamo LB, Bizikova P. Detection of circulating anti-keratinocyte autoantibodies in feline pemphigus foliaceus. *Vet Dermatol.* 2020 Oct;31(5):378-e100. PMID: 32372490
34. Preziosi DE. Feline Pemphigus Foliaceus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2019 Jan;49(1):95–104. PMID: 30227972 30
35. Vandenabeele SIJ, White SD, Affolter VK, Kass PH, Ihrke PJ. Pemphigus foliaceus in the horse: a retrospective study of 20 cases. *Vet Dermatol.* 2004 Dec;15(6):381–388. PMID: 15585014
36. Zabel S, Mueller RS, Fieseler KV, Bettenay SV, Littlewood JD, Wagner R. Review of 15 cases of pemphigus foliaceus in horses and a survey of the literature. *Vet Rec.* 2005 Oct 22;157(17):505–509. PMID: 16244232 40

37. Goodale E. Pemphigus foliaceus. Can Vet J. 2019 Mar;60(3):311–313. PMCID: PMC6380263
38. Olivry T, LaVoy A, Dunston SM, Brown RS, Lennon EM, Warren SJ, Prisayanh P, Müller EJ, Suter MM, Dean GA. Desmoglein-1 is a minor autoantigen in dogs with pemphigus foliaceus. Vet Immunol Immunopathol. 2006 Apr 15;110(3–4):245–255. PMID: 16293316 10
39. Bosch-Amate X, Iranzo P, Ivars M, Mascaró Galy JM, España A. Anti-Desmocollin Autoantibodies in Autoimmune Blistering Diseases. Front Immunol. 2021 Sep 10;12:740820.
40. Bizikova P, Dean GA, Hashimoto T, Olivry T. Cloning and establishment of canine desmocollin-1 as a major autoantigen in canine pemphigus foliaceus. Vet Immunol Immunopathol. 2012 Oct 15;149(3–4):197–207. PMID: 22884397 20
41. Bizikova P, Linder KE, Olivry T. Immunomapping of desmosomal and nondesmosomal adhesion molecules in healthy canine footpad, haired skin and buccal mucosal epithelia: comparison with canine pemphigus foliaceus serum immunoglobulin G staining patterns. Vet Dermatol. 2011 Apr;22(2):132–142. PMID: 20738839 30
42. Miyakawa S, Nomura Y, Sakamoto T, Yamaguchi Y, Kato K, Yamazaki S, Nakamura Y. Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G. RNA. 2008 Jun;14(6):1154–1163. PMCID: PMC2390795

【 0 1 8 2 】

実施例 4

m D s g 3 (E C 1 3) – m F c (配列番号 1) :

40

EWVKFAKPCREREDNSRRNPIAKITSDFQKNQKITYRISGVGIDQPPFGIFVVDPNNGDIN
ITAIVDREETPSFLITCRALNALGQDVERPLILTVKILDVNDNPPIFSQTIFKGEIEENSASNS
LVMILNATDADEPNHMNSKIAFKIVSQEPAGMSMFLISRNTGEVRTLTSSLDREQISSYH
LVVSGADNDGTGLSTQCECSIKIKDVNDNFPVLRESQYSARIEENTLNAELLRFQVTDW
DEEYTDNWLAVYFFTSNGNEGNWFEIETDPRTNEGILKVVKALDYEQVQSMQFSIAVRN
KAEFHQSVISQYRVQSTPVTIQVIDVREGIS-GGGGSGGS-
EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS
WVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK
NTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK-
GGGGSGGGGSDYKDDDDKLPETGGHHHHHH

10

h D s g 3 (E C 1 3) - h F c (配列番号 2) :

EWVKFAKPCREGEDNSKRNPPIAKITSQATQKITYRISGVGIDQPPFGIFVVDKNTGDIN
ITAIVDREETPSFLITCRALNAQGLDVEKPLILTVKILDINDNPPVFSQQIFMGEIEENSASN
SLVMILNATDADEPNHLNSKIAFKIVSQEPAGTPMFLLSRNTGEVRTLTNSLDREQASSY
RLVVSGADKDGEGLSTQCECNKVKDVNDNFPVFRDSQYSARIEENILSSELLRFQVTDL
DEEYTDNWLAVYFFTSNGNEGNWFEIQTDPRTNEGILKVVKALDYEQLQSVKLSIAVKNK
AEFHQSVISRYRVQSTPVTIQVINVREGIA-GGGGS-
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK-
GGGGSDYKDDDDKLPETGGHHHHHH

20

m D s g 3 (E C 1 4) - m F c (配列番号 3)

EWVKFAKPCREREDNSRRNPIAKITSDFQKNQKITYRISGVGIDQPPFGIFVVDPNNGDIN
ITAIVDREETPSFLITCRALNALGQDVERPLILTVKILDVNDNPPIFSQTIFKGEIEENSASNS
LVMILNATDADEPNHMNSKIAFKIVSQEPAGMSMFLISRNTGEVRTLTSSLDREQISSYH
LVVSGADNDGTGLSTQCECSIKIKDVNDNFPVLRESQYSARIEENTLNAELLRFQVTDW
DEEYTDNWLAVYFFTSNGNEGNWFEIETDPRTNEGILKVVKALDYEQVQSMQFSIAVRN
KAEFHQSVISQYRVQSTPVTIQVIDVREGISFRPPSKTFTVQRGVSTNKLVGYLGTQAT
DEDTGKAASSVRYVLGRNDGGLVIDSKTAQIKFVKNIIRDSTFIVNKTISAEVLAIEN
TGKTSTGTIYVEVPSFNENGSPTIKPSPPSKSPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTC
VVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEF
KCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY
VEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNH
HTTKSFSRTPGKEFDYKDDDDKGS LPETGGHHHHHH

30

h D s g 3 (E C 1 4) - h F c (配列番号 4)

40

50

EWVKFAKPCREGEDNSKRNP IAKITSDYQATQKITYRISGVGIDQPPFGIFVVDKNTGDIN
ITAIVDREETPSFLITCRALNAQGLDVEKPLILTVKILDINDNPPVFSQQIFMGEIEENSASN
SLVMILNATDADEPNHLNSKIAFKIVSQEPAGTPMFLLSRNTGEVRTLTNSLDREQASSY
RLVVSGADKDGELSTQCECNIVKDVNDNFP MFRDSQYSARIEENILSSELLRFQVTDL
DEEYTDNWLAVYFFTSGNEGNWFEIQTDPR TNEGILKVVKALDYEQLQSVKLSIAVKNK
AEFHQSVISRYRVQSTPVTIQVINVREGIAFRPASKTFTVQKGISSKKLVDYILGTYQAIDE
DTNKAASN VKYVMGRNDGGYLMIDSKTAEIKFVKNMNRDSTFIVNKTITAEVLAIDEYT
GKTSTGTVYVRVPDFNDNGGGGSEPKSADK THTSPPAPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGFDYKDDDDKLPETGHHHHHH

10

h D s g 3 (E C 1 - 5) - h F c (配 列 番 号 2 9)

EWVKFAKPCREREDNSRRNP IAKITSDFQKNQKITYRISGVGIDQPPFGIFVVDPNNGDIN
ITAIVDREETPSFLITCRALNALGQDVERPLILTVKILDVNDNPPIFSQTIFKGEIEENSASNS
LVMILNATDADEPNHMSKIAFKIVSQEPAGMSMFLISRNTGEVRTLTSSLDREQISSYH
LVVSGADNDGTGLSTQCECSI KIKDVNDNFPVLRESQYSARIEENTLNAELLRFQVTDW
DEEYTDNWLAVYFFTSGNEGNWFEIETDPRTNEGILKVVKALDYEQVQSMQFSIAVRN
KAEFHQSVISQYRVQSTPVTIQVIDVREGISFRPPSKTFTVQRGVSTNKL VGYILGTYQAT
DEDTGKAASSVRYVLGRNDGGLLVIDSKTAQIKFVK NIDRDSTFIVNKTISA EVLAIDEN
TGKTSTGTIYVEVPSFNENCPSVVLEKKDICTSSPSVTL SVRTLDRGKYTG PYTVSLEEQP
LKLPMWMTITTLNATSALLQAQQQVSPGVYNVPVIVKDNQDGLCDTPESLTLTV CQCD
DRSMCRAPIPSREPNTYEF GSEPKSADKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSDYKDDDDKLPETGHHHHHH

20

m D s g 3 (E C 1 - 5) - m F c (配 列 番 号 3 0)

EWVKFAKPCREREDNSRRNP IAKITSDFQKNQKITYRISGVGIDQPPFGIFVVDPNNGDIN
ITAIVDREETPSFLITCRALNALGQDVERPLILTVKILDVNDNPPIFSQTIFKGEIEENSASNS
LVMILNATDADEPNHMSKIAFKIVSQEPAGMSMFLISRNTGEVRTLTSSLDREQISSYH
LVVSGADNDGTGLSTQCECSI KIKDVNDNFPVLRESQYSARIEENTLNAELLRFQVTDW
DEEYTDNWLAVYFFTSGNEGNWFEIETDPRTNEGILKVVKALDYEQVQSMQFSIAVRN
KAEFHQSVISQYRVQSTPVTIQVIDVREGISFRPPSKTFTVQRGVSTNKL VGYILGTYQAT
DEDTGKAASSVRYVLGRNDGGLLVIDSKTAQIKFVK NIDRDSTFIVNKTISA EVLAIDEN
TGKTSTGTIYVEVPSFNENCPSVVLEKKDICTSSPSVTL SVRTLDRGKYTG PYTVSLEEQP
LKLPMWMTITTLNATSALLQAQQQVSPGVYNVPVIVKDNQDGLCDTPESLTLTV CQCD
DRSMCRAPIPSREPNTYEF GSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSP
IVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQT HREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMS
GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMV TDFMP
EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMY SKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEG
LHNHHTTKSFSRTPGKGSDYKDDDDKLPETGHHHHHH

30

40

h D s g 1 (E C 1 - 4) - h F c (配 列 番 号 3 1)

50

EWIKFAAACREGEDNSKRNP IAKIHSDCAANQQV TYRISGVGIDQPPY GIFVINQKTGEIN
ITSIVDREVT PFFIIYCRALNSMGQDLERPLELRVRVLDINDNPPVFSMATFAGQIEENSN
ANTLVMILNATDADEPNNLNSKIAFKIIRQE PSDSPMFIINRNTGEIRTMNNFLDREQY GQ
YALAVRGSDRDGGADGMSAECECN IKILDVNDNIPYMEQSSYTIEIQENTLNSNLL EIRVI
DLDEEFSANWMAV IFFISGNEGNWFEIEMNERTNVGILKVVKPLDYEAMQSLQLSIGVR
NKA EFHHSIMSQYK LKAS AISVTVLNVIEGPVFRPGSKTYVVTGNMG SNDKVGDFVAT
DLDTGR PSTTVRYVMGNNPADLLAVDSRTGKLT LKNKVTKEQYNMLGGKYQG TILSID
DNLQRTCTGTININIQSFGNDDGSEPKSCDKTHTCPPCSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTP E VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEFDYKDDDDKGSLPETGGHHHHHH

10

m D s g 1 (E C 1 - 4) - m F c (配列番号 3 2)

EWIKFAAACREGEDNSKRNP IAKIHSDCAANQP VTYRISGVGIDQPPY GIFIINQKTGEINI
TSIVDREVT PFFIIYCRALNAQGGQDLENPLELRVRVMDINDNPPVFSMTTFLGQIEENSNA
NTLVMKLNATDADEPNNLNSMIAFKIIRQE PSDSPMFIINRKTGEIRTMNNFLDREQYSQ
YSLVVRGSDRDGGADGMSAESECSITILDVNDNIPYLEQSSYDIEIEENALHSQ L VQIRVI
DLDEEFS DNWKAI IFFISGNEGNWFEIEMNERTNVGTLKVVKPLDYEAMKNLQLSIGVR
NVAEFHQSIISQYRLTATMVTVTVLNVIEGSVFRPGSKTFVVD SRMEANHRVGEFVATD
LDTGRASTNVRYEMGNNPENLLVVD SRTGIITLRNRVTMEQYQRLNGEYKGT VLSIDDS
LQRTCTGTIVIELSGTGWVPGSGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI
SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QD
WMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT
DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMY SKLRVEKKNWVERNSYSCSV
VHEGLHNHHTTKSFSRTPGKEFDYKDDDDKGSLPETGGHHHHHH

20

【 0 1 8 3 】

ヒト D s g 3 アミノ酸配列 (配列番号 5)

30

40

50

10	20	30	40	50
MMGLFPRTTG	ALAI FVVVIL	VHGELRIETK	GQYDEEEMTM	QQAHRQKRE
60	70	80	90	100
WVAFAPCORE	GEDNSERNPI	AKITSDYQAT	QKITYRISGV	GIDQPPFGIF
110	120	130	140	150
VVDKNTGDIN	ITAIVDREET	ESFLITCRAL	NAQGGLDVERP	LILTVKILDI
160	170	180	190	200
NDNPPVFSQQ	IFMGEIEENS	ASNSLVMILN	ATDADEPNHL	NSKIAFKIVS
210	220	230	240	250
QEPAGTFMFL	LSRNTGEVBT	LTNSLDREQA	SSYRLVVSQA	DEKGEGLSTQ
260	270	280	290	300
CECNIVKVDV	NDNFPMFRDS	QYSARIEENI	LSSELLRAFQV	EDLDEEYTDN
310	320	330	340	350
WLAVYFFTSG	NEGNWFETQT	DFRTNEGILK	VVKALDYEQL	QSVKLSIAVK
360	370	380	390	400
NKAEFHQSVI	SRYRVQSTPV	TIQVINVREG	IAFRPASRTF	TVQKGISKK
410	420	430	440	450
LVDYILGTQY	AIDEDTNKAA	SNVKYVMGRN	DGGYLMIDSK	TAEIKFVKNM
460	470	480	490	500
NRDSTFIVNK	TITAEVLAIQ	EYFGKTSSTGT	VYVRVPDFND	NOPTAVLEKD
510	520	530	540	550
AVCSSSPSVV	VSARTLNNRY	TGPYTFALD	QFVKLPVWS	ITTLNATSAL
560	570	580	590	600
LRADQEIPEP	VYHISLVLTQ	QQNNRCMPR	SLTLEVCCQD	NRGICGTSYP
610	620	630	640	650
TTSEPGTRYGR	PHSGRLGPAA	IGLLLLGLLL	LLLAPLLLLT	CDCGAGSTGG
660	670	680	690	700
VTGGFIPVFD	GSEGTIHQWG	IEGAHPEDKE	ITNICVPPVT	ANGADFMES
710	720	730	740	750
EVCNTYARG	TAVEGTSGME	MTFKLGAATE	SGGAAGEATG	TVSGAASGFG
760	770	780	790	800
AAFGVGICSS	QSGGTMRTRH	STGGTNKDYA	DGAISMNFLD	SYFSQKAFAC
810	820	830	840	850
AEEDDGQEAN	DCLLIYDNEG	ADATGSPVGS	VGCCSFIADD	LDDGFLDSLQ
860	870	880	890	900
PKFKKLAEIS	LGVDGEGKEV	QPPSKDSGYG	IESCGHPFIEV	QQTGFVKCQT
910	920	930	940	950
LSGSQGAAL	STSGSVQPAV	SIEDPLQNGN	YLVFTETYSAS	GSLVQPSLAG
960	970	980	990	
FDPILLTQNV	VTERTVICPIS	SVPGNLGAPT	QLRGSHTMLC	TEDPCSRLI

10

20

30

40

50

【0184】

ヒトDs g1 アミノ酸配列、アイソフォーム1 (配列番号6)

10	20	30	40	50
MMGLFFRTTG	ALAIFFVVIL	VHGELRIETK	QYDEEEMTM	QOAKRRQKKE
60	70	80	90	100
WVKFAKPCRE	GEDN3ERNPI	AKITSDYQAT	QKITYRISGV	GIDQPPEGIF
110	120	130	140	150
VVDKNTGDIN	ITAIVDREET	PSFLITCRAL	NAQGLDVEKP	LILTVKILDI
160	170	180	190	200
NDNPPVFSQQ	IFMGEIEENS	ASNSLVMIIN	ATDADEFNHL	NSKIAFKIVS
210	220	230	240	250
QEPAGTPMFL	LSRNTGEVRT	LTNSLDREQA	SSYRLVVSGA	DKDGEGLSTQ
260	270	280	290	300
CECNKVKDV	NDNPPMFRDS	QYSARIEENI	LSSELLRFQV	TDLDEEYTDN
310	320	330	340	350
NLAVYFFTSQ	NEGNWFIEQT	DPRTNEGILK	VVKALDYEQL	QSVKLSIAVK
360	370	380	390	400
NKAEFHQSVI	SRYRVQSTPV	TIQVINVREG	IAFRPASSTF	TVQKGLISSKE
410	420	430	440	450
LVDYILGTYQ	AIDEDTNKAA	SNVKYVMGRN	DGGYLMIDSK	TAEIKFVKNM
460	470	480	490	500
NRDSTFIVNK	TITAEVLAIQ	EYTGKTSSTGT	VYVRVPDFND	NCPTAVLEKD
510	520	530	540	550
AVCSSSPSVV	VSARTLNTRY	TGPYTFALD	QPVKLEAVWS	ITTLNATSAL
560	570	580	590	600
LRAQEQIPPG	VYHISLVLTQ	SONNRCEMPR	SLFLEVCCQD	NRGICGTSYP
610	620	630	640	650
TTSPGTRYGR	PHSGRLGPAA	IGLLLLLGLL	LLAPLLLLLT	CDCGAGSTGC
660	670	680	690	700
VTGGFIPVPD	GSEGTIHQWG	IEGAHPEDKE	ITNICVPPVT	ANGADFMESS
710	720	730	740	750
EVCTNTYARG	TAVEGTSFME	MTTELGAATE	SGGAAGFATG	TVSGAA3GFG
760	770	780	790	800
AATGVGICSS	GQSGTMRTRH	STGGTNKDYA	DGAISMNFDL	SYFSQKAFAC
810	820	830	840	850
AEEDDGQEAN	DCLLIYDNEG	ADATGSSFVGS	VGCCSFIADD	LDDSFLD3LG
860	870	880	890	900
PKFKKLAEIS	LGVDGEGKEV	QPF8KDSGYG	IESCGHPFIEV	QQTGFVQCQT
910	920	930	940	950
LEGSQOGASAL	STSGSVQPAV	SIPDPLQNGN	YLVTETYSAS	GSLVQFSTAG
960	970	980	990	
FDFLLTQNV	VTERRVICPIS	SVPGNLGAPT	QLRGSHTMLC	TEDFCSRLI

10

20

30

40

50

【0185】

ヒトDs g 1 アミノ酸配列、アイソフォーム 2 (配列番号 7)

```

      10      20      30      40      50
MQDLGGGERM TGFELTEGVK TSGMFEICQE YSGTLARNSM RECREGGLNM
      60      70      80      90     100
NFMESYFCQK AYAYADEDEG RPSNDCLLIY DIEGVGSPAG SVGCCSFIGE
     110     120     130     140     150
DLDDSFIDLTL GPKFKRLADI SLGKESYFDL DPSWPPQSTE PVCLPQETEF
     160     170     180     190     200
VVSGHPPISF HFGTTTWISE STYPSGFGVL HPEPILDELG YGNVTVTESY
     210     220     230     240     250
TTSDDLKPSV HVHDNRPASN VVVTERVVGP ISGADLHGML EMPDLRDGSN
     260     270     280     290     300
VIVTERVIAP SSSLPTSLTI HHFRESSNVV VTERVIQPTS GMIGSLSMHF
     310     320     330     340     350
ELANAHNVIV TERVVSGAGV TGISGTGIGS GGIGSSGLVG TSMGAGSGAL
     360     370     380     390     400
SGAGISGGGI GLSSLGCTAS IGHMRSSSDH HFNQTIGSAS PSTARSRITK

YSTVQYSK

```

10

20

30

40

50

【0186】

実施例 5

尋常性天疱瘡（P V）

- － 破壊的な慢性自己免疫疾患は、皮膚及び粘膜の痛みを伴う水疱形成を特徴とし得る
- － 約 5 ～ 15 % の死亡率で生命を脅かす可能性がある治療しなければ、1 年以内に 10 名のうち 8 名が死亡する
- － 米国有病率：30,000 ～ 40,000 症例、WW 発生率 1 ～ 10 症例 / 100 万人
- － 通常は遺伝的ではなく、後年に環境因子によって誘発される
- － B 細胞上に提示される、デスモグレイン 3（Dsg3）に対する自己 Ab の産生によって引き起こされる
- － Dsg3 は、脊椎動物上皮細胞におけるデスモソームのカルシウム結合膜貫通糖タンパク質成分である
- － デスモソームは、上皮、心筋、及び特定の他の細胞型の間の細胞間接合である
- － 不治
- － 治療戦略
- － 全身性ステロイド使用及び／又は免疫抑制薬
- － 抗 CD20 抗体（例えば、リツキシマブ）は、ファーストラインの選択肢である（全ての B 細胞を標的とする）
- － 感染症のリスクの増加を含むオフターゲット免疫抑制効果
- － 治療後の再発のリスクが高い
- － B 細胞枯渇を示す抗 Dsg3：
- － Cabalatta Bio：キメラ自己抗体受容体 T 細胞（Chimeric AutoAntibody Receptor T-Cells、CAAR-T）に基づく潜在的な治療－IND クリア
- － 追加の新しい戦略が必要である

【0187】

抗 Dsg3－Ab 提示 B 細胞の選択的枯渇－2 つの非限定的で例示的なアプローチ

A) 「Fc 媒介性」

- － リツキシマブと同様であるが、ここでは Dsg3－B 細胞に対して選択的である（より安全／より少ない副反応）
- － CAAR-T（自己細胞療法）の技術的課題／コストを回避する

B) 「BCR－T 細胞エンゲージャを含む、BCR－エフェクター細胞エンゲージャ」

- － 選択的
- － 多目的－既知の抗原性標的に対する自己抗体／免疫複合体媒介性疾患
- － 水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状 I g A 水疱性皮膚症
- － 狼瘡、強皮症、グッドパスチャー病、グレーブス病のサブタイプ
- － マウスマクロファージのマウス F c γ 受容体に対する D s g 3－F c 融合体のインビトロ結合、及び 48 時間での標的 B 細胞の 94 % の死滅を示す (10 nM 当たり)
- － マウスタンパク質構築物を産生するために作製された細胞株は、インビボモデルで作用している
- － D s g 3 タンパク質に対する自己反応性 B 細胞を有する P V 患者由来の末梢血単核細胞 (P B M C) に対するインビトロ効果を示すことができる (異なる疾患期)

10

【0188】

本明細書に記載される主題の非限定的な例

- － F c－D s g 3 融合構築物配列
- － P V の治療

【0189】

実施例 6

治療用部分、イメージング部分、捕捉部分、又はそれらの組み合わせの結合のための非限定的で例示的な方法

特定の実施形態では、ソルターゼ技術を使用して、目的の任意の生体分子をタンパク質の C 末端に部位特異的に結合することができる。特定の臨床実施形態では、目的の生体分子は、例えば、遊離システインとのマレイミド反応、又はリジン側鎖の遊離アミンとの N H S 活性基を介して、同様に非特異的に結合することができる。

20

【0190】

特定の実施形態は、単一の融合タンパク質上に複数の抗原を含み得る。ある実施形態は、ノブ－イントゥーホール F c を含む。一実施形態では、抗原がホール上に配置され、第 2 の抗原がノブ上に配置される。このような実施形態は、1 つの薬物中に 2 つの主要な抗原を含めることを可能にする。例として、複数の実施形態は、D s g 3－ノブ及び D s g 1－ホールを含むことができ、逆もまた同様である。複数の実施形態は、例えば、これらの治療薬に含まれる抗原として、D s g 1 又は D s g 3 の特異的細胞外 (E C) ドメインを含み得る。このような実施形態は、天疱瘡患者の治療に有用であり得る。

30

【0191】

種々の実施形態は、自己免疫障害の治療に利用され得る

例示的な自己免疫障害は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 7, 332, 168 号に提供される。自己免疫障害の非限定的な例を (特定の治療用構築物における使用に適した例示的な自己抗原と共に) 以下に提供する。

腫瘍随伴性天疱瘡 (主にプラキン (エンボプラキン、ペリプラキン、デスモプラキン I、デスモプラキン I I、エピプラキン、プレクチン、B P 230)、カドヘリン (D s g 3、D s g 1、D s c 1、D s c 2、D s c 3)、α 2－マクログロブリン様分子に対する I g G A b)

I g A 天疱瘡: D s g 1、D s g 3、D s c 1、D s c 2、D s c 3 に対する I g A

40

増殖性天疱瘡: D s g 3、D s g 1、D s c 3 に対する I g G

紅斑性天疱瘡: I g G D s g 1

天疱瘡ヘルペティフォルミス: I g G D s g 1、D s g 3、D s c 1、D s c 3

薬剤誘発性天疱瘡: I g G D s g 1、D s g 3

水疱性類天疱瘡: B P 180 (N C 16 A ドメイン)、B P 230 に対する抗 I g G

扁平苔癬天疱瘡: B P 180 (N C 16 A) ドメイン、B P 230 に対する I g G

産後類天疱瘡: B P 180 に対する抗 I g G (N C 16 A ドメイン、症例の 90 %)、B P 230 (有病率が低い)

線形 I g A 皮膚病: B P 180 N C 16 A / L A B D 97 / L A D－1 ドメイン、及び B P 230 に対する I g A

50

粘膜類天疱瘡：BP180 [NC16Aドメイン／C末端エピトープ]、ラミニン332、BP230、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン、及びコラーゲンVIIに対するIgG／IgA抗ラミニンガンマ1／p200類天疱瘡：ラミニンガンマ1 (p200) に対するIgG

後天性表皮水疱症：VII型コラーゲンに対するIgG

皮膚炎ヘルペティフォルミス：表皮トランスグルタミナーゼ、組織トランスグルタミナーゼ、筋内膜、脱アミド化グリアジンに対するIgA／G

重症筋無力症

グレーブス病

免疫性血小板減少性紫斑病

乾癬

白斑

全身性エリテマトーデス

1型糖尿病

関節リウマチ

多発性硬化症

クローン病

潰瘍性大腸炎

アジソン病

シェーグレン症候群

橋本甲状腺炎

自己免疫性血管炎

悪性貧血

セリアック病

強直性脊椎炎

ベーチェット症候群

先天性副腎過形成

グッドパスチャー症候群

遺伝性ヘモクロマトーシス

突発性膜性糸球体腎炎

ナルコレプシー

サルコイドーシス

自己免疫性腎疾患、例えば、Zhang W, Rho J-h, Roehrl MW, Roehrl MH, Wang JY (2019) A repertoire of 124 potential autoantigens for autoimmune kidney diseases identified by dermatan sulfate affinity enrichment of kidney tissue proteins. PLoS ONE 14 (6) (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載される124の自己抗原を参照されたい。

【0192】

実施例 7

背景及び有意性。尋常性天疱瘡 (PV) は、皮膚及び粘膜の痛みを伴う水疱形成を特徴とし得る、破壊的な自己免疫疾患である^{1~4}。カドヘリンファミリーの一部であるデスマogleインは、重層上皮におけるケラチノサイト間の主要な細胞接着剤である。デスマogleイン分子に対する自己抗体は、それらの接着機能を阻害し、棘細胞離開として知られる細胞間接着の喪失を引き起こす^{5、6}。加えて、細胞間接着における自己抗体の干渉は、病的な自己免疫応答を増大させ、棘細胞離開に寄与する細胞シグナル伝達経路をもたらす^{2、3、7}。粘膜優位型PVは、デスマogleイン-3 (Dsg3) に対する自己抗体の産生によって引き起こされ、痛みを伴う粘膜びらんを引き起こす^{8、29} (図14)。口腔粘膜びらんは、特に痛みを伴い、患者にとって厄介であり、飲食を困難にする。粘膜びら

10

20

30

40

50

んは、鼻粘膜、膣粘膜、肛門周囲粘膜、喉頭／食道粘膜、泌尿生殖器粘膜、及び結膜粘膜を含む他の粘膜サービス (mucosal service) においても起こり得る (図 14)。P V の治療法は存在しない。治療戦略は、典型的には、全身性ステロイド及び免疫抑制剤を含む^{10~22}。自己反応性 B 細胞由来の抗 D s g 3 抗体は、粘膜優位型 P V の主要な駆動因子である^{23、24}。天疱瘡における病原性自己抗体の直接的な役割が確立されており、一価自己抗体がこの疾患を引き起こすのに十分であることが示されている^{8、25、26}。抗 C D 20 抗体 (例えば、リツキシマブ) は、中等度から重度の疾患に対するファーストラインの選択肢となっているが^{11、4、27~30}、感染のリスクの増加 (従来の免疫抑制剤よりも低いとはいえず)、B 細胞の枯渇、ワクチン接種に対する液性応答を減らすこと、又は 6 ヶ月間以上にわたる新しい感染、及び治療後の再発の高いリスクを含む、オフターゲット免疫抑制効果と関連がある^{29、31~34}。新生児 F c 受容体アンタゴニスト^{35、36}、B 細胞活性化因子受容体に対する遮断抗体 (B A F F - R)³⁷、及びブルトンのチロシンキナーゼ阻害剤 (B T K i)^{38、39}を含む治療選択肢は、いくつかは現在臨床試験中であるが、特に新生児 F c 受容体アンタゴニスト⁴⁰の場合、全体的な体液性免疫を弱めるオフターゲット免疫抑制効果を回避せず、重度の低ガンマグロブリン症の高いリスクを有する。加えて、B T K i の初期動物試験は、イヌ落葉状天疱瘡 (イヌにおける抗デスモコリン自己抗体及び抗デスモグレイン自己抗体によって駆動される天疱瘡の表在性バリエーション) について有効性を示すが、完全な治療を示さない。B T K i は、全てのイヌにおいて自己抗体の産生を完全に抑制することができなかったが、これは疾患の寛解及び治療の鍵である³⁹。P V の再発は、最初の治療中に枯渇していない同じ自己反応性細胞の拡大に起因し得る^{41~43}。したがって、自己反応性 B 細胞の完全な枯渇は、治療法を与え得る。自己ポリクローナル調節性 T 細胞⁴⁴及びキメラ自己抗原受容体 (C A A R) T 細胞⁴⁵などの初期段階の細胞ベースの療法は、有効であることが証明されたとしても、全体的に免疫抑制性とはなり得ない。しかし、細胞ベースの療法は、個々の患者に対して個別化することができ、製造、保管、及び輸送のための特定の要件を有するが、これは、この疾患群を治療する全ての病院及び診療所において実行可能であるとは限らない。抗誘導性共刺激因子 (Inducible Co-Stimulator、I C O S) 抗体による、T 細胞上に発現される共刺激受容体である I C O S 分子 (抗 D s g 3 病原性 B 細胞の発生において重要な役割を果たす濾胞性ヘルパー T 細胞の活性に影響を及ぼす) の標的化は、動物モデルにおいて P V の進行を遅延させる結果を示している⁴⁶。しかしながら、これは、抗 D s g 3 B 細胞自体を標的とすることと比較して、抗 D s g 3 抗体産生を標的とするあまり直接的でない方法であり、理論に束縛されることを望むものではないが、疾患の進行を遅延させることしかできず、他の防御抗体の産生に悪影響を及ぼし得る。防御免疫を保存しながら自己反応性細胞を正確に枯渇させる標的化治療の開発は、満たされていない必要性であり、多くの患者にとって救命的である。

【0193】

D s g 3 及び D s g 1 は、皮膚及び粘膜において異なる発現パターンを有する¹。D s g 3 は、粘膜を通して、及び成体皮膚のより深い層において発現され得る。D s g 1 及びカドヘリンは、粘膜優位型 P V の粘膜における D s g 3 機能の喪失を補うことができない。抗デスモグレイン自己抗体は、ケラチノサイト間の接着の喪失並びに水疱及びびらん⁴⁰の形成を誘導する際に病原性の役割を果たす。実験モデルは、D s g 3 及び D s g 1 自己抗体が直接的に病原性であることを示している^{24、25、47}。抗 D s g 1 自己抗体レベル及び抗 D s g 3 自己抗体レベルは、疾患重症度と相関し得る⁴⁸。自己反応性抗体を産生するために一緒に働く病変周囲の自己反応性 B 及び T リンパ球は、疾患の病因における細胞プレーヤーである⁴⁹。再発は、共に働いて疾患表現型を引き起こす自己反応性 T 細胞及び B 細胞の戻りと相関し得る。寛解は、デスモグレインを標的とする自己反応性抗体の低下又は枯渇によって誘導される。再発は、自己反応性 B 細胞の不完全な枯渇を有する患者において、より高い⁵⁰。したがって、疾患表現型の直接的なエフェクター細胞である、デスモグレインを認識する自己反応性 B 細胞の完全な標的化枯渇は、自己抗体駆動疾患のこの群を治療する鍵である。自己反応性 B 細胞を伴わない自己反応性 T 細胞単独は、自

己反応性B細胞の抑制が寛解を維持するのに重要であるため、疾患表現型を誘導することができない可能性がある^{43、51}。

【0194】

本願発明者らは、全体的なB細胞プールに影響を及ぼすことなく、タンパク質操作技術を活用し、病原性B細胞を正確に標的化して枯渇させるための新しいツールを生成することによって、この問題に取り組むことができる。本願発明者らは、抗Dsg3自己反応性B細胞によって駆動される粘膜優位型PVを説明することができる。リツキシマブ²⁹を含む既存の治療用モノクローナル抗体に類似した機構では、理論に拘束されることを望むものではないが、抗体のFc部分に融合したDsg3タンパク質は、自己反応性Dsg3を認識するB細胞の死滅を効果的かつ特異的に媒介することができる。構築物のDsg3部分は、自己反応性B細胞の抗Dsg3 B細胞受容体(BCR)に結合する。次いで、Fc部分は、貪食細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞の動員によって、Dsg3を認識する病原性B細胞のFc媒介性死滅を誘導する(図15のパネルA)。本願発明者らは、マウス及びヒトDsg3-Fc融合体を作製し、これらの構築物が特異性及び親和性を有しつつそれらの標的に結合することを示した。加えて、本願発明者らのデータは、操作されたタンパク質が、インビトロ及びインビボでの確立されたDsg3特異的B細胞の死滅を、有効性を伴って媒介することを示す(完全応答は、インビボ動物モデルにおいて観察される)。代替的なアプローチとして、本願発明者らは、抗CD3ε scFvに融合したDsg3タンパク質を使用して、腫瘍学的治療における既存の二重特異性T細胞エンゲージャ療法と類似の機構において、Dsg3を認識する病原性B細胞を死滅させるようにT細胞を指向させ、結合させることができる(図15のパネルB)^{52、53}。

10

20

【0195】

理論に束縛されることを望むものではないが、本明細書に記載の組成物及び方法は、天疱瘡の他のバリエーションである粘膜優位型PVだけでなく、既知の抗原を用いた抗体駆動性自己免疫疾患の治療のためのプラットフォームを提供することができる。

【0196】

天疱瘡に対する治療法は存在せず、治療は全体的に免疫抑制性である。正常なB細胞に影響を与えることなくDsg3自己反応性病原性B細胞の正確な標的化及び枯渇を可能にする、本明細書に記載のFc媒介性アプローチ(及び本願発明者らの代替的なT細胞媒介性アプローチ)は、固有のものである。本明細書に提示されるデータは、本明細書に記載の組成物及び方法が、粘膜優位型PVの治療を変えるだけでなく、他の自己免疫性水疱症(例えば、粘膜皮膚尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、水疱性類天疱瘡、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状IgA水疱性皮膚症)、狼瘡、強皮症、グッドパスチャー病、グレーブス病のサブタイプから免疫介在性血管炎に及ぶ既知の抗原標的を用いた自己抗体/免疫複合体媒介性疾患の治療を開発するための道を開くことができることを示す。本願発明者らは、提案された治療薬は、自己免疫疾患の治療ツールボックスへの画期的な追加とみなすことができると考える。

30

【0197】

生物学的活性は、標準化されたインビトロアッセイを用いて確立することができる。広範なエクスピボ生体内分布及び代謝運命分析を行うことができる。実験の各セットについて、1群当たり少なくとも約10匹のマウスを使用して、統計分析を可能にし、固有の動物間変動性を説明することができる。適用可能な場合、有意レベル $\alpha \leq 0.05$ で対応のないスチューデント両側t検定を使用して統計分析を行うことができる。生存分析は、logランク(Mantel-Cox)検定を使用して行うことができる。動物は、各実験内で年齢を一致させることができる。実験は、治療薬に対する応答における性差を説明するために、雄マウス及び雌マウスの両方を含み得る。動物における療法試験は、観察者バイアスが確実に回避されるように、二重盲検様式で行うことができる。市販されていない生物製剤及び化学物質を認証することができる。

40

【0198】

タンパク質の部位特異的改変。細菌トランスペプチダーゼであるソルターゼを使用して

50

、C末端でタンパク質を改変することができる（図16のパネルA）^{54、55}。この酵素は、短い認識配列（LPETG）を有し、TとGとの間を切断して中間体チオエステルを形成し、Gly3含有基質との求核反応による分解を可能にする。反応は、ほぼ定量的な収率を提供することができ、迅速、堅牢、かつ再現可能であり得る。本願発明者らは、ソルターゼを使用して、フルオロフォア、ポリマー、及び放射性同位体などの機能性をタンパク質上に導入した^{56～61}。ソルターゼ媒介性部位特異的標識は、タンパク質の結合能力が標識後に損なわれないことを確実にし、したがって、ここで、本願発明者らは、ソルターゼ技術を使用してタンパク質を改変する。

【0199】

Dsg3外部ドメインの免疫原性。PV患者に関する試験は、患者の91%、71%、51%、19%及び12%が、それぞれ外部ドメインEC1、EC2、EC3、EC4及びEC5に対する自己抗体を有することを示している（図13）⁶²。そのアプローチを確立するために、Dsg3-EC1-3はPV患者における生理学的抗Dsg3抗体の大部分を網羅し、その産生は完全サイズのEC1-5構築物よりも複雑ではないため、本願発明者らは、Dsg3-EC1-3を使用することができる。更に、非限定的で例示的な結果（以下）は、標的化された外部ドメインに依存しない自己反応性B細胞の同様の死滅を示す。一旦確立されると、本願発明者らは、EC1-4及び1-5構築物を作製し、これは、臨床的解釈を考慮する場合に、より適切であり得、抗Dsg3反応性病原性B細胞の全スペクトルをカバーする。

【0200】

抗Dsg3細胞株及び抗体。本願発明者らは、以下の3つの細胞株及び4つの抗Dsg3抗体を使用することができる：（1）マウスにおいてPVを誘導する抗マウスDsg3抗体を産生するAK23ハイブリドーマ細胞⁶³。AK23抗体は、EC1ドメインを認識し、ヒトDsg3-EC1と交差反応する；（2及び3）Nalm-6 F779及びNalm-6 PVB28がん細胞株。Nalm-6は、B細胞前駆体白血病細胞株であり、F779及びPVB28は、それぞれDsg3-EC1及びDsg3-EC2ドメインを認識する患者由来の抗Dsg3抗体を発現するように操作されたNalm-6細胞である⁴⁵。更に、本願発明者らは、PV患者から特定された4つの抗ヒトDsg3抗体（P3F3、P1F5、P5D4及びP5G6）のプラスミドを得た⁶⁴。P3F3抗体は、ヒトDsg3-EC1ドメインに特異的に結合するIgG1抗体であり、ヒトケラチノサイトに添加されると強い棘細胞離開を誘導する⁶⁴。P1F5、P5D4、及びP5G6抗体は、それぞれDsg3-EC2、Dsg3-EC4、及びDsg3-EC1ドメインに結合し、一緒になって強い棘細胞離開を誘導する⁶⁴。組み合わせられたモノクローナル抗体は、それらのいずれか1つよりも高いケラチノサイトの解離を引き起こす。

【0201】

インビトロ環境において抗Dsg3自己反応性B細胞を標的とし、その死滅を媒介するDsg3-Fc融合タンパク質を開発すること。

【0202】

mDsg3-mFc及びhDsg3-hFc構築物の開発及び特性評価。本明細書において考察されるように、アプローチを確立するために、本願発明者らは、Dsg3-EC1-3ドメインを開発した。したがって、本願発明者らは、マウス及びヒトの両方のFc融合タンパク質であるmDsg3-EC1-3-IgG2a及びhDsg3-EC1-3-IgG1（ここからは、mDsg3-mFc、及びhDsg3-hFcと呼ぶ）を作製した。ヒトIgG1及びマウスIgG2aを、それらの高いFc媒介性死滅活性について選択した^{65～67}。タンパク質は、C末端にFLAGタグ、ソルターゼ認識モチーフ及びHis6タグを有するように操作された（図16のパネルA）。8アミノ酸配列（DYKDDDDK）であるFLAGは、ウェスタンブロット及びフローサイトメトリー分析のために使用することができ、その後、インビボで使用される場合、構築物の代謝運命及び薬物動態の分析のために使用することができる。His6タグを精製に使用し、ソルターゼタグ（LPETG）を部位特異的に改変を導入するために使用した。本願発明者らは、

確立されたクローニング技術に従って両方の構築物についてプラスミドを作製し、サンガー配列決定を介して最終配列を確認した。次いで、本願発明者らは、哺乳動物 H E K 2 9 3 細胞を使用して両方の構築物を発現させ、N i - N T A アフィニティーカラムを介して精製し、S D S - P A G E 及びウェスタンブロッティング分析を使用して特性評価して、構築物の形成を確認した（図 1 6 のパネル A ~ B）。G l y 3 - A l e x a 6 4 7 ソルターゼ基質を合成し、これを使用して、融合タンパク質を A l e x a F l u o r 6 4 7 で部位特異的に標識した。ソルターゼ反応は、構築物（50 μ M）、G l y 3 - A l e x a 6 4 7 基質（500 μ M）、及びソルターゼ（5 μ M）を 4 $^{\circ}$ C で 1 時間混合することによって行った。A l e x a 6 4 7 標識された構築物をサイズ排除カラムクロマトグラフィーによって精製し、構築物のゲル内蛍光スキャンによって、フルオロフォアの導入を更に確認した（図 1 6 のパネル B）。構築物の機能性を特性評価するために、本願発明者らは、A l e x a 6 4 7 標識された m D s g 3 - m F c を使用して、抗 m d S g 3 A K 2 3 ハイブリドーマ及び抗 h D s g 3 F 7 7 9 及び P V B 2 8 細胞を染色した。細胞を、より多くの親和性及び特異性（10 nM 濃度での）により染色し（図 1 6 のパネル C）、これは、F 7 7 9 及び P V B 2 8 細胞上の患者由来 B C R がマウス D s g 3 タンパク質と交差反応することを示唆している。対照として使用した N a l m - 6 細胞は、いかなる結合も示さず、構築物の特異性を確認する（図 1 6 のパネル C）。A l e x a 6 4 7 標識された h D s g 3 - h F c 融合タンパク質を使用して同様の実験を行ったところ、F 7 7 9 及び P V B 2 8 細胞に強く結合し、マウス A K 2 3 細胞も染色することが確認され、これは、A K 2 3 抗マウス D s g 3 抗体がヒト D s g 3 タンパク質と交差反応することが示唆している（図 1 6 のパネル C）。注目すべきことに、ヒト D s g 3 は、マウス D s g 3 に類似しており（86% の配列相同性）^{6 8}、マウス D s g 3 欠損を機能的にレスキューする^{6 9}。構築物を更に分析するために、本願発明者らは、異なる濃度の A l e x a 6 4 7 標識されたタンパク質を使用することによって、m D s g 3 - m F c 及び h D s g 3 - h F c 構築物の両方についての E C 5 0 値を測定した。結果は、h D s g 3 - h F c 及び m D s g 3 - m F c が、それぞれ 1.8 $\pm$ 0.8 nM 及び 2.3 $\pm$ 0.9 nM の E C 5 0 で F 7 7 9 細胞に結合することを示した（図 1 6 のパネル D ~ E）。構築物を更に特性評価するために、本願発明者らは、まず、プレートを A K 2 3 抗体でコーティングし、別のプレートを P 3 F 3（抗ヒト D s g 3）でコーティングし^{6 4}、次いで、コーティングされたプレートに対する構築物の結合を分析することによって、E L I S A アッセイを行った。その結果は更に、本願発明者らが作製したヒト及びマウス構築物が両方の抗 D s g 3 抗体に特異的に結合するが、対照プレートには特異的に結合しないことを確認した（図 1 6 のパネル F）。P 3 F 3 抗体を、製造業者のプロトコルに従って、E x p i 2 9 3 F 細胞において作製した。A K 2 3 抗体を、プロテイン G アフィニティーカラムを用いて A K 2 3 ハイブリドーマ培地から精製した。同様のアプローチに従って、本願発明者らは、マウス I g G 2 a 及びヒト I g G 1 F c に融合したマウス及びヒト D s g 3 - E C 1 - 4、及び D s g 3 - E C 1 - 5 を生成することができ、それらを同様に特性評価する。

【0203】

F c 媒介性インビトロ死滅アッセイを確立する。まず、本願発明者らは、m D s g 3 - m F c 構築物が、その F c 部分（I g G 2 a）を介して、低い nM 親和性でマウスマクロファージ上の F c γ 受容体に結合することを確認した（図 1 6 のパネル G、E C 5 0 値 2.3 $\pm$ 0.8 nM）。対照 N a l m 6 細胞は、染色されないままであった。融合タンパク質が F c 媒介性死滅を引き起こし得るかどうかを決定するために、マウス R A W 2 6 4.7 マクロファージ細胞と共培養した F 7 7 9 標的細胞（エフェクタ：標的の比が 10 : 1）を m D s g 3 - m F c 融合タンパク質で処置した。1 nM 程度の低濃度の構築物が、F 7 7 9 標的細胞の効率的な死滅を媒介することができた（24 時間後及び 48 時間後にそれぞれ約 60% 及び約 80% の死滅、N a l m 6 対照細胞の死滅はなかった、図 1 7）。（E C 2 に結合する）標的細胞として P V B 2 8 を用いて同様の実験を行った。結果は、標的細胞の同様に有効な死滅を示し、これは、治療が、D s g 3 上の標的化エピトープにかかわらず、異なる自己反応性細胞の死滅を媒介し得ることを示している（図 1 7）。

10

20

30

40

50

異なる用量のmDsg3-mFc（1、10及び100nM）を用いて実験を繰り返して、治療濃度の効果及びより高い治療濃度で起こり得る任意の潜在的な非特異的死滅を試験した。結果は、10及び100nMで、抗Dsg3陰性NALM6細胞の非特異的死滅を伴わずに、標的細胞の高死滅率（約90%死滅）を示し、治療が、より高い濃度範囲で非常に有効かつ特異的なままであることを示唆している（図17）。本願発明者らは、エフェクター細胞としてRAW264.7マクロファージ細胞、並びに標的細胞としてF779及びPVB28を使用して同様の実験を行ったが、今回はhDsg3-hFc構築物を使用した（マウスFcγ受容体（FcγR）はヒトFcを認識することが知られている。しかしながら、ヒトFcRは、マウスFcを認識しない）⁶⁵。結果は、上記で考察したmDsg3-mFc実験の結果と同様に、非常に有効かつ特異的な死滅を示した（図17）。次に、本願発明者らは、同様の設定で実験を繰り返したが、今回は、エフェクター細胞としてTHP1細胞⁷⁰（AML患者に由来する広く使用され、確立されたヒト単球細胞株）を使用し、治療としてhDsg3-hFc構築物を使用した。結果は、標的細胞の効果的な死滅を示し、対照の抗Dsg3陰性NALM-6細胞は死滅しなかった（図17）。本願発明者らは、治療のためにある範囲の用量（0、1、10、及び100nMのhDsg3-hFc構築物を使用して死滅アッセイを実施し（図17）、試験した全ての濃度について有効な死滅効力を観察し、これは、治療が、低濃度で有効であり、高濃度で高度に特異的なままであることを示唆している。

10

【0204】

潜在的な懸念は、抗Dsg3自己抗体（PV患者において生じる）の存在が、治療が標的細胞に結合するのを遮断し、したがって治療有効性を減少させるか、又は中和する可能性があるかどうかである。この問題を試験するために、本願発明者らはまず、抗Dsg3抗体を培地中に放出する十分に確立されたAK23ハイブリドーマ細胞を使用した。AK23抗体は、上述のように、Dsg3上のEC1ドメインを認識し、したがって、治療を潜在的に中和することができる。実験は、上記と同じ設定に従って行った。結果は、本願発明者らがF779及びPVB28細胞について観察したものと同様に（図17）、AK23細胞の非常に有効な死滅を示した（エフェクター細胞としてRaw細胞又はTHP1細胞のいずれかを用い、治療としてmDsg3-mFc又はhDsg3-hFcを用いた場合）。抗Dsg3自己抗体の存在の影響のより系統的な分析を行うために、本願発明者らは、標的細胞としてAK23細胞及びF779細胞、エフェクター細胞としてRaw細胞、治療として10nMのmDsg3-Fc又はhDsg3-Fcを使用し、上記と同じ設定に従って死滅アッセイを繰り返した（エフェクタ：標的の比10：1）。しかしながら、今回、本願発明者らは、抗Dsg3抗体の存在が死滅有効性に影響を及ぼし得るかどうかを評価するために、ある範囲の既知量のAK23抗体を混合物に添加した。驚くべきことに、本願発明者らは、試験した条件のいずれにおいても死滅有効性の変化を観察しなかった（100pM～500nMの範囲のAK23抗体を試験した。図18を参照されたい。各セットの最初の2列は24時間評価であり、次の2列は48時間評価である）。本願発明者らは、全ての4つの異なる細胞（対照としてNALM-6、次いで標的細胞としてAK23、F779及びPVB28）を使用してアッセイを繰り返し、今回は、100nMのAK23抗体の存在下で、エフェクター細胞としてTHP-1細胞を使用し、治療として異なる用量のhDsg3-hFc（0、1、10及び100nM）を使用した。驚くべきことに、かつ、上記と同様に、遮断は観察されず、試験した全ての条件において有効な死滅が得られた（図18）。これは、Dsg3に対する自己抗体の存在が、Dsg3-Fc融合タンパク質の死滅有効性に対して最小限の負の影響を有し得ることを示している。

20

30

40

【0205】

この潜在的な問題を更に評価し、ポリクローナル抗Dsg3抗体の存在がアプローチの有効性にどのように影響し得るかを詳細に説明するために、本願発明者らは、4名の異なる患者由来の抗Dsg3抗体P3F3及びP5G6（Dsg3-EC1に結合する）、P1F5（Dsg3-EC2に結合する）及びP5D4（Dsg3-EC4に結合する）を

50

作製した。本願発明者らは既に P 3 F 3 抗体を作製しており、他の 3 つの抗体の産生は進行中である。本願発明者らは、A K 2 3、F 7 7 9、及び P V B 2 8 細胞についての死滅アッセイを、本願発明者らが上記で行ったもの（A K 2 3、P 3 F 3、P 5 D 4、P 5 G 6、P 1 F 5）と同様の濃度範囲で、これら 5 つの抗体の混合物の存在下で繰り返す。加えて、本願発明者らは、生理学的条件を厳密に模倣するために、抗 D s g 3 抗体の混合物の存在下で標的細胞（A K 2 3、F 7 7 9、P V B 2 8）の混合物を使用するアッセイを実施する。理論に束縛されることを望むものではないが、治療により、ポリクローナル自己抗体の存在下でポリクローナル病原性 B 細胞の標的化死滅を継続することができる。

【0206】

全体として、インビトロデータは、D s g 3 - F c 構築物が、抗 D s g 3 自己抗体の存在下であっても、抗 D s g 3 + 標的細胞の死滅を効果的かつ特異的に媒介することができることを示している。

【0207】

患者 P B M C を使用したインビトロアッセイにおけるヒト構築物（h D s g 3 - h F c）の有効性を描写する。理論に束縛されることを望むものではないが、本願発明者らは、患者の血液中に存在するポリクローナル抗 D s g 3 I g G の存在下で、正常 B 細胞に影響を及ぼすことなく病原性 B 細胞を死滅させる際のアプローチの有効性を描写することができる。本願発明者らは、D s g 3 タンパク質に対する自己反応性 B 細胞が確認された P V 患者（少なくとも $n = 10$ ）から P B M C を得る 71。（1）治療未経験、及び（2）疾患の再発を含む異なる疾患期の抗 D s g 3 陽性患者から得た P B M C を、丸底 48 ウェルプレート中で培養する（各群について $n = 10$ ）。h D s g 3 - h F c 融合タンパク質（1 n M 及び 10 n M）を、標準的な細胞インキュベーター内での 37 °C でのインキュベーション後に細胞に加える。P B M C 中に存在する患者自身の貪食細胞及び N K 細胞が、標的化された抗 D s g 3 + 病原性 B 細胞を死滅させることができると予想されるので、更なる貪食細胞は混合物に添加されない。細胞のインキュベーション及び治療（h D s g 3 - h F c）の 1 日後及び 2 日後に、E L I S p o t アッセイを実施して、抗原特異的及び総 I g G B 細胞枯渇について評価する。結果は、総 I g G レベル（影響を受けていないと予想される、したがって、対照として使用する）と比較した自己反応性抗 D s g 3 I g G の減少パーセンテージを明らかにする。分析は、フローサイトメトリー、並びにアッセイの内部標準として作用する B 細胞及び T 細胞を含む標準的な生 - 死分析を介して行われる。C D 3 +、C D 4 +、C D 8 + 及び C D 2 0 + 細胞をゲーティングするために抗体を使用することに加えて、本願発明者らは、フルオロフォア標識された h D s g 3 構築物（h D s g 3 - A l e x a 6 4 7）を使用して P B M C を染色する。h D s g 3 タンパク質（F c を含まない）は既に手元にある。本願発明者らは、h D s g 3 タンパク質（E C 1 - 3）を、本願発明者らが記載のタンパク質を作製するために使用したのと同様のプロトコルに従って作製した（標準的なクローニング、その後の発現、精製、及び A l e x a 6 4 7 を導入するためのソルターゼによる部位特異的標識）。これは、P V 患者の P B M C 中に存在する抗 D s g 3 + B 細胞に対するゲーティングを可能にする。A l e x a 6 4 7 標識された D s g 3 タンパク質での染色を含むアッセイの前後のフローサイトメトリー分析は、抗 D s g 3 細胞がいかに関効果的に標的化され、死滅したかを明らかにする。第 2 の対照として、健康な P B M C を同じ設定で使用して、観察された結果を更に確認する（ここで、本願発明者らは変化が起こらないと予想する）。P V 患者の P B M C は、以下の包含／除外基準を満たす患者から収集される。包含基準：（1）生検により P V と証明された、（2）標準的な E L I S A による、循環抗 D s g 3 I g G 自己抗体、（3）P B M C 収集時に C D 1 9 及び C D 2 0 によって示された正常 B リンパ球カウント。除外基準：（1）B 及び T 細胞リンパ腫／白血病を含む既知の血液由来悪性腫瘍を有する患者。P B M C のレベル又は機能に影響を及ぼし得る任意の治療を含む、P B M C 収集の 12 ヶ月前及び P B M C 収集時の治療を記録する。理論に束縛されることを望むものではないが、患者の P B M C 中の病原性 B 細胞を、正常な B 細胞に影響を及ぼすことなく、効率的かつ特異的に死滅させることができる。

10

20

30

40

50

【0208】

本願発明者らは、既に150mgを超えるmDsg3-EC1-3-mFc、150mgを超えるhDsg3-EC1-3-hFc、200mgを超えるmDsg3-EC1-3、及び200mgを超えるhDsg3-EC1-3を作製しており、これらは提案された実験に必要な量を超えており、必要に応じて、これより多く作製することができる。本願発明者らは、マウス及びヒトDsg3-EC1-4-Fc及びDsg3-EC1-5-Fcを含有する構築物を同様に作製する。タンパク質発現収率が特定の構築物について低い場合、本願発明者らは、この問題に対処するために、例えば、限定されないが、以下の異なる経路を調査することができる。(1)発現に使用されるヌクレオチドコドンをも再最適化する、(2)異なるシグナルペプチド配列を使用する、及び／又は(3)HEK293細胞の代わりにタンパク質発現のための他の系、例えばCHO、Exp293F又は昆虫細胞を使用する。

【0209】

自己抗体の存在及び中和の懸念に関して、結果は、PV患者における生理学的状態において生じるような自己抗体の存在が、治療を中和しない(又は少なくとも完全には中和しない)ことを示す。理論に束縛されることを望むものではないが、これは、抗原-抗体相互作用の動的かつ可逆的な性質に起因するものであり、エフェクター細胞を介して標的細胞を死滅させる不可逆的プロセスとは対照的である。更に、エフェクター細胞と標的細胞との間で生じるクラスター化は、2つの細胞を架橋するいくつかのDsg3-Fc分子を介して起こり、Dsg3-Fc分子との自己抗体相互作用と比較して、親和性に関して、より強い可能性があり、それによって自己抗体の存在下であっても死滅プロセスを前方に駆動する。重要なことに、抗体は、Dsg3タンパク質上の異なるエピトープに結合することができる。したがって、多くの抗体は、重複しないエピトープを有する。したがって、自己抗体がDsg3-Fc治療構築物に結合している場合であっても、複合体(Dsg3-Fcに結合した抗体)は、非重複エピトープを有する抗Dsg3 BCR(病原性B細胞の表面上)に依然として結合することができ、したがって、エフェクターを標的細胞に架橋し、2つの細胞間でクラスターを形成するのを助け、したがって標的細胞の死滅を媒介する。したがって、Dsg3タンパク質上の多くの潜在的エピトープ及び相互作用の動的性質を考慮すると、Dsg3-Fc構築物が抗Dsg3 BCRの全ての病原性クローンに到達する可能性は、統計的に高いままである。更に、重要なことに、これらの構築物の投薬は、オマリズマブ(IgEレベルに基づいて使用されるIgG1k抗ヒトIgE)などの薬物と同様であるが、直接的には類似しておらず、患者依存的であり、循環抗Dsg3力価のレベルに潜在的に基づき得るので、本願発明者らは、これを臨床診療における制限とは考えない。加えて、現実世界の状況では、治療薬は、IVIgなどの抗Dsg3力価を低下させる他の薬物と同時に使用することができる^{72~76}。循環抗Dsg3自己抗体を低下させるために臨床で使用される別のアプローチは、循環自己抗体の力価を低下させることができ、通常、重度の天疱瘡を有する患者に使用される、血漿交換及び免疫吸着である^{77~80}。したがって、この(潜在的な)問題に対処する複数の方法が存在し、本願発明者らは、実験を進めるにつれて、また、上で論じたように、これを注意深く評価し続ける。更に、確かに、モノクローナル及びポリクローナル抗Dsg3 IgGは、Dsg3自己抗体産生B細胞に特異的なCAAR T細胞のインビボでの死滅能力に対して有意な効果を有さないことが見出された⁴⁵。したがって、データだけでなく、抗Dsg3 CAAR T細胞の有効性も、循環抗Dsg3抗体が治療の効果を遮断しないことを示唆している。別の例は(現在のプロポーザルに直接的に類似していないが)、多発性骨髄腫患者におけるB細胞成熟抗原(B-cell maturation antigen、BCMA) CAAR T細胞の有効性であり、ほとんどの患者は、γ-セクレターゼによって引き起こされる排出に起因して、循環中に高レベルの可溶性BCMA抗原を有する⁸¹。しかしながら、循環中に高レベルの可溶性BCMAが存在するにもかかわらず、BCMA CAAR T細胞を投与された患者は、顕著な応答を示しており、これは、BCMA CAAR T細胞が、可溶性BCMAの存在下であっても、特異性及び有効性を有しつつBCMA+多発

10

20

30

40

50

性骨髓腫細胞を効率的に死滅させることができることを示唆している。全体として、これらの観察は、可溶性抗原（又は自己抗体）の存在が、標的細胞を死滅させるエフェクター細胞の活性を損なわないことを示す。これは、上で考察したように、相互作用の動的性質、重複しないエピトープ、及びエフェクター細胞と標的細胞との間のクラスター化効果に起因し得る。

【0210】

Fc媒介性アプローチの有効性を更に増加させるために、本願発明者らは、IL-2と融合したDsg3-Fcを設計し、首尾よく発現させたが、これにより、より多くの細胞に結合し、死滅を増強することができる。これが有効性を増加させる場合、本願発明者らは、他のサイトカイン（例えば、IL-15）も同様に調査することができる。陰性対照実験のために、抗Dsg3抗体の発現を欠く細胞に加えて、代替法として、本願発明者らが同様に発現及び使用することができるDsg1-Fc融合体の合成のためのプラスミドを設計し、作製した。

【0211】

本願発明者らは、Dsg1タンパク質について類似の構築物を生成することができる。Dsg1及びDsg3は、粘膜の扁平層全体にわたって発現されるが、Dsg3はDsg1よりも高レベルで発現される^{1、3、23}。皮膚では、Dsg1は表皮全体に発現しているが、表層により多く存在している。Dsg1とは対照的に、Dsg3は、基底層及び傍基底層を含む表皮の下部でより強く発現され、表層ではより少ない程度で発現される。皮膚及び粘膜におけるこれらの異なる発現パターンの結果として、(i) Dsg3は、粘膜優位型の尋常性天疱瘡を有する患者において主要な病原性抗原として挙動し、この患者は、皮膚の関与がないか又は最小限である粘膜において深いびらんを発症する（Dsg1が皮膚においてそれを補うことができるため）。全ての粘膜優位型PV患者が、高レベルの抗Dsg3 IgG自己抗体を有する^{3、23}。(ii) 高レベルの抗Dsg3及び抗Dsg1 IgG自己抗体を有する患者は、皮膚粘膜型の尋常性天疱瘡を発症し、粘膜及び皮膚において深いびらんを示す。また、(iii) 落葉状天疱瘡（PF）を有する患者は、高レベルの抗Dsg1自己反応性抗体のみを有し、粘膜の関与を伴わない表在性皮膚水疱のみを示し、これは、Dsg1がPFにおける主要な病原性自己抗原であることを示唆している。本願発明者らは、粘膜優位型のPVを治療するために使用することができるDsg3-Fc融合タンパク質を開発し、特性評価することができる。本願発明者らは、Dsg1について類似の構築物を同様に作製することができる。理論に束縛されることを望むものではないが、粘膜皮膚PVを有する患者は、Dsg3-FcとDsg1-Fcとの混合物で治療することができ、PFを有する患者は、Dsg1-Fcで治療することができる。加えて、本願発明者らは、Fc部分におけるCH3のヘテロ二量体化を可能にし、したがって、Dsg1及びDsg3自己反応性病原性B細胞の両方を標的とすることができる、Dsg3-Dsg1-Fcノブ-イントゥーホール構造⁸²（Dsg3-ノブ+Dsg1-ホール）を生成することができる。

【0212】

追加の試験では、本願発明者らは、抗CD3ε単鎖Fv（scFv）抗体断片に融合されたDsg3-EC1-3を作製し、これは、病原性自己反応性B細胞を標的とし、死滅させるようにT細胞を指向させ、結合させることができる（図15のパネルB）。このアプローチは、潜在的なFcR飽和を回避することができ、病原性B細胞がFc媒介性アプローチによる死滅に対して耐性である場合、このT細胞媒介性アプローチは、代替法を提供することができる。例えば、一部の患者は、遺伝子多型に起因してリツキシマブに対する耐性を示し、これは、抗体依存性細胞傷害性の減少をもたらす^{83~85}。Dsg3-抗CD3ε構築物は、理論に拘束されることを望むものではないが、標的抗Dsg3 B細胞とT細胞との間の分子クラスター化及び免疫学的シナプスの形成を確立し、その結果、T細胞の活性化をもたらす^{52、53}、標的化された抗Dsg3 B細胞を特異的に死滅させ、他のB細胞を無傷なままに残す^{52、53、86~88}。腫瘍学的用途とは異なり、サイトカイン放出症候群は、自己反応性B細胞の負荷が悪性クローンよりもはるかに低

10

20

30

40

50

いことを考慮すると、自己免疫疾患の治療においては予想されない。したがって、N-C D s g 3 抗 C D 3 e 融合プラスミドを、h D s g 3 - E C 1 - 3 及び O K T 3 抗 C D 3 e s c F v の c D N A を含有するように設計した。O K T 3 クローンは、二重特異性 T 細胞エンゲージャの抗 C D 3 e 部分として臨床で使用されており^{8 9}、そのため、本願発明者は、このクローンを選択する。注目すべきことに、C D 3 e は、全ての成熟 T リンパ球上に見出される。構築物は、他の二重特異性 T 細胞エンゲージャと同様に、N 末端に D s g 3 及び C 末端に抗 C D 3 e s c F v を有するように設計された。更に、この構造は、最も病原性である D s g 3 - E C 1 及び E C 2 ドメインが、D s g 3 反応性 B 細胞による認識に利用可能であることを確実にする。他の二重特異性 T 細胞エンゲージャと同様に、可撓性 (G 4 S) 3 スペーサ / リンカーを D s g 3 タンパク質と s c F v タンパク質との間に含めた。タンパク質を、H E K 2 9 3 細胞を使用して発現させ、N i - N T A ビーズ及びサイズ排除クロマトグラフィーを介して精製し、S D S - P A G E、抗 F L A G ウェスタンブロット及びフローサイトメトリー分析によって更に特性評価した。フローサイトメトリー分析は、融合タンパク質が、確立された抗 D s g 3 B 細胞及び C D 3 + J u r k a t 細胞 (ヒト T 細胞) に高い特異性及び親和性で結合するが、対照 N a l m - 6 細胞には結合しないことを明らかにした (図 19)。本願発明者らは、既に 10 m g を超えるタンパク質を作製しており、必要に応じて更に作製する。

10

【0213】

インビボで抗 D s g 3 自己反応性 B 細胞を標的とし、その死滅を媒介する D s g 3 - F c 融合タンパク質の有効性を試験すること。

20

【0214】

いくつかの実施形態では、D s g 3 - F c 構築物は、循環抗 D s g 3 + 自己反応性 B 細胞の標的化された枯渇を媒介することができる。いくつかの実施形態では、自己抗体の存在は、標的化された枯渇に影響を及ぼさない。

【0215】

循環抗 D s g 3 + B 細胞の特異的標的化及び枯渇に対する D s g 3 - F c 融合タンパク質のインビボ有効性を試験するために、抗 D S G 発現 P V B - 2 8 悪性細胞を免疫不全 N O D - s c i d ガンマ (NOD-scid gamma、NSG) マウスに移植した。NSG マウスは、成熟 T 細胞、B 細胞、及び NK 細胞を欠き、樹状細胞機能の低下、及びマクロファージ活性の欠損を示し、したがって、前臨床試験のための広範囲のヒト細胞の生着に広く使用されている。したがって、NSG マウスに、0 日目に、ルシフェラーゼ陽性 P V B 2 8 細胞 (1×10^6 個) を尾静脈を介して静脈内 (i. v.) 注射した。P V B 2 8 細胞投与前の - 3、- 2 及び - 1 日目に、マウスを 16 m g / k g の I V I G (腹腔内 (i. p.) 注射) で前治療して、F c γ R を介した非特異的死滅を遮断した (すなわち、P V B 2 8 細胞の生着を増強した)。m D s g 3 - m F c 治療を治療群に投与し、4 日目に開始して、i. p. 注射を 2 週間にわたって週に 3 回、次いで週に 1 回行った。対照群にはアイソタイプ I g G 2 a を与えた。自己抗体群には、A K 2 3、A K 1 9 及び A K 1 8 の混合物 (150 μ g、ハイブリドーマからの抗 D s g 抗体) を治療開始の前日 (すなわち、3 日目) に開始して、全てのマウス (治療及び対照) に対して、週 2 回を 2 週間にわたって投与した。疾患の進行を生物発光イメージング (B L I) によってモニタリングした。

30

40

【0216】

図 20 のパネル A は、自己抗体の存在下であっても、治療レシピエントマウスにおいて、より遅いシグナル増強を示す B L I イメージングを示す。図 20 のパネル B は、生存率が、対照群と比較して両方の治療レシピエント群において有意に高い (P 値 = 0.0023) ことを示す。また、自己抗体 + 治療 (A u t o - A b s + T x) 群の生存期間の中央値は 38 日であり、これは治療群よりも高かった (生存期間の中央値 = 35 日、P 値 = 0.048)。図 20 のパネル C は、エンドポイントでのフローサイトメトリー分析を示し、治療レシピエントマウスの骨髄における P V B 2 8 細胞の完全な枯渇を示した (各群について n = 5 のデータの代表)。

50

【0217】

PVマウスモデルにおける動物試験。このアプローチの有効性を下記の2つのPVマウスモデルで試験する。

【0218】

受動導入モデル。このモデルにおいて、本願発明者らは、AK23抗体を注射することによって、受動モノクローナル天疱瘡マウス疾患モデルを開発することができ⁹¹、これは、皮膚及び粘膜の両方において水疱の発生を引き起こすことが知られている²⁶。このマウスモデルは、PV患者において記載された主要な特徴を再現する²⁶。したがって、動物に200 μ gのAK23抗体を、治療の開始の2日前から開始して週に3回、治療の持続期間にわたって前注射するという違いのみを除き、上記で説明したものと同一の設定で実験を行うことができる。これにより、マウスが治療期間中、循環中に常に高い量の抗Ds g 3自己抗体を有することを確実にすることができる。この実験の目的は、治療の有効性に対する循環中の病原性抗Ds g 3自己抗体の存在の影響を描写することである。読み出しは、上記と同じBLI分析及び生存である。一旦確立されたら、同じ実験を繰り返すことができるが、今回は、ポリクローナル病原性B細胞（F779及びPVB28の混合物）及びポリクローナル抗Ds g 3自己抗体（AK23、P1F5、P3F3、P5G6、及びP5D4抗体の混合物、注射当たり200 μ gの総抗体、それぞれ40 μ g）を注射することができる。これにより、治療がポリクローナル自己抗体及びポリクローナル病原性Ds g 3反応性B細胞の存在下でさえ有効なままであることを示すことができる。この設定は、PV患者における生理学的状態に似ている可能性がある。本願発明者らは、病原性抗体の注射後1週間に3回、血清抗Ds g 3力価（標準的なELISAによる）及び皮膚疱疹（盲検化された研究者によって評価される）を分析することによって疾患の確立について試験することができる。理論に束縛されることを望むものではないが、マウスは、脱毛、体重減少を示す場合があり、かつ、表皮ケラチノサイトに結合する自己抗体を伴って、毛包及び口腔粘膜に水疱形成を有する場合がある（図21のパネルA～D）⁹¹、⁴⁸。BLIイメージングを使用して、上記と同様に、治療の死滅有効性をモニタリングすることができる。治療を受けないマウス（陰性対照）、及び治療を受けるが自己抗体を投与されないマウス（陽性対照；本願発明者らは、この設定においてほぼ完全な応答の治療結果を既に示している）の2セットの対照を使用することができる。

【0219】

能動導入モデル。受動疾患モデルには利点がある。しかしながら、治療は、急速に増殖する悪性細胞に打ち勝つべきであり、これはPV患者の症例には当てはまらない可能性がある。したがって、第2のモデルとして、本願発明者らは、ヒト疾患の臨床表現型を厳密に模倣し、臨床的に起こるものに類似する自己反応性Ds g 3特異的B細胞の頻度が低く、最終的に高い血清ポリクローナル抗Ds g 3自己抗体レベルを有する、能動PV免疫モデルを使用することができる。このモデルでは、本願発明者らは、まず、Ds g 3- γ マウス（JAX-002911）をマウスDs g 3の組換え細胞外ドメインで免疫付与し（既に産生され、手元にある）、続いて脾細胞をRAG2- γ マウスに導入することによって、能動ポリクローナル天疱瘡マウス疾患モデルを開発することができる^{95~97}。導入された細胞は、病原性Ds g 3反応性B細胞を含み得るB細胞（及びT細胞）を含有する。文献で行われた観察と同様に^{95、96、98}、理論に束縛されることを望むものではないが、動物は、抑制された成長を有している可能性があり（図21のパネルE）、基底上の棘細胞離開及び水疱を伴う皮膚粘膜びらんを発症する場合がある（図21のパネルF～H）。臨床指標を評価するために、ELISAを使用して、本願発明者らは、自己抗体レベルをPV患者における生理学的レベル（300~400 RU/mL）と比較することができる⁴⁸。Ds g 3反応性抗体がそのレベルに等しいか、又はそれを超える場合、これは3~4週間で起こり得る^{42、48}が、上記と同じ設定を使用して治療を開始することができる（マウス1匹当たり200 μ gのmDs g 3-mFc、週3回を2週間）。Ds g 3免疫付与Ds g 3+ γ 動物由来の細胞の養子導入を対照として使用することができる⁹⁸（群当たり少なくともn=10匹のマウス）。

【0220】

治療の開始後5日目及び14日目に測定された血清抗Ds g 3力価、皮膚びらの盲検調査、Ig G沈着を検出するための粘膜試料の免疫蛍光、粘膜関門の組織学的評価、及び組織病理学の定量化を行って、アプローチの有効性を更に評価することができる。B細胞カウントも同様に実施して、それらが治療の間正常レベル内に維持されることを確実にすることができる。理論に束縛されることを望むものではないが、治療は、疾患の臨床的解決及び組織学的解決、意図された転帰をもたらすことができる。

【0221】

治療の安全性及びオフターゲット細胞傷害性相互作用がないことを更に確実にするために、本願発明者らは、初代ヒト細胞及びハイスルーブット膜プロテオームアレイを使用して毒性学スクリーニングを実施することができる。理論に束縛されることを望むものではないが、BCR結合誘導性エンドサイトーシスは、本願発明者らの治療薬、例えば、他の受容体の共結合なしに抗Ds g 3 BCRのみに結合するDs g 3-Fcなどの「抗原」を用いて起こり得、したがって、低い速度のエンドサイトーシスを誘導する⁹⁹。加えて、インビトロ及びインビボでのデータは、Ds g 3-Fcと抗Ds g 3 BCRとの結合が、Ds g 3を認識する自己反応性B細胞の標的化されたほぼ完全な死滅をもたらすことを裏付けている。したがって、現在の証拠に基づく、抗BCR結合誘導性エンドサイトーシス及び分解が起こる場合、それは臨床的意義を有することができない。加えて、Ds g 3を認識する自己反応性B細胞（本願発明者らの治療薬の標的）によって産生される抗体は、定義によれば、本願発明者らの治療薬を本質的に標的とする（Ds g 3-Fc）。したがって、本願発明者らは、有効性を減少させるリツキシマブ又は抗TNF-アルファなどの他の治療薬において見られるような、及び上で詳細に議論されるような「中和抗体」の生成について心配していない。特に、非重複エピトープがどのようにして中和問題の克服に積極的に寄与し得るかについての本願発明者らの考察を参照されたい。

【0222】

能動疾患モデルでは、抗Ds g 3レベルは、長期寛解を試験するために週1回のELISAによって測定することができる。マウスは、皮膚病変をチェックして疾患再発がないことを確実にするために、盲検研究者によって試験することができる。Fc媒介性アプローチは、リツキシマブと同様に、再発を示す場合があるが、理論に束縛されることを望むものではないが、再治療で応答可能である。興味深いことに、いくつかの試験は、複数サイクルのリツキシマブで数年間にわたって治療された患者の大部分が長期寛解を示すことを示している¹⁰⁰。しかしながら、リツキシマブは、患者の全B細胞プールを枯渇させ、反復注入は、B細胞の再増殖の遅延をもたらし得るので、それは感染のリスクを有し、新たな感染又はワクチン接種に対する体液性応答を消失させる。本明細書で開発されたDs g 3-Fcアプローチの標的化された性質は、いかなる主要な副作用の恐れもなく、複数サイクルでの連続治療としての使用を可能にする。例えば、最初の一連の治療が終わった後に、患者が寛解したとき、患者は、3ヶ月に1回（又は更に頻繁に）、1年又は更に長い間、再注射され得る。連続及び多サイクルのリツキシマブ治療に類似した機構では、これにより、全てのDs g 3病原性B細胞が枯渇することを確実にすることができる。Ds g 3-Fcアプローチは、正常なB細胞プールに影響を与えないので、理論に束縛されることを望むものではないが、数ヶ月にわたる患者へのその複数回の使用は、大きな問題に直面しないはずであり、したがって、長期寛解を可能にする。これは、抗CD20生物製剤よりも有利である。したがって、本明細書中で提案されるように、自己反応性B細胞の完全な標的化枯渇は、長期から永続的な寛解をもたらし得る。

【0223】

本願発明者らは、治療の用量依存性及びその有効性が抗Ds g 3自己抗体力価の存在とどのように相関するかを（ELISAを介して）調べることができる。生物製剤の広範な使用により、抗薬物抗体は、抗TNF α ¹⁰¹からリツキシマブ¹⁰²、¹⁰³まで及び複数の薬剤について報告されている。免疫複合体沈着などの主要な免疫有害事象が理論化されているが¹⁰⁴、臨床診療では実現されていない。オマリズマブの場合のように、生物

製剤が高循環抗体に結合する場合、高いIgEレベルを有する患者への投薬は、免疫有害事象を生じなかった¹⁰⁵。同様に、血清中の抗Dsg3抗体の存在は、いかなる主要な免疫有害事象も引き起こさない。これは、本明細書で説明するようにモニタリングすることができる。能動PVモデル実験のために、及び陽性対照として、本願発明者らは、抗CD20 IgG（クローンSA271G2、動物当たり250 µg）を使用して調査することができる。これがマウスにおいてB細胞を効果的に枯渇させることが示されてからである¹⁰⁶。

【0224】

受動導入PVモデル（モデル1）では、病原性抗体を注射する代替法として、ルシフェラーゼ陽性AK23細胞のみをNSGマウスに注射することができ⁴⁵、これは、その細胞が疾患を引き起こすことが知られている病原性抗Dsg3抗体を産生するからである⁴⁵。読み出しは、本明細書で説明したのと同じBLIである。

【0225】

Dsg3-Fc治療が、免疫系を全体的に抑制しないことを確認するために、Dsg3-Fcによる治療後の能動PVを有する動物（モデル2）を活動性LCMV-Cl13（ 2×10^6 PFU、i.v.）により感染させることができる。C57BL/6を陽性対照として使用した。感染マウスの肝臓及び血液中のウイルス負荷は、プラークアッセイを用いて注射後30日目に比較することができる^{107~109}。あるいは、治療後の急性感染のために、マウスを、リステリア・モノサイトゲネス（ $10^4 \sim 10^5$ CFU）で経口的に、又はLCMV Armstrong（ 2×10^5 PFU）により腹腔内にチャレンジすることができる^{110~112}。肝臓及び脾臓における微生物負荷を感染10日後にチェックし、感染のみのマウスと比較することができる。いずれの実験においても、理論に拘束されることを望むものではないが、ウイルス負荷に差はない。

【0226】

BCR-T細胞エンゲージャプローチ（抗CD3に対するDsg3融合）は、本明細書で考察されるように、代替アプローチであり得る。これを達成するために、本願発明者らは、Dsg3抗CD3e融合タンパク質を作製し、本明細書において考察されるようにそれを特性評価した。この種類の分子に関する臨床的問題は、それらのサイズが小さいことに起因して、それらが最適なインビボ薬物動態特性よりも少ない場合があることである¹¹³（短い半減期、 $t_{1/2}$ が約0.6時間）。この問題を解決するために、本願発明者らは、一方のアーム上にDsg3外部ドメインを有し、他方のアーム上に抗CD3 scFvを有する二重特異性抗体構築物を開発することができる。本願発明者らは、ノブーイントゥーホールアプローチを使用して、2つの異なる標的化剤を1つの抗体構造に結合させる一方で、LALA変異を使用してマクロファージ動員がないことを確実にすることができる¹¹⁴。この構造は、Fc領域に起因する高い薬物動態学的特性、並びにより良好な発現、安定性、及び臨床適用性を確実にすることができる。

【0227】

本明細書中で議論される実施されたインビボ実験について、本願発明者らは、雄マウス及び雌マウスの両方を使用し、対照群又は治療群のいずれかにおいて性別間に差異は観察されなかった（例えば、合計 $n=27$ のNSGマウスが、各実験に無作為に割り当てられた8匹の雄及び19匹の雌で、インビボ試験のために使用された）。性別にかかわらず、対照マウスは、増加したBLIシグナルを示し、約30日目までに安楽死させなければならなかったが、治療マウスは、エンドポイントで約100%の抗原喪失を示したか、又は完全な応答を示し、検出可能なBLIシグナルを伴わずに健康であり続けた（PVB28実験について）（図20A～図C）。本願発明者らは、実験において両方の性別を使用し続け、本願発明者らが観察し得る任意の差異を、特に能動PVモデルについてモニタリングする。

【0228】

方法。クローニング、タンパク質産生及び特性決定、ウェスタンブロット、フローサイトメトリー及びELISA分析、及び動物BLIイメージングを、標準的な実験室アプロ

10

20

30

40

50

ーチに従って実施した。インビトロ及びインビボでの有効性評価実験を上記で説明したように行った。P V受動モデル及び能動モデルの開発に関する詳細については、脊椎動物のセクションを参照されたい。

【 0 2 2 9 】

この実施例で引用されている参考文献

1. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest.* 1999 Feb 15;103(4):461–468. 10
2. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 May 11;3:17026. PMCID: PMC5901732
3. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *The Lancet.* 2019 Sep;394(10201):882–894. 20
4. Murrell DF, Peña S, Joly P, Marinovic B, Hashimoto T, Diaz LA, Sinha AA, Payne AS, Daneshpazhooh M, Eming R, Jonkman MF, Mimouni D, Borradori L, Kim S-C, Yamagami J, Lehman JS, Saleh MA, Culton DA, Czernik A, Zone JJ, Fivenson D, Ujiie H, Wozniak K, Akman-Karakaş A, Bernard P, Korman NJ, Caux F, Drenovska K, Prost-Squarcioni C, Vassileva S, Feldman RJ, Cardones AR, Bauer J, Ioannides D, Jedlickova H, Palisson F, Patsatsi A, Uzun S, Yayli S, Zillikens D, Amagai M, Hertl M, Schmidt E, Aoki V, Grando SA, Shimizu H, Baum S, Cianchini G, Feliciani C, Iranzo P, Mascaró JM, Kowalewski C, Hall R, Groves R, Harman KE, Marinkovich MP, Maverakis E, Werth VP. Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol.* 2020 Mar;82(3):575-585.e1. PMCID: PMC7313440 30
5. Koch PJ, Walsh MJ, Schmelz M, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Franke WW. Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol.* 1990 Oct;53(1):1–12. PMID: 1706270 40

6. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*. 1991 Nov 29;67(5):869–877. PMID: 1720352
7. Sajda T, Sinha AA. Autoantibody Signaling in Pemphigus Vulgaris: Development of an Integrated Model. *Front Immunol*. 2018;9:692. PMCID: PMC5932349 10
8. Mascaró JM, España A, Liu Z, Ding X, Swartz SJ, Fairley JA, Diaz LA. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 Oct;85(1):90–96. PMID: 9325074
9. Furue M, Kadono T. Pemphigus, a pathomechanism of acantholysis. *Australas J Dermatol*. 2017 Aug;58(3):171–173. PMID: 28211055
10. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L, Bystryń J-C, Cianchini G, Diaz L, Fivenson D, Hall R, Harman KE, Hashimoto T, Hertl M, Hunzelmann N, Iranzo P, Joly P, Jonkman MF, Kitajima Y, Korman NJ, Martin LK, Mimouni D, Pandya AG, Payne AS, Rubenstein D, Shimizu H, Sinha AA, Sirois D, Zillikens D, Werth VP. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol*. 2008 Jun;58(6):1043–1046. PMCID: PMC2829665 20
11. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, Caillot F, Golinski ML, Labeille B, Picard-Dahan C, Paul C, Richard M-A, Bouaziz JD, Duvert-Lehembre S, Bernard P, Caux F, Alexandre M, Ingen-Housz-Oro S, Vabres P, Delaporte E, Quereux G, Dupuy A, Debarbieux S, Avenel-Audran M, D’Incan M, Bedane C, Bénétón N, Jullien D, Dupin N, Misery L, Machet L, Beylot-Barry M, Dereure O, Sassolas B, Vermeulin T, Benichou J, Musette P, French study group on autoimmune bullous skin diseases. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of 30 40 50

pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial.

Lancet. 2017 May 20;389(10083):2031–2040. PMID: 28342637

12. Committee for Guidelines for the Management of Pemphigus Disease, Amagai M, Tanikawa A, Shimizu T, Hashimoto T, Ikeda S, Kurosawa M, Niizeki H, Aoyama Y, Iwatsuki K, Kitajima Y. Japanese guidelines for the management of pemphigus. J Dermatol. 2014 Jun;41(6):471–486. PMID: 24909210

10

13. Hertl M, Jedlickova H, Karpati S, Marinovic B, Uzun S, Yayli S, Mimouni D, Borradori L, Feliciani C, Ioannides D, Joly P, Kowalewski C, Zambruno G, Zillikens D, Jonkman MF. Pemphigus. S2 Guideline for diagnosis and treatment--guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015 Mar;29(3):405–414. PMID: 25338479

20

14. Atzmony L, Hodak E, Gdalevich M, Rosenbaum O, Mimouni D. Treatment of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: a systematic review and meta-analysis. Am J Clin Dermatol. 2014 Dec;15(6):503–515. PMID: 25403548

15. Werth VP. Treatment of pemphigus vulgaris with brief, high-dose intravenous glucocorticoids. Arch Dermatol. 1996 Dec;132(12):1435–1439. PMID: 8961871

30

16. Mignogna MD, Lo Muzio L, Ruoppo E, Fedele S, Lo Russo L, Bucci E. High-dose intravenous “pulse” methylprednisone in the treatment of severe oropharyngeal pemphigus: a pilot study. J Oral Pathol Med. 2002 Jul;31(6):339–344. PMID: 12201245

17. Almugairen N, Hospital V, Bedane C, Duvert-Lehembre S, Picard D, Tronquoy A-F, Houivet E, D’incan M, Joly P. Assessment of the rate of long-term complete remission off therapy in patients with pemphigus treated with different regimens including

40

medium- and high-dose corticosteroids. *J Am Acad Dermatol*. 2013 Oct;69(4):583–588. PMID: 23850258

18. Beissert S, Werfel T, Frieling U, Böhm M, Sticherling M, Stadler R, Zillikens D, Rzany B, Hunzelmann N, Meurer M, Gollnick H, Ruzicka T, Pillekamp H, Junghans V, Luger TA. A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol*. 2006 Nov;142(11):1447–1454. PMID: 17116835 10

19. Chams-Davatchi C, Esmaili N, Daneshpazhooh M, Valikhani M, Balighi K, Hallaji Z, Barzegari M, Akhyani M, Ghodsi SZ, Seirafi H, Nazemi M-JT, Mortazavi H, Mirshams-Shahshahani M. Randomized controlled open-label trial of four treatment regimens for pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 2007 Oct;57(4):622–628. PMID: 17583373 20

20. Beissert S, Mimouni D, Kanwar AJ, Solomons N, Kalia V, Anhalt GJ. Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *J Invest Dermatol*. 2010 Aug;130(8):2041–2048. PMID: 20410913

21. Ioannides D, Apalla Z, Lazaridou E, Rigopoulos D. Evaluation of mycophenolate mofetil as a steroid-sparing agent in pemphigus: a randomized, prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Jul;26(7):855–860. PMID: 21752101 30

22. Chams-Davatchi C, Mortazavizadeh A, Daneshpazhooh M, Davatchi F, Balighi K, Esmaili N, Akhyani M, Hallaji Z, Seirafi H, Mortazavi H. Randomized double blind trial of prednisolone and azathioprine, vs. prednisolone and placebo, in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Oct;27(10):1285–1292. PMID: 23062214 40

23. Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999 Feb;40(2):167–170.

24. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med*. 1982 May 20;306(20):1189–1196. PMID: 7040962

25. Rock B, Labib RS, Diaz LA. Monovalent Fab' immunoglobulin fragments from endemic pemphigus foliaceus autoantibodies reproduce the human disease in neonatal Balb/c mice. *J Clin Invest*. 1990 Jan;85(1):296–299. PMCID: PMC296418

26. Schulze K, Galichet A, Sayar BS, Scothern A, Howald D, Zymann H, Siffert M, Zenhäusern D, Bolli R, Koch PJ, Garrod D, Suter MM, Müller EJ. An Adult Passive Transfer Mouse Model to Study Desmoglein 3 Signaling in Pemphigus Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012 Feb;132(2):346–355.

27. Joly P, Mouquet H, Roujeau J-C, D'Incan M, Gilbert D, Jacquot S, Gougeon M-L, Bedane C, Muller R, Dreno B, Doutre M-S, Delaporte E, Pauwels C, Franck N, Caux F, Picard C, Tancrede-Bohin E, Bernard P, Tron F, Hertl M, Musette P. A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *N Engl J Med*. 2007 Aug 9;357(6):545–552. PMID: 17687130

28. Feldman RJ, Ahmed AR. Relevance of rituximab therapy in pemphigus vulgaris: analysis of current data and the immunologic basis for its observed responses. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011 Jul;7(4):529–541. PMID: 21790294

10

20

30

40

50

29. Wang H-H, Liu C-W, Li Y-C, Huang Y-C. Efficacy of rituximab for pemphigus: a systematic review and meta-analysis of different regimens. *Acta Derm Venereol.* 2015 Nov;95(8):928–932. PMID: 25881672
30. Lunardon L, Tsai KJ, Probert KJ, Fett N, Stanley JR, Werth VP, Tsai DE, Payne AS. Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single-center experience with 31 patients. *Arch Dermatol.* 2012 Sep;148(9):1031–1036. PMCID: PMC3658473 10
31. Kasperkiewicz M, Eming R, Behzad M, Hunzelmann N, Meurer M, Schulze-Koops H, von Wussow P, Hertl M, Zillikens D, Freivogel K, Dörner T, Schmidt E. Efficacy and safety of rituximab in pemphigus: experience of the German Registry of Autoimmune Diseases. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2012 Oct;10(10):727–732. PMID: 22577946
32. Tony H-P, Burmester G, Schulze-Koops H, Grunke M, Henes J, Kötter I, Haas J, Unger L, Lovric S, Haubitz M, Fischer-Betz R, Chehab G, Rubbert-Roth A, Specker C, Weinerth J, Holle J, Müller-Ladner U, König R, Fiehn C, Burgwinkel P, Budde K, Sörensen H, Meurer M, Aringer M, Kieseier B, Erfurt-Berge C, Sticherling M, Veelken R, Ziemann U, Strutz F, von Wussow P, Meier FMP, Hunzelmann N, Schmidt E, Bergner R, Schwarting A, Eming R, Hertl M, Stadler R, Schwarz-Eywill M, Wassenberg S, Fleck M, Metzler C, Zettl U, Westphal J, Heitmann S, Herzog AL, Wiendl H, Jakob W, Schmidt E, Freivogel K, Dörner T, GRAID 20 30
investigators. Safety and clinical outcomes of rituximab therapy in patients with different autoimmune diseases: experience from a national registry (GRAID). *Arthritis Res Ther.* 2011 May 13;13(3):R75. PMCID: PMC3218885
33. Kushner CJ, Wang S, Tovanabutra N, Tsai DE, Werth VP, Payne AS. Factors Associated With Complete Remission After Rituximab Therapy for Pemphigus. *JAMA Dermatol.* 2019 Dec 1;155(12):1404. 40

34. Mahmoudi H, Balighi K, Tavakolpour S, Daneshpazhooh M. Unexpected worsening of pemphigus vulgaris after rituximab: A report of three cases. *Int Immunopharmacol*. 2019 Jun;71:40–42. PMID: 30877872
35. Goebeler M, Bata-Csörgő Z, De Simone C, Didona B, Remenyik E, Reznichenko N, Stoevesandt J, Ward ES, Parys W, de Haard H, Dupuy P, Verheesen P, Schmidt E, Joly P, ARGX-113-1701 Investigator Study Group. Treatment of pemphigus vulgaris and foliaceus with efgartigimod, a neonatal Fc receptor inhibitor: a phase II multicentre, open-label feasibility trial. *Br J Dermatol*. 2021 Oct 5; PMID: 34608631 10
36. Werth VP, Culton DA, Concha JSS, Graydon JS, Blumberg LJ, Okawa J, Pyzik M, Blumberg RS, Hall RP. Safety, Tolerability, and Activity of ALXN1830 Targeting the Neonatal Fc Receptor in Chronic Pemphigus. *J Invest Dermatol*. 2021 Dec;141(12):2858-2865.e4. PMID: 34126109 20
37. Izumi K, Bieber K, Ludwig RJ. Current Clinical Trials in Pemphigus and Pemphigoid. *Front Immunol*. 2019;10:978. PMCID: PMC6509547
38. Goodale EC, White SD, Bizikova P, Borjesson D, Murrell DF, Bisconte A, Francesco M, Hill RJ, Masjedizadeh M, Nunn P, Gourlay SG, Jordan TJM, Emery CB, Outerbridge CA. Open trial of Bruton's tyrosine kinase inhibitor (PRN1008) in the treatment of canine pemphigus foliaceus. *Vet Dermatol*. 2020 Oct;31(5):410-e110. PMID: 32803903 30
39. Goodale EC, Varjonen KE, Outerbridge CA, Bizikova P, Borjesson D, Murrell DF, Bisconte A, Francesco M, Hill RJ, Masjedizadeh M, Nunn P, Gourlay SG, White SD. Efficacy of a Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor (PRN-473) in the treatment of canine pemphigus foliaceus. *Vet Dermatol*. 2020 Aug;31(4):291-e71. PMID: 31899567 40

40. Peter H-H, Ochs HD, Cunningham-Rundles C, Vinh DC, Kiessling P, Greve B, Jolles S. Targeting FcRn for immunomodulation: Benefits, risks, and practical considerations. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Sep;146(3):479-491.e5. PMID: PMC7471860
41. Hammers CM, Chen J, Lin C, Kacir S, Siegel DL, Payne AS, Stanley JR. Persistence of anti-desmoglein 3 IgG(+) B-cell clones in pemphigus patients over years. *J Invest Dermatol*. 2015 Mar;135(3):742-749. PMID: PMC4294994 10
42. Lee J, Lundgren DK, Mao X, Manfredo-Vieira S, Nunez-Cruz S, Williams EF, Assenmacher C-A, Radaelli E, Oh S, Wang B, Ellebrecht CT, Fraietta JA, Milone MC, Payne AS. Antigen-specific B cell depletion for precision therapy of mucosal pemphigus vulgaris. *J Clin Invest*. 2020 Dec 1;130(12):6317-6324. PMID: PMC7685721
43. Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, Lim A, Lemerrier B, Le Mauff B, Maho-Vaillant M, Jacquot S, Bedane C, Bernard P, Caux F, Prost C, Delaporte E, Doutre M-S, Dreno B, Franck N, Ingen-Housz-Oro S, Chosidow O, Pauwels C, Picard C, Roujeau J-C, Sigal M, Tancrede-Bohin E, Templier I, Eming R, Hertl M, D'Incan M, Joly P, Musette P. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 6;5(175):175ra30. PMID: 23467561 20 30
44. Esensten JH, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Regulatory T-cell therapy for autoimmune and autoinflammatory diseases: The next frontier. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Dec;142(6):1710-1718. PMID: 30367909
45. Ellebrecht CT, Bhoj VG, Nace A, Choi EJ, Mao X, Cho MJ, Di Zenzo G, Lanzavecchia A, Seykora JT, Cotsarelis G, Milone MC, Payne AS. Reengineering chimeric 40

antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science*. 2016 Jul

8;353(6295):179–184. PMID: PMC5343513

46. Kim AR, Han D, Choi JY, Seok J, Kim S-E, Seo S-H, Takahashi H, Amagai M, Park S-H, Kim S-C, Shin E-C, Kim JH. Targeting inducible costimulator expressed on CXCR5+PD-1+ TH cells suppresses the progression of pemphigus vulgaris. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Nov;146(5):1070-1079.e8. PMID: 32311391

10

47. Hashimoto K, Shafran KM, Webber PS, Lazarus GS, Singer KH. Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. A mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. *J Exp Med*. 1983 Jan 1;157(1):259–272. PMID: PMC2186905

48. Schmidt E, Dähnrich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stöcker W, Hashimoto T, Bröcker E-B, Recke A, Rose C, Zillikens D. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol*. 2010 May;19(5):458–463. PMID: 20163452

20

49. Yuan H, Zhou S, Liu Z, Cong W, Fei X, Zeng W, Zhu H, Xu R, Wang Y, Zheng J, Pan M. Pivotal Role of Lesional and Perilesional T/B Lymphocytes in Pemphigus Pathogenesis. *J Invest Dermatol*. 2017 Nov;137(11):2362–2370. PMID: 28647348

30

50. Albers LN, Liu Y, Bo N, Swerlick RA, Feldman RJ. Developing biomarkers for predicting clinical relapse in pemphigus patients treated with rituximab. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Dec;77(6):1074–1082. PMID: 28927663

51. Mouquet H, Musette P, Gougeon M-L, Jacquot S, Lemerrier B, Lim A, Gilbert D, Dutot I, Roujeau JC, D’Incan M, Bedane C, Tron F, Joly P. B-cell depletion

40

immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. *J Invest Dermatol*. 2008 Dec;128(12):2859–2869. PMID: 18563177

52. Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2015 Mar;93(3):290–296. PMCID: PMC4445461

53. Yuraszeck T, Kasichayanula S, Benjamin JE. Translation and Clinical Development of Bispecific T-cell Engaging Antibodies for Cancer Treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 May;101(5):634–645. PMCID: PMC5763312

54. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O. Staphylococcus aureus Sortase, an Enzyme that Anchors Surface Proteins to the Cell Wall. *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):760–763.

55. Dorr BM, Ham HO, An C, Chaikof EL, Liu DR. Reprogramming the specificity of sortase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 Sep 16;111(37):13343–13348.

56. Rashidian M, Keliher EJ, Bilate AM, Duarte JN, Wojtkiewicz GR, Jacobsen JT, Cragnolini J, Swee LK, Victora GD, Weissleder R, Ploegh HL. Noninvasive imaging of immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 May 12;112(19):6146–6151. PMCID: PMC4434737

57. Rashidian M, Keliher E, Dougan M, Juras PK, Cavallari M, Wojtkiewicz GR, Jacobsen J, Edens JG, Tas JMG, Victora G, Weissleder R, Ploegh H. The use of (18)F-2-fluorodeoxyglucose (FDG) to label antibody fragments for immuno-PET of pancreatic cancer. *ACS Cent Sci*. 2015 Jun 24;1(3):142–147. PMCID: PMC4778250

58. Rashidian M, Wang L, Edens JG, Jacobsen JT, Hossain I, Wang Q, Victora GD, Vasdev N, Ploegh H, Liang SH. Enzyme-Mediated Modification of Single-Domain

10

20

30

40

50

Antibodies for Imaging Modalities with Different Characteristics. *Angew Chem Int Ed Engl*.

2016 Jan 11;55(2):528–533. PMCID: PMC4718774

59. Ingram JR, Dougan M, Rashidian M, Knoll M, Keliher EJ, Garrett S,

Garforth S, Blomberg OS, Espinosa C, Bhan A, Almo SC, Weissleder R, Lodish H, Dougan SK, Ploegh HL. PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes. *Nat Commun*.

2017 Sep 21;8(1):647. PMCID: PMC5608754

10

60. Rashidian M, Ingram JR, Dougan M, Dongre A, Whang KA, LeGall C,

Cragolini JJ, Bieri B, Gostissa M, Gorman J, Grotenbreg GM, Bhan A, Weinberg RA, Ploegh HL. Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of

CD8 T cells. *J Exp Med*. 2017 Aug 7;214(8):2243–2255. PMCID: PMC5551571

61. Cong M, Tavakolpour S, Berland L, Glöckner H, Andreiuk B,

Rakhshandehroo T, Uslu S, Mishra S, Clark L, Rashidian M. Direct N- or C-Terminal Protein Labeling Via a Sortase-Mediated Swapping Approach. *Bioconjug Chem*. 2021 Nov

17;32(11):2397–2406. PMID: 34748323

20

62. Ohyama B, Nishifuji K, Chan PT, Kawaguchi A, Yamashita T, Ishii N,

Hamada T, Dainichi T, Koga H, Tsuruta D, Amagai M, Hashimoto T. Epitope spreading is rarely found in pemphigus vulgaris by large-scale longitudinal study using desmoglein 2-based

swapped molecules. *J Invest Dermatol*. 2012 Apr;132(4):1158–1168. PMID: 22277941

30

63. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S,

Nishikawa T, Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol*. 2003 Feb

15;170(4):2170–2178. PMID: 12574390

40

64. Cho A, Caldara AL, Ran NA, Menne Z, Kauffman RC, Affer M, Llovet A, Norwood C, Scanlan A, Mantus G, Bradley B, Zimmer S, Schmidt T, Hertl M, Payne AS, Feldman R, Kowalczyk AP, Wrammert J. Single-Cell Analysis Suggests that Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. *Cell Rep*. 2019 Jul 23;28(4):909-922.e6. PMID: PMC6684256 10
65. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5640–5649. PMID: 22535666
66. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014;5:520. PMID: PMC4202688
67. Yu J, Song Y, Tian W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *J Hematol Oncol*. 2020 May 5;13(1):45. PMID: PMC7201658 20
68. Ishikawa H, Li K, Tamai K, Sawamura D, Uitto J. Cloning of the mouse desmoglein 3 gene (Dsg3): interspecies conservation within the cadherin superfamily. *Exp Dermatol*. 2000 Aug;9(4):229–239. PMID: 10949543
69. Culton DA, McCray SK, Park M, Roberts JC, Li N, Zedek DC, Anhalt GJ, Cowley DO, Liu Z, Diaz LA. Mucosal pemphigus vulgaris anti-Dsg3 IgG is pathogenic to the oral mucosa of humanized Dsg3 mice. *J Invest Dermatol*. 2015 Jun;135(6):1590–1597. PMID: PMC4430403 30
70. Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med*. 2016 Nov;4(21):438. PMID: PMC5124613
71. Pollmann R, Walter E, Schmidt T, Waschke J, Hertl M, Möbs C, Eming R. Identification of Autoreactive B Cell Subpopulations in Peripheral Blood of Autoimmune Patients With Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol*. 2019;10:1375. PMID: PMC6587433 40

72. Amagai M, Ikeda S, Shimizu H, Iizuka H, Hanada K, Aiba S, Kaneko F, Izaki S, Tamaki K, Ikezawa Z, Takigawa M, Seishima M, Tanaka T, Miyachi Y, Katayama I, Horiguchi Y, Miyagawa S, Furukawa F, Iwatsuki K, Hide M, Tokura Y, Furue M, Hashimoto T, Ihn H, Fujiwara S, Nishikawa T, Ogawa H, Kitajima Y, Hashimoto K, Pemphigus Study Group. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol*. 2009 Apr;60(4):595–603. PMID: 19293008 10
73. Li N, Zhao M, Hilario-Vargas J, Prisayanh P, Warren S, Diaz LA, Roopenian DC, Liu Z. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. *J Clin Invest*. 2005 Dec;115(12):3440–3450. PMCID: PMC1280965
74. Paquin Proulx D, Aubin E, Lemieux R, Bazin R. Inhibition of B cell-mediated antigen presentation by intravenous immunoglobulins (IVIg). *Clin Immunol*. 2010 Jun;135(3):422–429. PMID: 20138586 20
75. Baker K, Rath T, Pyzik M, Blumberg RS. The Role of FcRn in Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2014;5:408. PMCID: PMC4145246
76. Nimmerjahn F, Ravetch JV. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *J Exp Med*. 2007 Jan 22;204(1):11–15. PMCID: PMC2118416 30
77. Mazzi G, Raineri A, Zanolli FA, Da Ponte C, De Roia D, Santarossa L, Guerra R, Orazi BM. Plasmapheresis therapy in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Transfus Apher Sci*. 2003 Feb;28(1):13–18. PMID: 12620264
78. Turner MS, Sutton D, Sauder DN. The use of plasmapheresis and immunosuppression in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Dec;43(6):1058–1064. PMID: 11100023 40

79. Kasperkiewicz M, Shimanovich I, Meier M, Schumacher N, Westermann L, Kramer J, Zillikens D, Schmidt E. Treatment of severe pemphigus with a combination of immunoadsorption, rituximab, pulsed dexamethasone and azathioprine/mycophenolate mofetil: a pilot study of 23 patients. *Br J Dermatol*. 2012 Jan;166(1):154–160. PMID: 21910700
80. Behzad M, Möbs C, Kneisel A, Möller M, Hoyer J, Hertl M, Eming R. Combined treatment with immunoadsorption and rituximab leads to fast and prolonged clinical remission in difficult-to-treat pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol*. 2012 Apr;166(4):844–852. PMID: 22092243 10
81. Laurent SA, Hoffmann FS, Kuhn P-H, Cheng Q, Chu Y, Schmidt-Supprian M, Hauck SM, Schuh E, Krumbholz M, Rübsamen H, Wanngren J, Khademi M, Olsson T, Alexander T, Hiepe F, Pfister H-W, Weber F, Jenne D, Wekerle H, Hohlfeld R, Lichtenthaler SF, Meinel E. γ -Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. *Nat Commun*. 2015 Jun 11;6:7333. PMCID: PMC4490565 20
82. Ridgway JB, Presta LG, Carter P. “Knobs-into-holes” engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng*. 1996 Jul;9(7):617–621. PMID: 8844834 30
83. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. A novel polymorphism of Fc γ RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1;100(5):1059–1070. PMCID: PMC508280
84. Dall’Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of 40

FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* 2004 Jul 1;64(13):4664–4669. PMID: 15231679

85. Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Sanz I, Rosenblatt J, Looney RJ. The relationship of FcγRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003 Feb;48(2):455–459. PMID: 12571855

10

86. Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera J-M, Wei A, Dombret H, Foà R, Bassan R, Arslan Ö, Sanz MA, Bergeron J, Demirkan F, Lech-Maranda E, Rambaldi A, Thomas X, Horst H-A, Brüggemann M, Klapper W, Wood BL, Fleishman A, Nagorsen D, Holland C, Zimmerman Z, Topp MS. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2017 Mar 2;376(9):836–847. PMCID: PMC5881572

20

87. Horn LA, Ciavattone NG, Atkinson R, Woldergerima N, Wolf J, Clements VK, Sinha P, Poudel M, Ostrand-Rosenberg S. CD3×PDL1 bi-specific T cell engager (BiTE) simultaneously activates T cells and NKT cells, kills PDL1+ tumor cells, and extends the survival of tumor-bearing humanized mice. *Oncotarget.* 2017 Aug 29;8(35):57964–57980. PMCID: PMC5601626

30

88. Speck T, Heidbuechel JPW, Veinalde R, Jaeger D, von Kalle C, Ball CR, Ungerechts G, Engeland CE. Targeted BiTE Expression by an Oncolytic Vector Augments Therapeutic Efficacy Against Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2018 May 1;24(9):2128–2137. PMID: 29437789

40

89. Ortho Multicenter Transplant Study Group. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N Engl J Med*. 1985 Aug 8;313(6):337–342. PMID: 2861567
90. Kujawski M, Li L, Bhattacharya S, Wong P, Lee W-H, Williams L, Li H, Chea J, Poku K, Bowles N, Vaidehi N, Yazaki P, Shively JE. Generation of dual specific bivalent BiTEs (dbBIspecific T-cell engaging antibodies) for cellular immunotherapy. *BMC Cancer*. 2019 Sep 5;19(1):882. PMCID: PMC6727398 10
91. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol*. 2003 Feb 15;170(4):2170–2178. PMID: 12574390 20
92. Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*. 2002 May 17;296(5571):1308–1313. PMID: 11964443
93. Harrison OJ, Brasch J, Lasso G, Katsamba PS, Ahlsen G, Honig B, Shapiro L. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016 Jun 28;113(26):7160–7165. 30
94. Cho MJ, Lo ASY, Mao X, Nagler AR, Ellebrecht CT, Mukherjee EM, Hammers CM, Choi E-J, Sharma PM, Uduman M, Li H, Rux AH, Farber SA, Rubin CB, Kleinstein SH, Sachais BS, Posner MR, Cavacini LA, Payne AS. Shared VH1-46 gene usage by pemphigus vulgaris autoantibodies indicates common humoral immune responses among patients. *Nat Commun*. 2014 Jun 19;5:4167. PMCID: PMC4120239 40

95. Takae Y, Nishikawa T, Amagai M. Pemphigus mouse model as a tool to evaluate various immunosuppressive therapies. *Exp Dermatol*. 2009 Mar;18(3):252–260. PMID: 18643850
96. Aoki-Ota M, Tsunoda K, Ota T, Iwasaki T, Koyasu S, Amagai M, Nishikawa T. A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. *Br J Dermatol*. 2004 Aug;151(2):346–354. PMID: 15327541 10
97. Lotti R, Atene CG, Marconi A, Di Rocco G, Reggiani Bonetti L, Zanocco Marani T, Pincelli C. Development of a Desmocollin-3 Active Mouse Model Recapitulating Human Atypical Pemphigus. *Front Immunol*. 2019;10:1387. PMCID: PMC6593104
98. Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest*. 2000 Mar;105(5):625–631. PMCID: PMC292455 20
99. Courtney AH, Bennett NR, Zwick DB, Hudon J, Kiessling LL. Synthetic antigens reveal dynamics of BCR endocytosis during inhibitory signaling. *ACS Chem Biol*. 2014 Jan 17;9(1):202–210. PMCID: PMC3947029
100. Shimanovich I, Baumann T, Schmidt E, Zillikens D, Hammers CM. Long-term outcomes of rituximab therapy in pemphigus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 Dec;34(12):2884–2889. PMID: 32367562 30
101. Bito T, Nishikawa R, Hatakeyama M, Kikusawa A, Kanki H, Nagai H, Sarayama Y, Ikeda T, Yoshizaki H, Seto H, Adachi A, Horikawa T, Oka M, Nishigori C. Influence of neutralizing antibodies to adalimumab and infliximab on the treatment of psoriasis. *Br J Dermatol*. 2014 Apr;170(4):922–929. PMID: 24329764 40

102. Schmidt E, Hennig K, Mengede C, Zillikens D, Kromminga A. Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. Clin Immunol. 2009 Sep;132(3):334–341. PMID: 19502112
103. Boyer-Suavet S, Andreani M, Lateb M, Savenkoff B, Brglez V, Benzaken S, Bernard G, Nachman PH, Esnault V, Seitz-Polski B. Neutralizing Anti-Rituximab Antibodies and Relapse in Membranous Nephropathy Treated With Rituximab. Front Immunol. 2019;10:3069. PMCID: PMC6970431 10
104. Krishna M, Nadler SG. Immunogenicity to Biotherapeutics - The Role of Anti-drug Immune Complexes. Front Immunol. 2016;7:21. PMCID: PMC4735944
105. Maselli DJ, Singh H, Diaz J, Peters JI. Efficacy of omalizumab in asthmatic patients with IgE levels above 700 IU/mL: a retrospective study. Ann Allergy Asthma Immunol. 2013 Jun;110(6):457–461. PMID: 23706716 20
106. Bongard N, Le-Trilling VTK, Malyskina A, Rückborn M, Wohlgemuth K, Wensing I, Windmann S, Dittmer U, Trilling M, Bayer W. Immunization with a murine cytomegalovirus based vector encoding retrovirus envelope confers strong protection from Friend retrovirus challenge infection. PLoS Pathog. 2019 Sep;15(9):e1008043. PMCID: PMC6786657 30
107. Korns Johnson D, Homann D. Accelerated and improved quantification of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) titers by flow cytometry. PLoS One. 2012;7(5):e37337. PMCID: PMC3355137
108. Yamada DH, Elsaesser H, Lux A, Timmerman JM, Morrison SL, de la Torre JC, Nimmerjahn F, Brooks DG. Suppression of Fcγ-receptor-mediated antibody effector 40

function during persistent viral infection. *Immunity*. 2015 Feb 17;42(2):379–390. PMCID: PMC4334737

109. Pratumchai I, Zak J, Huang Z, Min B, Oldstone MBA, Teijaro JR. B cell-derived IL-27 promotes control of persistent LCMV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Jan 18;119(3):e2116741119. PMCID: PMC8784116

10

110. Shen H, Whitmire JK, Fan X, Shedlock DJ, Kaech SM, Ahmed R. A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*. *J Immunol*. 2003 Feb 1;170(3):1443–1451. PMID: 12538706

111. Lee C-C, Kung JT. Marginal zone B cell is a major source of IL-10 in *Listeria monocytogenes* susceptibility. *J Immunol*. 2012 Oct 1;189(7):3319–3327. PMID: 22933629

20

112. Misumi I, Whitmire JK. B cell depletion curtails CD4⁺ T cell memory and reduces protection against disseminating virus infection. *J Immunol*. 2014 Feb 15;192(4):1597–1608. PMCID: PMC3925510

113. Mandrup OA, Ong SC, Lykkemark S, Dinesen A, Rudnik-Jansen I, Dagnæs-Hansen NF, Andersen JT, Alvarez-Vallina L, Howard KA. Programmable half-life and anti-tumour effects of bispecific T-cell engager-albumin fusions with tuned FcRn affinity. *Commun Biol*. 2021 Mar 8;4(1):310. PMCID: PMC7940400

30

114. Saxena A, Wu D. Advances in Therapeutic Fc Engineering - Modulation of IgG-Associated Effector Functions and Serum Half-life. *Front Immunol*. 2016;7:580. PMCID: PMC5149539

40

【 0 2 3 0 】

実施例 8

マウスにおける天疱瘡疾患の動物モデルは、公知である（本明細書において考察される）。実験において、本明細書に開示される治療薬は、マウスにおける疾患に対するそれらの効果を決定するために、これらのマウスに投与された（例えば、実施例 7）。これらの実験からのデータは、治療薬が有効であることを示す。このような更なる試験は、この実施例に記載される。

【 0 2 3 1 】

図 2 2 のパネル A ～ D は、有効性を示し、また、自己抗体の存在下であっても、免疫応

50

答性マウスにおいて治療がサイトカインストームも毒性も生じさせないことも示す。治療（mDsg3-EC14-mFc）及び／又は自己抗体の混合物（AK23、AK19、AK18）をマウスに注射するためのスケジュールをパネルAに示す。パネルB及びCでは、自己抗体を伴うか、又は伴わない治療レシピエントマウスは、毒性が観察されることなく、正常な体重増加を続けることが示される（各群についてn=6、3匹の雄及び3匹の雌）。パネルDは、ELISA分析が、治療単独、又は自己抗体のみ、又は自己抗体及び治療の両方（ELISA MAX（商標）Standard Set Mouse（BioLegend）を使用して）のいずれかを受けた3つの群のいずれかにおいて、サイトカインストームを示さなかった。何も投与されなかった6匹のマウスからの血清を、それぞれの性別において健康な対照のために使用した。2mg/kgのリポ多糖（LPS）を受けた3匹のマウスからの試料を使用して、それぞれの性別におけるサイトカインストームを模倣した。対応のないt検定を使用して、群間の有意差について検定した。（ns、 $P > 0.05$ ；*、 $P \leq 0.05$ ；**、 $P \leq 0.01$ ；***、 $P \leq 0.001$ ；****、 $P \leq 0.0001$ 。）

10

【0232】

図23のパネルA～Eは、治療（mDsg3-EC1-4-mFc）がAK23抗体の病原性効果を阻害することを示す。全ての動物は、AK23（12mg/kg、皮下）を投与された。AK23＋治療コホートは、1時間後にmDsg3-mFcを受けた（15mg/kg、i.p.）。パネルA及びBは、AK23群が、72時間後に行われたテプストリッピングによって有意な脱毛を示し（パネルA）、5日目に重度のPV表現型を示した（すなわち、脱毛及び粘膜びらん（図示せず））（パネルB）ことを示す。しかしながら、「AK23＋治療」群は、対照健常マウスと同様であった（パネルA及びB）。各コホートについてn=3のデータの代表。パネルCは、AK23コホートが体重減少を示したことを示す。しかしながら、体重増加は、AK23及び治療を受けたマウスにおいて正常であった。パネルDは、72時間時点で採取された血清に対するIL6のELISA分析が、AK23コホートにおいて高レベルのサイトカインを示したが、「AK23＋治療」群において、健常対照と同様であったことを示す。パネルEは、実験の生存分析を示す。全てのAK23マウスは、重度のPVを発症し、7日未満で安楽死させなければならなかった。全ての治療マウスは正常に行動し、生存している（各コホートについてn=3）。

20

30

【0233】

同等物

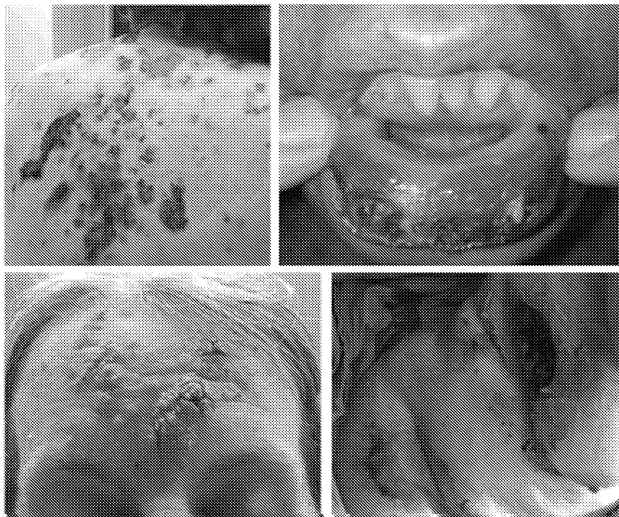
当業者であれば、ルーチンの実験以上のものを使用せずに、本明細書に具体的に記載された特定の物質及び手順に対する多数の同等物を認識するであろう、又は確認できるであろう。このような同等物は、本発明の範囲内であると考えられる。

40

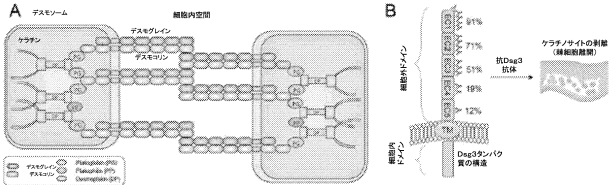
50

【図面】

【図 1】

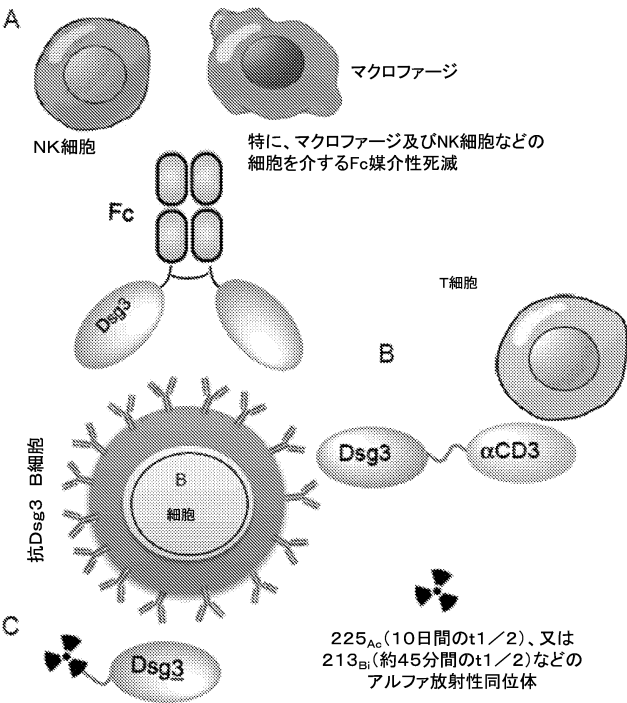


【図 2】

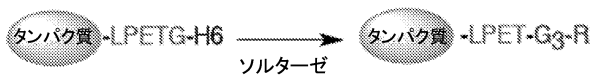


10

【図 3】



【図 4】



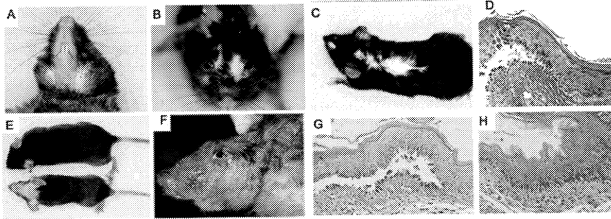
20

30

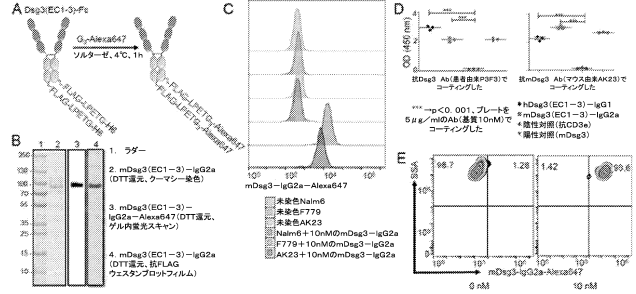
40

50

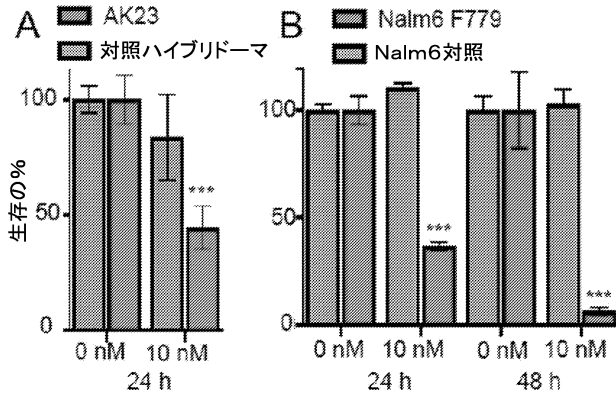
【図 5】



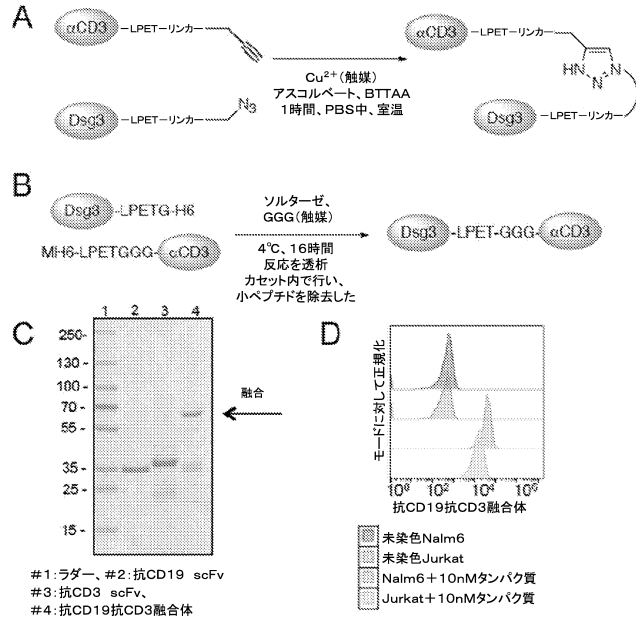
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

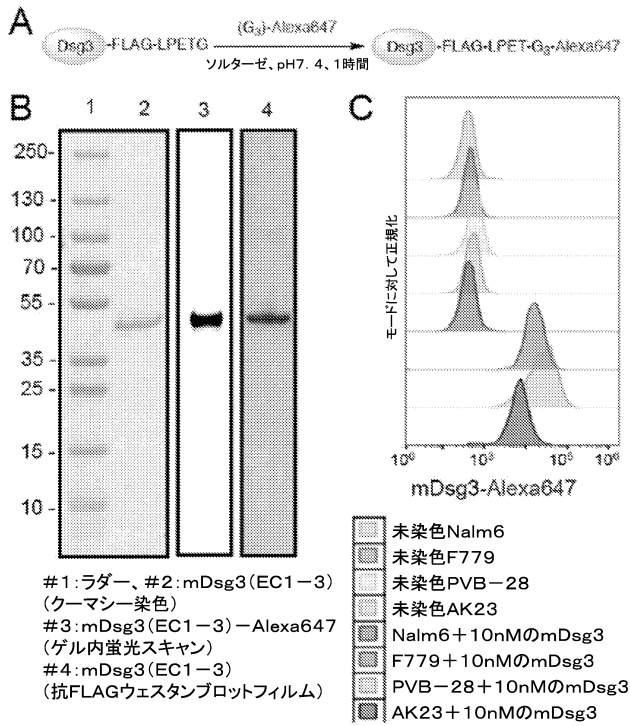
20

30

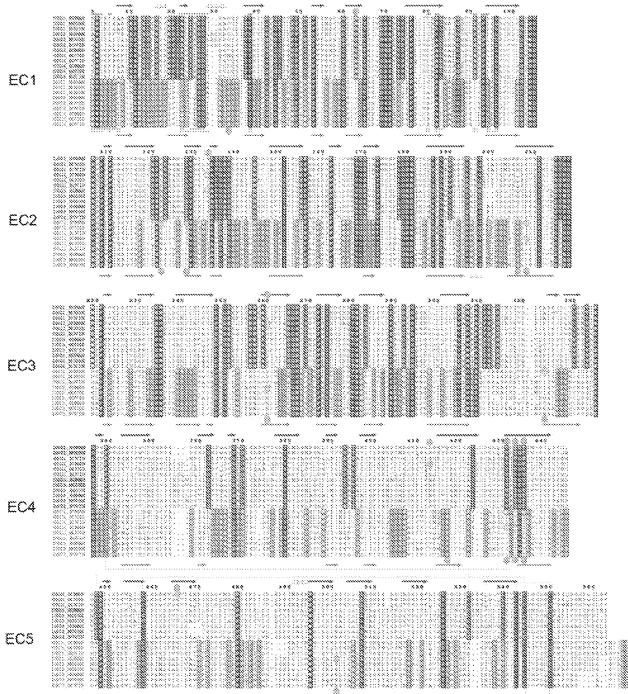
40

50

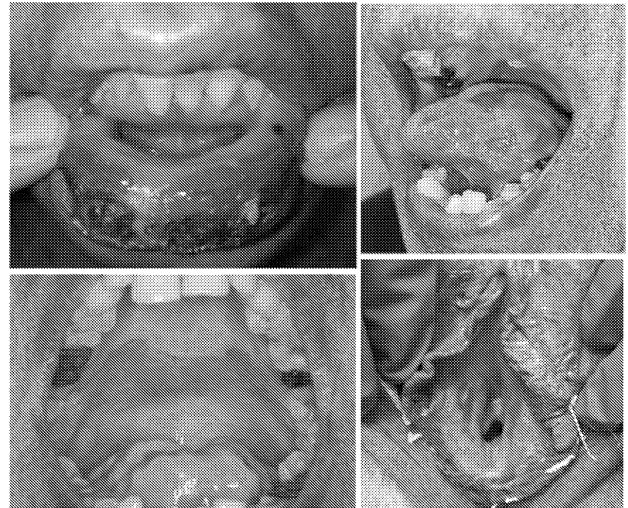
【図 9】



【図 1 3】



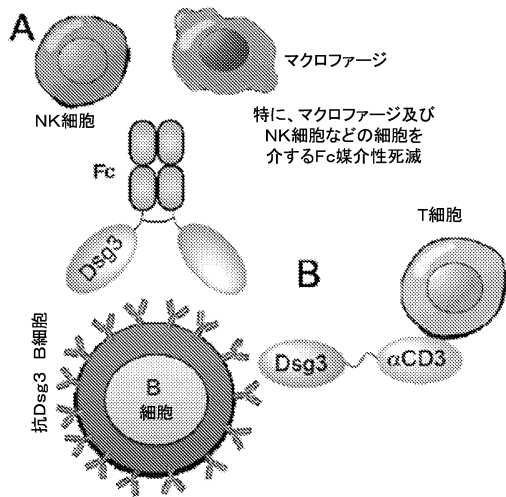
【図 1 4】



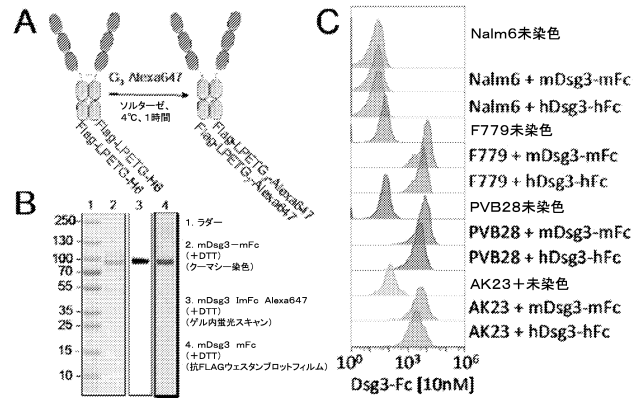
10

20

【図 1 5】



【図 1 6 - 1】

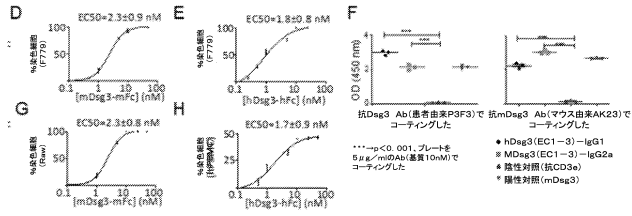


30

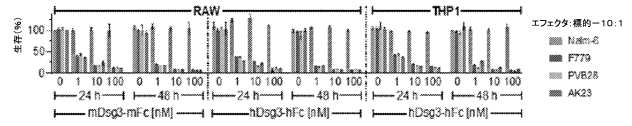
40

50

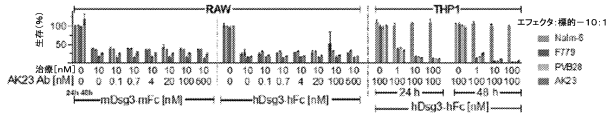
【図 16-2】



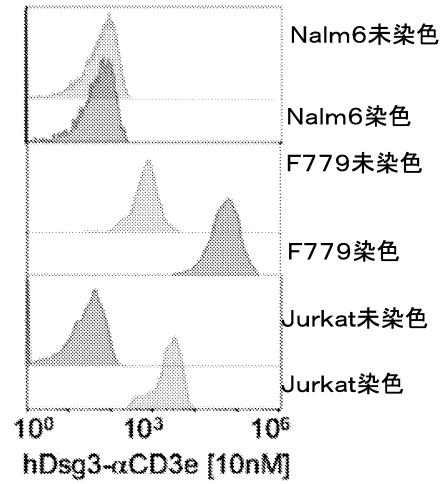
【図 17】



【図 18】



【図 19】



10

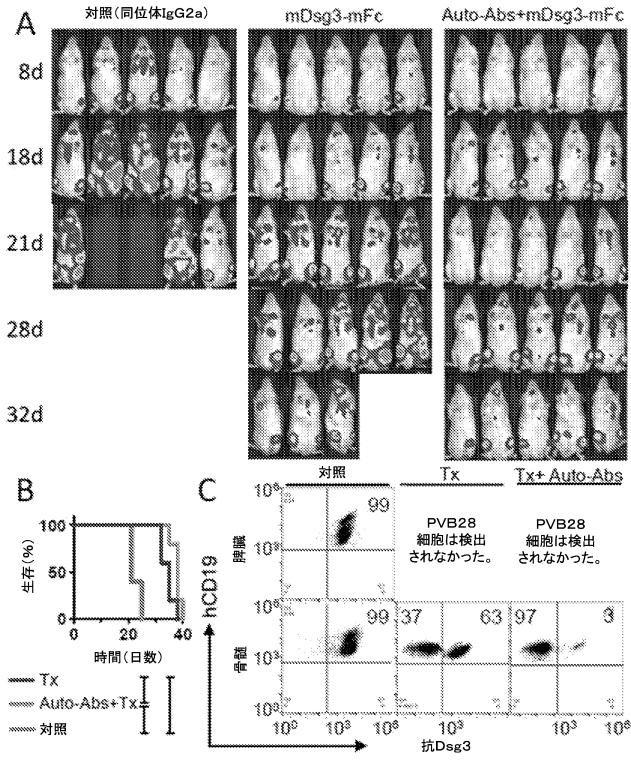
20

30

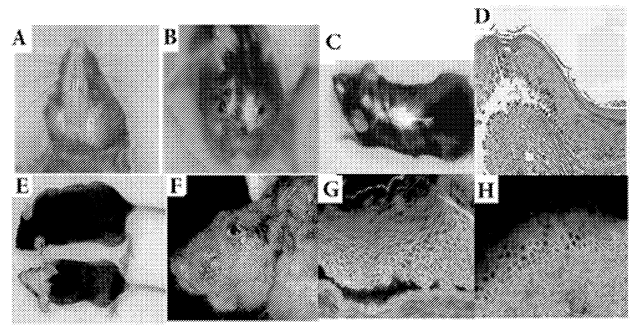
40

50

【図 20】



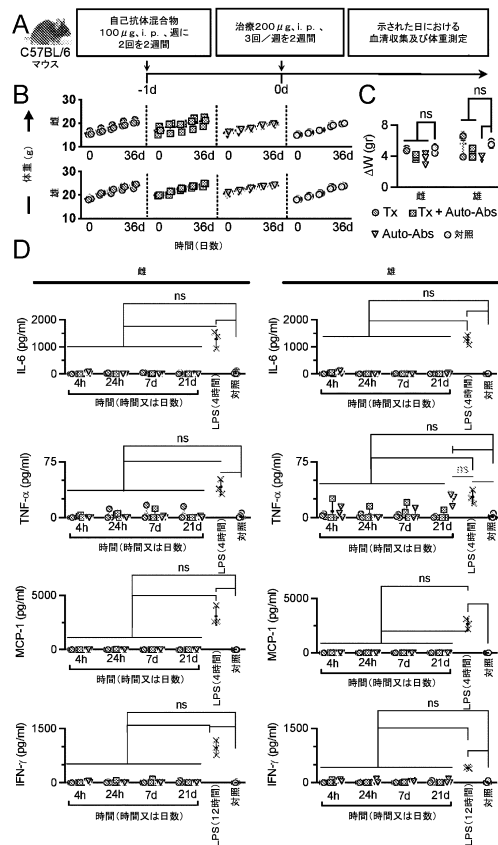
【図 21】



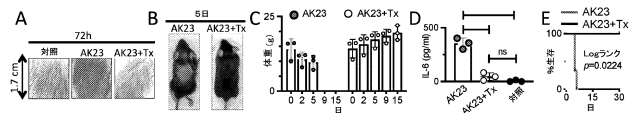
10

20

【図 22】



【図 23】



30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/081559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. **C07K14/705 A61P17/00 A61P37/00**
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61P

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)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LARINA E N ET AL: "Recombinant Fragment of the Extracellular Domain of Human Desmoglein 3 Fused with the Fc-Fragment of Human IgG1 Selectively Adsorbs Autoreactive Antibodies from the Sera of Pemphigus Patients", DOKLADY BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, PLEIADES PUBLISHING, MOSCOW, vol. 498, no. 1, 1 May 2021 (2021-05-01), pages 180-183, XP037494188, ISSN: 1607-6729, DOI: 10.1134/S1607672921030054 [retrieved on 2021-06-29]	1-15, 18-20, 22-25
A	abstract page 245, left-hand column, last paragraph - right-hand column, last line page 183; table 2	16, 17, 21
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

3 May 2023

Date of mailing of the international search report

07/07/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niebuhr-Ebel, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/081559

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUBANOV A A ET AL: "Analysis of the Specificity of Auto-Reactive Antibodies to Individual Fragments of the Extracellular Domain of Desmoglein 3 in Patients with Pemphigus Vulgaris", BULLETIN OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, SPRINGER NEW YORK LLC, US, vol. 171, no. 4, 1 August 2021 (2021-08-01), pages 475-479, XP037575243, ISSN: 0007-4888, DOI: 10.1007/s10517-021-05254-9 [retrieved on 2021-09-20]	1-15, 18-20, 22-25
A	abstract page 476, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 page 478; figure 2 -----	16,17,21
X	EP 2 123 754 A1 (FORERUNNER PHARMA RES CO LTD [JP]) 25 November 2009 (2009-11-25) paragraph [0083] example 2 sequence 84 -----	1-9
X	EP 2 050 466 A1 (FORERUNNER PHARMA RES CO LTD [JP]; UNIV TOKYO [JP]) 22 April 2009 (2009-04-22) page 30; example 3 paragraph [0183] sequence 42 -----	1,2,4-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/081559

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/081559

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.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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:

see additional sheet

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 an 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.:
1-25 (partially)

30

40

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.

50

International Application No. PCT/US2022 /081559

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-25(partially)

A fusion protein comprising an extracellular (EC) domain or part of an EC domain of desmoglein 3 (Dsg3) and an immunoglobulin Fc region or a fragment thereof.

2. claims: 1-25(partially)

A fusion protein comprising an extracellular (EC) domain or part of an EC domain of desmoglein 1 (Dsg1) and an immunoglobulin Fc region or a fragment thereof.

3-18. claims: 26-48(partially)

A fusion protein, comprising an autoreactive antigen; and an Fc portion of an antibody or an antibody, that binds an effector cell, wherein the autoreactive antigen comprises a molecule or fragment of a molecule from the group consisting of desmoplakin, envoplakin, periplakin, plectin, bullous pemphigoid antigen 1, corneodesmosin, microtubule actin crossing-linking factor, epiplakin and cadherin, or wherein the EC domain or B cell epitope thereof is selected from the group of desmosomal cadherins consisting of desmoglein-1 (Dsg1), desmoglein-2 (Dsg2), desmoglein-3 (Dsg3), desmoglein-4 (Dsg4), desmocollin-1 (Dsc1) desmocollin-2 (Dsc2), and desmocollin-3 (Dsc3).

19-20. claims: 49-56(partially)

A fusion protein, comprising an autoreactive B cell epitope from an extracellular portion of a desmoglein or desmocollin protein; and an Fc portion of an antibody that can bind to an Fc-gamma receptor (FcγR), Fc-alpha receptor (FcaR) or Fc-epsilon receptor (FceR)

21-22. claims: 57-72(partially)

A fusion protein, comprising an autoreactive B cell epitope from an extracellular portion of a desmoglein or desmocollin protein; and an antibody that binds an effector cell.

23. claim: 73

A method for connecting a first polypeptide to a second polypeptide, comprising modifying a C-terminus of the first polypeptide to comprise an amino acid sequence Leu-Pro-Glu-Thr-Gly, modifying an N-terminus of the second

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2022/081559

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

polypeptide to comprise an amino acid sequence
Leu-Pro-Glu-Thr-Gly-Gly-Gly; and reacting the modified first
polypeptide and the modified second polypeptide in presence
of a triglycine (Gly-Gly-Gly) and a sortase, such that the
first modified polypeptide and the second modified
polypeptide are connected by the amino acid sequence
Leu-Pro-Glu-Thr-Gly-Gly-Gly.

24. claims: 74-78

An Fc-mediated therapeutic for treating an autoimmune
blistering disease, comprising a first polypeptide
comprising a first autoreactive antigen, and a first CH3
domain from an antibody heavy chain that can preferentially
heterodimerize with a second CH3 domain; and a second
polypeptide comprising a second autoreactive antigen, and
the second CH3 domain from an antibody heavy chain that can
preferentially heterodimerize with the first CH3 domain;
wherein disulfide bonds covalently attach the first
polypeptide and the second polypeptide

25. claims: 79-87

A fusion protein, comprising an allergen, part of the
allergen, or molecule that mimics the allergen; and an Fc
portion of an antibody, or an antibody, that binds an
effector cell.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/081559

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 2123754	A1	25-11-2009	AT 504647 T	15-04-2011
			EP 2123754 A1	25-11-2009
			JP 5299902 B2	25-09-2013
			JP WO2008093688 A1	20-05-2010
			US 2010035280 A1	11-02-2010
			US 2015079610 A1	19-03-2015
			WO 2008093688 A1	07-08-2008

EP 2050466	A1	22-04-2009	AU 2007285217 A1	21-02-2008
			BR PI0713086 A2	09-10-2012
			CA 2658050 A1	21-02-2008
			EP 2050466 A1	22-04-2009
			EP 2548576 A1	23-01-2013
			EP 3111955 A1	04-01-2017
			JP 5317697 B2	16-10-2013
			JP 5651726 B2	14-01-2015
			JP 5972325 B2	17-08-2016
			JP 6162864 B2	12-07-2017
			JP 2013189433 A	26-09-2013
			JP 2015003912 A	08-01-2015
			JP 2016185981 A	27-10-2016
			JP WO2008020586 A1	07-01-2010
			US 2010092457 A1	15-04-2010
			US 2017152314 A1	01-06-2017
			WO 2008020586 A1	21-02-2008

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	51/08	(2006.01)	A 6 1 K	51/08	1 0 0
A 6 1 K	51/10	(2006.01)	A 6 1 K	51/10	1 0 0
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 K	51/08	2 0 0
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	51/10	2 0 0
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 5
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 1 2 N	15/24	(2006.01)	C 0 7 K	14/705	
			C 1 2 N	15/12	
			C 1 2 N	15/13	
			C 1 2 N	15/24	

,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,D
K,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),O
A(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,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI
,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,V
N,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 ラシディアン ムハンマド

アメリカ合衆国 0 2 1 4 1 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ゴア ストリート 1 7 0 アパー
トメント 5 0 9

(72)発明者 タヴァコルプール ソヘイル

アメリカ合衆国 0 2 2 1 5 マサチューセッツ州 ボストン ブルックライン アベニュー 4 5 0
 F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C076 CC07 EE41 EE59 FF34
 4C084 AA02 AA12 AA17 BA41 BA44 DA12 DA13 DA14 NA10 NA14
 ZA361 ZA891 ZB071 ZB081 ZB111 ZB211 ZC541 ZC711
 4C085 AA33 BB36 BB42 DD62 EE01 HH03 HH11 KB82
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 BA57 BA70 BA71 CA40 DA01
 DA02 DA03 DA04 DA50 DA76 DA89 EA20 EA50 FA74

【要約の続き】

