(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-521046
(P2017-521046A)
(43)公表日　平成29年8月3日(2017.8.3)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B065
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4C084
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4C085
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47		4H045
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	Y	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 35 頁）　最終頁に続く

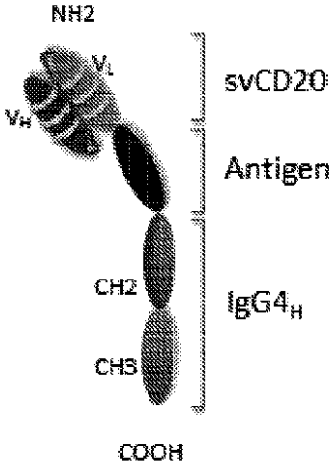
(21)出願番号　特願2016-567011 (P2016-567011)
(86)(22)出願日　平成27年5月7日(2015.5.7)
(85)翻訳文提出日　平成28年12月16日(2016.12.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/029642
(87)国際公開番号　WO2015/171863
(87)国際公開日　平成27年11月12日(2015.11.12)
(31)優先権主張番号　61/990,456
(32)優先日　平成26年5月8日(2014.5.8)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500213720
ザ・ヘンリー・エム・ジャクソン・ファンデイション・フォー・ジ・アドヴァンスメント・オヴ・ミリタリー・メディシン、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　２０８１７　メリーランド州,　ベセスダ,　ロックレッジ　ドライブ　６７２０－Ａ,　スイート　１００
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100122389
弁理士　新井　栄一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】有害な免疫応答を処置するための寛容原性タンパク質療法としてのＢ細胞標的化抗原ＩｇＧ融合物の使用

(57)【要約】
本発明は一般に、抗原特異的寛容原性タンパク質療法ならびに多発性硬化症(MS)および血友病などの自己免疫疾患と関連するものなどの、有害な免疫応答を処置するためのその使用に関する。特に、本発明は、単独での、または阻害抗体と組み合わせた、抗原特異的寛容原性タンパク質療法としてのB細胞標的化IgG融合タンパク質の適用を含む。融合タンパク質は、B細胞特異的標的化モジュール、ヒトIgG4重鎖の定常領域またはその断片、および抗原を含む。
【選択図】　図２Ｂ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原、IgG重鎖定常領域またはその断片、およびB細胞表面標的化分子を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。
【請求項２】
前記IgG重鎖定常領域が改変されたヒトIgG4重鎖定常領域である、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項３】
前記融合タンパク質がB細胞枯渇効能を示さない、請求項２に記載の単離された核酸分子。
【請求項４】
前記IgG4重鎖定常領域がヒンジ領域またはCH1領域を欠く、請求項３に記載の単離された核酸分子。
【請求項５】
前記B細胞表面標的化分子が抗CD20一本鎖可変断片または抗CD19一本鎖可変断片である、請求項４に記載の単離された核酸分子。
【請求項６】
前記B細胞表面標的化分子が、抗CD20可変軽鎖領域に連結された抗CD20可変重鎖領域を含むヒト化抗CD20一本鎖可変断片である、請求項５に記載の単離された核酸分子。
【請求項７】
前記重鎖および軽鎖領域が、アミノ酸配列$(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_3$(配列番号１)を含むリンカーを介して連結される、請求項６に記載の単離された核酸分子。
【請求項８】
前記タンパク質抗原が、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、プロテオリピドタンパク質(PLP)、第VIII因子C2ドメイン、第VIII因子A2ドメイン、またはFVIIIドメインの断片からなる群から選択される、請求項７に記載の単離された核酸分子。
【請求項９】
請求項８に記載の核酸分子を含む発現ベクター。
【請求項１０】
請求項９に記載の発現ベクターまたは請求項８に記載の単離された核酸分子を含む宿主細胞。
【請求項１１】
タンパク質抗原、IgG重鎖定常領域またはその断片、およびB細胞表面標的化分子を含む融合タンパク質。
【請求項１２】
前記IgG重鎖定常領域が、ヒンジ領域またはCH1領域を欠く改変されたヒトIgG4重鎖定常領域である、請求項１１に記載の融合タンパク質。
【請求項１３】
前記B細胞表面標的化分子が抗CD20一本鎖可変断片または抗CD19一本鎖可変断片である、請求項１２に記載の融合タンパク質。
【請求項１４】
前記B細胞表面標的化分子が、抗CD20可変軽鎖領域に連結された抗CD20可変重鎖領域を含むヒト化抗CD20一本鎖可変断片である、請求項１３に記載の融合タンパク質。
【請求項１５】
前記タンパク質抗原が、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、プロテオリピドタンパク質(PLP)、第VIII因子C2ドメイン、第VIII因子A2ドメイン、またはFVIIIドメインの断片からなる群から選択される、請求項１４に記載の融合タンパク質。
【請求項１６】

請求項１１に記載の融合タンパク質を個体に投与することによって前記個体において内因性タンパク質に対する寛容原性を誘導する方法。
【請求項１７】
請求項１に記載の単離された核酸分子を個体に投与することによって前記個体において内因性タンパク質に対する寛容原性を誘導する方法。
【請求項１８】
B細胞枯渇剤を投与することをさらに含む、請求項１６または１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記B細胞枯渇剤が全ての型のB細胞の量を減少させる、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記B細胞枯渇剤がリツキシマブまたは等価物である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
前記B細胞枯渇剤が、濾胞性B細胞の量を選択的に減少させ、辺縁帯B細胞の量を減少させないか、または濾胞性B細胞より少ない程度で辺縁帯B細胞の量を減少させる、請求項１８に記載の方法。
【請求項２２】
前記B細胞枯渇剤がヒトと等価なマウスIgG1アイソタイプ抗CD20モノクローナル抗体である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記内因性タンパク質がMBP、MOG、PLP、第VIII因子C2ドメインおよび第VIII因子A2ドメインからなる群から選択される、請求項１６に記載の方法。
【請求項２４】
前記内因性タンパク質がMOGであり、かつ前記抗原がMOGのアミノ酸残基35～55を含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記個体が多発性硬化症と診断されている、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
前記個体が以下の疾患の1つ、ブドウ膜炎、1型糖尿病、関節炎、重症筋無力症、血友病AまたはBおよび多発性硬化症と診断されているが、ポンペ病などの単一酵素欠損症のためにも使用することができる、請求項１６または１７に記載の方法。
【請求項２７】
コードされた融合タンパク質が、N末端からC末端に向かって、B細胞表面標的化分子、抗原、およびIgG重鎖定常領域またはその断片を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項２８】
N末端からC末端に向かって、B細胞表面標的化分子、抗原、およびIgG重鎖定常領域またはその断片を含む、請求項１１に記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、35 USC§119(e)の下で、2014年5月8日に出願された米国特許仮出願第61/990,456号(その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)に対する利益を主張する。
【０００２】
配列表
本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含有し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2015年5月1日に作製された前記ASCIIコピーは、103783-0181_SL.txtのファイル名であり、27,626バイトのサイズである。
【０００３】

発明の分野

本発明は一般に、抗原特異的寛容原性タンパク質療法ならびに多発性硬化症(MS)などの自己免疫疾患と関連するもの、および血友病における治療タンパク質に対する抗体応答を含む、有害な免疫応答を処置するためのその使用に関する。特に、本発明は、単独での、または例えば、阻害抗体と組み合わせた、抗原特異的寛容原性タンパク質療法としてのB細胞標的化IgG融合タンパク質の適用を含む。

【背景技術】

【０００４】

B細胞は、多発性硬化症の病理において複数の役割を果たし得る。現在の証拠は、B細胞がMSの病因に有意に寄与するが、調節機能をも有し得ることを示唆する(以下を参照されたい)。B細胞は、CNS特異的病原性抗体を産生することによって、ならびにCNS抗原特異的B細胞により媒介される病原性抗原提示を介して、またはCNSにおいて局所的に抗体依存的細胞性細胞傷害性(ADCC)を介して、これを行うことができる。MS病因におけるB細胞の役割に関する最も直接的な証拠は、リツキシマブを用いるB細胞枯渇療法が第II相臨床試験中の数人の再発-寛解型多発性硬化症患者において有益であることがわかったということである[1]。

【０００５】

しかしながら、B細胞の完全な非存在は、感染性因子に対する正常な免疫応答に大きく影響する。より重要なことは、異なるサブセットのB細胞が、異なる免疫機能を有することが示されているということである。例えば、ナイーブな休止B細胞による抗原提示は、寛容原性であり得る。実際、この機構は、生理的条件において末梢寛容を維持するのに重要な役割を果たし得る[2]。さらに、いくつかのB細胞サブセットは、調節機能を有することが最近判明し、これらのB細胞の枯渇は意図しない結果を有し得る[3]。したがって、リツキシマブのような試薬を用いた完全なB細胞の枯渇を、多発性硬化症のような自己免疫疾患のために再考または改変する必要がある。

【０００６】

以前に、IgG1アイソタイプ抗マウスCD20 mAbがB細胞を部分的に枯渇させることが見出された[4、5]。それは濾胞性(FO)B細胞を完全に枯渇させるが、辺縁帯(MZ)B細胞を大きく使わず、寛容誘導を支持することができる[5]。そのような部分的なB細胞枯渇は、多発性硬化症における治療効果を潜在的に改善することができる。本発明に関する他の先例は、多発性硬化症のためのCNSタンパク質またはペプチドIgG融合構築物などの自己免疫疾患のための動物モデルにおける「操作された抗原-IgG融合物を用いる寛容誘導のためのB細胞遺伝子療法手法」の以前の前臨床適用の成功である[6、7]。

【０００７】

上記のように、B細胞は多発性硬化症(MS)における病因的役割を有し得るが、抗CD20 mAb薬を用いる完全なB細胞枯渇は、最良の戦略ではない：それは特異性を欠き、感染のような重篤な副作用を引き起こし得る。さらに、CNS抗原に対する自己寛容は、それ自体、完全なB細胞枯渇によっては単純に回復しない。

【０００８】

MSは、Th1及びTh17 T細胞媒介性自己免疫疾患であると伝統的に考えられてきたが、CD8及び他のエフェクター細胞も関与し得る。現在利用可能な疾患修飾薬の多くはT細胞に焦点を当てたものであり、全身免疫抑制を引き起こし得る。しかしながら、MSの基礎となる免疫病因は、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)またはプロテオリピドタンパク質(PLP)などのCNSミエリン抗原に対する末梢寛容の破壊に起因するものである可能性がある。かくして、CNS抗原に対する自己寛容を再確立するための信頼できる方法が、この疾患を処置するために必要である。

【０００９】

最近では、いくらかの再発-寛解型MS患者において、ヒト化抗CD20 mAbにより媒介されるB細胞枯渇療法の有益な効果に一部起因して、MSの病因におけるB細胞の寄与が注目されている[1]。しかしながら、リツキシマブを用いる完全なB細胞枯渇は、上記で考察されたよ

うに、MSの処置のための最良の戦略ではない。完全なB細胞枯渇は、特異的ではなく、感染に対する感受性の増大などの重篤な副作用を引き起こし得る。さらに、有益なB細胞(例えば、調節機能を有するB細胞)の枯渇は、意図しない結果を有し得る。理想的には、有益なものを使わないでおきながら、病原性B細胞を枯渇させる選択的なB細胞枯渇剤が、より良好な選択である。

【００１０】

大規模な証拠が、B細胞は成熟樹状細胞(DC)による抗原提示と比較して、優れた寛容原性抗原提示細胞であることを示唆する。例えば、Lassilaら[11]は、APCとしての休止B細胞がin vivoで休止T細胞を活性化することができないことを初めて示した。同様に、Eynon及びParker[12]は、APCとして用いられる休止B細胞がウサギIgGに対する寛容をもたらすことを証明した。その後、モデル抗原としてオス特異的H-Y抗原を用いて、Fuchs及びMatzinger[13]は、休止B細胞と活性化B細胞の両方を、寛容原性APCとして用いて、ナイーブなマウスにおいて、特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答の停止させることができることを証明した。さらに、特定のサブセットのB細胞(すなわち、MZ B細胞)は、眼などの、免疫特権部位を介して誘導される全身的寛容表現型にとって必要であることが示された[14]。

【００１１】

ここ10年の間にScottのグループによって有効に用いられた1つの手法は、抗原特異的寛容誘導のために形質導入されたB細胞を用いるものである(図1)。しかしながら、MSのような自己免疫疾患を有する患者におけるレトロウイルスベクター媒介性遺伝子導入に対する正当な安全性の関心がある。

【００１２】

MSは、主としてCD4+Th1及びTh17媒介性CNS自己免疫疾患と長く考えられてきたが、他のリンパ球サブセットも関与してきた。かくして、現在の療法は、T細胞活性の改変に焦点を当てる免疫抑制薬を含むことが多い。第II相二重盲検臨床試験における再発-寛解型MS患者においてリツキシマブを用いるB細胞枯渇療法の有益な効果に一部起因して、MSの病因におけるB細胞の重要な寄与が注目されるようになったのはほんの最近のことである[1]。しかしながら、現在の治療戦略は、一般に、疾患を引き起こすCNS抗原に対する自己寛容を再確立するための方法を欠く。

【００１３】

血友病は、2番目に最も一般的な先天性出血障害であり、関節レベルでの頻繁な出血を特徴とし、軟骨線維症、関節腔の喪失、および衰弱をもたらす。血友病は、膝、足首、臀部、肩、肘に影響し、閉鎖空間への出血は致命的となり得る。現在の処置方法は、通常は出血に応答した、組換えまたは血漿由来凝固因子濃縮物の輸注からなる。25%を超える血友病A患者が、凝固を阻害する治療的FVIIIに対する抗体を作る。そのような従来の療法は、患者の生涯にわたる凝固因子の頻繁な注射／輸注を必要とし、非常に高い費用と関連する。

【００１４】

したがって、有害な免疫応答を処置する際の新規で有効な療法を開発することが当業界で必要である。

【発明の概要】

【００１５】

本発明は、B細胞標的化IgG融合タンパク質および有害な免疫応答の処置における抗原特異的寛容原性タンパク質療法として前記融合タンパク質を用いる方法を提供する。

【００１６】

本発明の一態様は、本明細書に記載されるような、抗原、IgG重鎖定常領域またはその断片と、B細胞表面標的化分子とを含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。前記核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞も提供される。

【００１７】

融合タンパク質は、改変されたヒトIgG4重鎖定常領域であるIgG重鎖定常領域を含んで

もよい。いくつかの実施形態においては、IgG4重鎖定常領域は、ヒンジ領域を欠く。他の実施形態においては、IgG4重鎖定常領域は、CH1領域を欠く。これらの実施形態によれば、抗原を、IgG4部分のヒンジ領域によってIgG4重鎖骨格に結合させることができる。

【００１８】

いくつかの実施形態においては、融合タンパク質は、B細胞枯渇効能を示さない。

【００１９】

いくつかの実施形態においては、融合タンパク質のB細胞表面標的化分子は、抗CD20一本鎖可変断片、抗CD19一本鎖可変断片、抗CD22一本鎖可変断片、または抗CD23一本鎖可変断片である。例えば、B細胞表面標的化分子は、抗CD20、抗CD19、抗CD22、または抗CD23可変軽鎖領域に連結された抗CD20、抗CD19、抗CD22、または抗CD23可変重鎖領域を含むヒト化抗CD20、抗CD19、抗CD22、または抗CD23一本鎖可変断片であってもよい。

【００２０】

いくつかの実施形態においては、重鎖領域と軽鎖領域を、アミノ酸配列（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)$_3$(配列番号1)を含むリンカーなどの、リンカーを介して連結する。いくつかの実施形態においては、同じ型のリンカーを用いて、融合タンパク質の部分を連結する、例えば、同じ型のリンカーを用いて、抗原をIgG部分に、IgG部分をB細胞表面標的化分子に連結する。

【００２１】

融合タンパク質の抗原部分は、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、プロテオリピドタンパク質(PLP)、第VIII因子C2ドメイン、第VIII因子A2ドメイン、およびその断片からなる群から選択される抗原などの、処置される状態に応じて、任意の好適な標的抗原であってもよい。

【００２２】

融合タンパク質の成分は、抗原、IgG部分、およびB細胞表面標的化分子の相対部分に関して異なる構成を有してもよい。いくつかの実施形態においては、融合タンパク質は、N末端からC末端に向かって、B細胞表面標的化分子、IgG4部分、および抗原（ScFv-IgG4H-抗原)を含む。他の実施形態においては、融合タンパク質は、N末端からC末端に向かって、B細胞表面標的化分子、抗原、およびIgG4部分(ScFv-抗原-IgG4H)を含む。

【００２３】

本発明の別の態様は、本発明の融合タンパク質または本発明の単離された核酸分子を個体に投与することにより、前記個体における内因性タンパク質に対する寛容原性を誘導する方法を提供する。いくつかの実施形態においては、前記方法は、B細胞枯渇剤を投与することをさらに含む。B細胞枯渇剤は、全ての型のB細胞の量を減少させることができる。いくつかの実施形態においては、B細胞枯渇剤は、リツキシマブである。

【００２４】

いくつかの実施形態においては、B細胞枯渇剤は、濾胞性B細胞の量を選択的に減少させ、辺縁帯B細胞の量を減少させないか、または辺縁帯B細胞の量を濾胞性B細胞より低い程度で減少させる。いくつかの実施形態においては、B細胞枯渇剤は、ヒトと等価なマウスIgG1アイソタイプ抗CD20モノクローナル抗体である。

【００２５】

いくつかの実施形態においては、MBP、MOG、PLP、第VIII因子C2ドメインおよび第VIII因子A2ドメインからなる群から選択される内因性タンパク質に対する寛容原性が誘導される。

【００２６】

いくつかの実施形態においては、内因性タンパク質はMOGであり、投与される融合タンパク質の抗原はMOGのアミノ酸残基35～55を含む。他の実施形態においては、内因性タンパク質は第VIII因子であり、投与される融合タンパク質の抗原は第VIII因子のアミノ酸残基2191～2210を含む。

【００２７】

いくつかの実施形態においては、本発明の方法を、多発性硬化症(抗原としてMOG、MBP

、PLPなどを用いる)、ブドウ膜炎(抗原としてS抗原、光受容体間レチノイド結合タンパク質(IRBP)などを用いる)、1型糖尿病(抗原としてグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質(IGRP)などを用いる)、重症筋無力症(抗原としてアセチルコリン受容体アルファ(AChRα)などを用いる)、血友病AもしくはB(抗原として第VIII因子もしくは第IX分子を用いる)またはポンペ病などの単一酵素欠損症(抗原として酸アルファ-グルコシダーゼ(GAA)などを用いる)と診断された個体において用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１】進行中のEAEに対するMBP-IgGをレトロウイルスで形質導入されたプライミングされたB細胞を用いる遺伝子療法の効果を示す図である。プロトコール：MBPで免疫されたマウスに由来する脾臓およびリンパ節細胞を拡張し、ナイーブな同系レシピエントに導入し、MBP/CFA + 百日咳毒素でさらに追加免疫して、疾患発生の増大を確保した。導入の3日後、マウスは、治療プロトコールにおいてMBP-Igを形質導入されたB細胞を受けた。次いで、レシピエントマウスを、EAE症状について毎日モニタリングし、平均疾患スコアを算出した(Meloら、「Gene transfer of Ig-fusion proteins into B cells prevents and treats autoimmune diseases」、J. Immunol. 168: 4788-4795 (2002)から改変した)。

【図２Ａ】例示的なB細胞特異的抗原IgG寛容原の略図である。一本鎖抗CD20 mAb(VH-リンカー-VL)を、ヒトIgG4重鎖定常領域のN末端上で操作する。抗原を、IgG4 CH3ドメインのC末端上に融合する。場合により、CH1とCH2ドメインの間のヒンジを、突然変異誘発により欠失させる。

【図２Ｂ】例示的なB細胞特異的抗原IgG寛容原の略図である。抗CD20一本鎖可変断片(svCD20)を、抗原-IgG4H融合物のN末端に操作し、抗原ドメインを、CH1領域を欠くIgG4のヒンジ領域によりIgG4H骨格と接続する。

【図３】寛容誘導における調節エピトープ(Tレギトープ)の作用および役割の提唱される機構を示すダイアグラムである(De Grootら、Blood 112: 3303-11 (2008)から)。

【図４】PCRクローニングの結果を示す図である。陽性クローンからのミニプレップDNAを、制限分析を用いてスクリーニングした。挿入物の予想サイズを示した。図4A：$OVA_{323-339}$(抗原特異的対照)およびMOG_{35-55}を、SpeIおよびNotI制限部位を用いてpBSKSベクター中に上手くサブクローニングした。図4B：eGFPおよびsvCD20を、それぞれ、SpeI/NotIおよびHindIII/EcoRI制限部位を用いてpBSKSベクター中にサブクローニングした。図4C：hIgG4Hを、ヒト抗FVIII IgG4抗体産生株(2C11)から上手くPCRクローニングし、EcoRIおよびSpeI制限部位を用いてpBSKSベクター中にサブクローニングした。図4D：完全長挿入物を含有するサブクローニングベクターの制限分析。ミニプレップDNAを、推定pBSKS-svCD20-IgG4H-Xベクターのためのコロニーから調製した。次いで、DNAをHindIIIおよびNotI制限酵素の両方で消化した後、2.0%アガロースゲル電気泳動を行った。レーン1：100bpのDNAラダー；レーン2：pBSKS-svCD20-IgG4H-MOG_{35-55}；レーン3～5：pBSKS-svCD20-IgG4H-$OVA_{323-339}$；レーン6および７：pBSKS-svCD20-IgG4H-GFP。線状化された空のpBSKSベクターのサイズは、約3.0kbである。写真中に示される、完全長挿入物の予想サイズは、それぞれ、1828、1816、および2485bpである。

【図５】BAIT発現カセットの略図である。寛容原性抗原提示のための抗原-IgGのB細胞特異的送達を達成するために、B細胞の特異的表面マーカーに対する一本鎖可変断片(ScFv)を、融合物のN末端上に操作した。mBAIT融合物は、抗マウス抗体配列に基づくものである。クローニングおよびタンパク質発現を容易にするために、市販のベクター、pFuse-hIgG$_4$-Fc2(Invitrogen)を用いた。ScFv-抗原断片を、示されるようなEcoR1およびEcoRV制限部位を用いて、IL-2シグナル配列とヒトIgG$_4$ヒンジの間でpFuse-hIgG$_4$-Fc2ベクター中にクローニングした。用いた抗原の例としては、ペプチド$FVIII_{2191-2210}$およびMOG_{35-55}、ならびにFVIII C2およびA2ドメインが挙げられる。$OVA_{323-339}$またはOVAを含有するBAITを、抗原特異性対照として用いた。この図面中のG4Sリンカーは、配列番号33に記載される。

【図６】図６Ａ：EcoRIおよびBamHIによるpUC57-svCD19-MOG_{35-55}ベクターの制限分析を示す図である。挿入物の予想サイズは、約817bpである。図６Ｂ：EcoRIおよびEcoRVを用いる制限分析によるpFuse-msvCD19-MOG_{35-55}(pFuse-mBAIT-MOG_{35-55})のためのコロニーのスクリーニングを示す図である。挿入物の予想サイズは、約817bpである。5つのスクリーニングされたコロニーのうちの4つが陽性であった。最初のコロニーからのプラスミドDNAを、さらなる分析および実験のために選択する。

【図７】図７Ａ：中間ベクターpUC57-svCD20-$FVIII_{2191-2210}$および pUC27-svCD20-$OVA_{323-339}$の制限分析を示す図である。EcoRI/BamHI断片は、それぞれ、約829bp(レーン2)および約820bp(レーン3)であった。次いで、挿入物をゲル精製し、EcoRI/BglIIで消化されたpFuse-hIgG4-Fc2発現ベクター中にクローニングした。図７Ｂ：EcoRIおよびNcoIを用いる制限分析によるpFuse-BAITベクターのスクリーニングを示す図である。挿入物の予想サイズは、約744bpである。スクリーニングした全てのコロニーは、正しいサイズの挿入物を含有していた。最初のそれぞれのスクリーニングされたpFuse-BAITベクターからのプラスミドDNAを、さらなるトランスフェクションおよびタンパク質発現分析のために選択した。図７Ｃ：BAIT-$FVIII_{2191-2210}$および BAIT-$OVA_{323-339}$発現のウェスタンブロット分析を示す図である。CHO細胞に、pFuse-BAIT-$FVIII_{2191-2210}$または BAIT-$OVA_{323-339}$プラスミドDNAをトランスフェクトした。トランスフェクションの48h後に上清を収集し、NuPage 4～12%Bis-Trisゲル中でのウェスタンブロットにより、タンパク質発現を分析した。還元条件下で、ただ1つの主要バンドが両タンパク質について約56KDのサイズで検出された。BAIT融合タンパク質の大部分が、非還元条件を用いるウェスタンブロットにより示されるように、ポリマーの形態にあった。用いたブロッティング抗体は、モノクローナル抗ヒトIgG(λ鎖特異的)抗体およびHRPウサギ抗マウスIgG(H+L)抗体であった。

【図８】図８Ａ：安定にトランスフェクトされたCHO細胞株の細胞増殖曲線を示す図である。図８Ｂ：還元条件下のNuPage 4～12%Bis-Trisゲル中での安定にトランスフェクトされたCHO細胞からの上清試料のウェスタンブロット分析を示す図である。

【図９】CD20+ヒトB細胞株であるRaji細胞への BAIT-$FVIII_{2191-2210}$の結合を示す図である。Raja細胞(5x10^5個)を、37℃で1時間、1μgの精製された$BAIT_{hCD20}$-$FVIII_{2191-2210}$と共にインキュベートした。次いで、細胞を、BAITのヒトIgG4 Fc領域を認識するAPC抗ヒトIgGで染色した。細胞を、ライブシングレット(live singlet)上でゲート化した。

【図１０】特異的CD4+エフェクターT細胞の増殖応答に対するBAITのB細胞提示の効果を示す図である。図10Aは、BAIT融合物の$FVIII_{2191-2210}$エピトープが活性化ヒトB細胞によって適切にプロセッシングされ、特異的T細胞に提示されたことを示す。HLA DR1/DR2ドナーからのヒトB細胞を、抗CD19磁気ビーズ(Miltenyi)を用いて精製し、2μg/mlのCD40L + 10ng/mlのIL-4で3日間活性化させた。次いで、活性化されたB細胞を、1μg/mlのBAIT-$FVIII_{2191-2210}$、$BAIT_{hCD20}$-$OVA_{323-339}$、または組換えFVIIIの非存在下または存在下、5:1の比で増殖染料eFluor 450標識17195 Tエフェクターと共に同時培養した。3日後、17195 Tエフェクターの増殖状態を、eFluor 450蛍光の希釈に基づく流動により評価した。図10Bは、$BAIT_{hCD20}$-$FVIII_{2191-2210}$またはFVIIIでパルスした休止B細胞が特異的T細胞の増殖応答を支援しなかったことを示す。HLA DR1/DR2ドナーからの精製されたヒトB細胞を、1μg/mlの$BAIT_{hCD20}$-$FVIII_{2191-2210}$、$BAIT_{hCD20}$-$OVA_{323-339}$、または組換えFVIIIの非存在下または存在下、5:1の比で標識された17195 Tエフェクターと共に直接同時培養した。17195 Tエフェクターの増殖応答を、上記のように評価した。図10Cは、$BAIT_{hCD20}$-$FVIII_{2191-2210}$でパルスしたヒトPBMCが特異的T細胞の増殖応答を支援しなかったことを示す。HLA DR1/DR2ドナーからのヒトPBMCを、5μg/mlの$BAIT_{hCD20}$-$FVIII_{2191-2210}$もしくは$BAIT_{hCD20}$-$OVA_{323-339}$、または1μg/mlの組換えFVIIIの非存在下または存在下、20:1の比で標識された17195 Tエフェクターと共に同時培養した。17195 Tエフェクターの増殖応答を、上記のように評価した。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

本発明は、単独での、または例えば、阻害抗体と一緒の、有害な免疫応答の処置におけ

る抗原特異的寛容原性タンパク質療法としてのB細胞標的化IgG融合タンパク質の適用に関する。融合タンパク質は、B細胞特異的CNS抗原IgG融合寛容原（「BAIT」）である。具体的には、本発明は、自己免疫疾患および血友病などにおける有害な免疫応答を処置するための寛容原性タンパク質療法としてB細胞特異的(標的化)抗原IgG融合物を使用する方法を提供する。寛容効果は、抗原提示細胞としてB細胞のみを使用することにより達成され、免疫調節効果を有する、融合タンパク質中へのIgG分子の一部の含有により寄与される。これは、例えば、多発性硬化症の病理に関与するB細胞系列を標的化する治療剤の開発と関連する新規治療戦略である。

【００３０】

本発明の態様はMSの文脈で以下に考察されるが、本発明は他の疾患および有害な免疫応答と関連する状態の処置における使用のために設計された融合タンパク質（ならびにそれをコードする核酸分子、およびそれを使用する方法）を包含することが理解されるべきである。

【００３１】

寛容原性BAITタンパク質の３つの例示的態様は、(1)B細胞特異的標的化モジュール(抗CD20一本鎖抗体(svCD20)など)；(2)ヒトIgG4重鎖の定常領域(場合により、ヒンジが欠失した)；および(3)CNS抗原、例えば、MOG_{35-55}などの抗原を含んでもよい。

【００３２】

寛容原性目的のための存在する融合タンパク質と比較して、本発明の特定の特徴は、限定されるものではないが、以下のものを含んでもよい。第1に、本発明の融合タンパク質は、B細胞のみを標的化することができる。これは、例えば、抗ヒトCD20一本鎖抗体(または他のB細胞標的化部分)を融合物中に操作することにより達成される。第2に、融合物が他の抗CD20ヒト化抗体のようにB細胞枯渇効能を有さず、それが補体を固定しないように、融合物のIgG重鎖部分を操作することができる。これは、他の免疫原性抗原提示細胞による抗原の捕捉を防止するのに役立つ。第3に、この融合物の適用は、リツキシマブのような、他の臨床的に使用されるB細胞枯渇剤との組合せにあってもよい。そのような実施形態においては、伝統的なB細胞枯渇療法は、病原性B細胞を一時的に除去する。新しく出現したナイーブなB細胞が、寛容原性抗原提示を媒介するために理想的であり得る。

【００３３】

本発明の態様は、IgGの寛容原性に基づく担体としての同種(自己)免疫グロブリン；IgG重鎖足場のN末端での、操作された標的タンパク質、例えば、自己抗原またはFVIIIドメイン；および融合タンパク質を産生するか、または提示し、寛容原性APCとして作用する、形質導入された休止または活性化B細胞の使用を含む。

【００３４】

B細胞表面標的化分子

BAIT融合タンパク質は、例えば、CD20、-CD19、またはCD23標的化に基づいてもよい、B細胞表面標的化分子を含む。いくつかの実施形態においては、BAIT融合タンパク質は、抗CD19、抗CD20、抗CD22または抗CD23からなる群から選択されるB細胞特異的mAbを含む。かくして、BAIT融合タンパク質は、B細胞表面標的化一本鎖抗体(例えば、svCD19、svCD20、svCD22、svCD23)を含んでもよい。そのような融合タンパク質を、寛容原性抗原提示のためにナイーブな休止B細胞および/または辺縁帯B細胞によりプロセッシングすることができる。以下により詳細に考察されるように、調節的T細胞誘導を増強することができる、BAIT融合タンパク質中にヒトIgG重鎖の定常領域を含有させることにより、寛容原性効果がさらに促進される[8]。抗CD20 B細胞枯渇剤を用いることなどにより、FO B細胞を前もって一時的に枯渇させることにより、ナイーブな休止および/またはMZ B細胞へのBAIT融合タンパク質の選択的標的化を容易にすることができる。この新しい戦略を用いれば、疾患症状を軽減することができるだけでなく、元凶であるCNS自己抗原に対する末梢寛容を回復させることもできる。

【００３５】

いくつかの実施形態においては、B細胞表面標的化分子は、抗CD20一本鎖可変断片、抗C

D19一本鎖可変断片、抗CD22一本鎖可変断片、または抗CD23一本鎖可変断片である。B細胞表面標的化分子は、抗CD20、抗CD19、抗CD22、または抗CD23可変軽鎖領域に連結された抗CD20、抗CD19、抗CD22、または抗CD23可変重鎖領域を含むヒト化抗CD20、抗CD19、抗CD22、または抗CD23一本鎖可変断片であってもよい。

【００３６】

本明細書に記載の融合タンパク質において有用な一本鎖抗体の配列は、配列表に例示され、これは抗マウスSvCD19(元の配列)(配列番号2)および抗マウスSvCD19(CHO細胞中での発現のためにコドン最適化された)(配列番号3)のDNA配列およびその翻訳物(配列番号4)；ならびに抗ヒトSvCD20配列(元の配列)(配列番号5)および抗ヒトSvCD20(CHO細胞中での発現のために改変およびコドン最適化された)(配列番号6)のDNA配列およびその翻訳物(配列番号7)を含む。融合タンパク質中でのB細胞表面標的化分子としての使用のために一本鎖抗体のこれらのおよび他の配列をコドン最適化することは、当業者の権限の範囲内にある。

【００３７】

いくつかの実施形態においては、重鎖領域と軽鎖領域とを、アミノ酸配列 $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_3$(配列番号1)を含むリンカーなどの、リンカーを介して連結する。

【００３８】

BAIT融合タンパク質の例示的特徴は、B細胞特異性(抗ヒトCD20一本鎖抗体挿入物、例えば、729bp、243アミノ酸の挿入物を含む)を含んでもよい。抗CD20一本鎖抗体を構築物のNまたはC末端で操作して、それがB細胞の表面上のCD20分子を認識する際に適切に折り畳まれ、機能するようにすることができる。あるいは、抗CD19抗体を、B細胞標的化のために用いることができる。標的化を、例えば、ヒトCD20トランスジェニックマウスにおいて試験することができる。

【００３９】

抗CD20一本鎖抗体配列を、抗原IgG融合物上に操作した。リツキシマブのようなヒト化抗CD20 mAbを用いたB細胞枯渇は非ホジキンリンパ腫および特定の型の多発性硬化症のためのFDAに認可された療法であったため、B細胞表面分子CD20の標的化が実行可能である。あるいは、CD19を標的として使用し、融合タンパク質を伝統的な抗CD20 mAb媒介性B細胞枯渇療法と共に使用することができる。

【００４０】

IgG重鎖

BAIT融合タンパク質は、改変されたヒトIgG4重鎖定常領域であるIgG重鎖定常領域などのIgG重鎖を含む。いくつかの実施形態においては、IgG4重鎖定常領域は、ヒンジ領域を欠く。他の実施形態においては、IgG4重鎖定常領域は、CH1領域を欠く。これらの実施形態によれば、抗原を、IgG4部分のヒンジ領域によりIgG4重鎖骨格に連結することができる。

【００４１】

いくつかの実施形態においては、融合物が正常な抗CD20 mAbのようなB細胞枯渇特性を有さず、それが補体を固定しないように、IgG Fc領域を操作する。これらの手段は、B細胞の表面から他の免疫原性抗原提示細胞への抗原の潜在的移動を防止するためのものである。

【００４２】

IgG成分の存在は、in vivoでの融合タンパク質の半減期を増加させることができる。IgG Fcは、調節的T細胞の誘導を容易にすることができる、免疫調節エレメントを含有してもよい。IgG重鎖を含有する融合タンパク質を、IgG重鎖を含有しない融合タンパク質と比較する試験を行って、それぞれの形態の有益な効果(すなわち、IgG成分を含むことが有益であるかどうか)を決定することができる。

【００４３】

出願人は理論によって束縛されることを望むものではないが、BAITタンパク質中にIgG重鎖を含有させることに関する論理的根拠は以下の通りである：第1に、それが寛容原性

担体として広く用いられているということである。1970年代に、Borelおよび同僚[16、17]は、ハプテン-担体コンジュゲートが、いくつかの血清タンパク質を担体として用いた場合に高度に寛容原性であることを成体動物において証明した。試験した全ての血清タンパク質のうち、免疫グロブリンG(IgG)が最も寛容原性であった。実際、Zaghouaniおよび同僚は、EAEをモジュレートするためにこの原理を用いた[9]。さらに、良好に保存された乱雑なエピトープが、IgGの異なるドメイン間で最近同定された；これらのものは、抗原特異的調節的T細胞の誘導に寄与することが示された[8]。このヒトIgGアイソタイプは個体を固定しないため、ヒトIgG4の定常領域ドメインを選択した。さらに、ヒンジ領域を欠くIgG1およびIgG3抗体が、おそらくCH2への接近性の低下のため、高い親和性でFcγRIに結合することができないため[18]、IgG4の定常領域中のヒンジ領域を欠失させることができる。かくして、BAIT融合物はB細胞を標的化するが、抗CD20モノクローナル抗体を枯渇させるB細胞枯渇効果を有さない。

【００４４】

抗原

融合タンパク質の抗原部分を、以下でより詳細に考察されるように、処置しようとする状態に応じて任意の好適な標的抗原から選択することができる。例としては、自己免疫疾患については、自己抗原が挙げられる。例えば、MSの場合、CNS抗原MOG、PLP、MBPタンパク質またはペプチド抗原を用いることができる。血友病Aについては、第VIII因子またはそのドメインを用いることができる。以下の表1は、例示的な疾患および抗原を記載する。

【００４５】

【表１】

表１ 寛容のために形質導入されたＢ細胞を用いる適用の概要

疾患モデル	標的抗原	結果
ブドウ膜炎	IRBP、S-抗原	疾患を防止する、疾患の移動を無効化する
EAE (多発性硬化症に関する)	MBP, MOG, PLP	EAE 疾患を防止する、再発を遮断または軽減する、疾患の移動を無効化する;幹細胞療法
1型糖尿病	IGRP, GAD	糖尿病の開始を遅延させる、および発生率を低下させる;疾患の移動を遮断する;維持のために必要なCD25+T細胞
重症筋無力症	アセチルコリン受容体アルファ	アセチルコリン受容体に対する免疫応答をモジュレートする
血友病A	第VIII因子C2およびA2ドメイン	ナイーブな、およびプライミングされたレシピエントにおける阻害剤形成を防止する;誘導のために必要なCD25+T細胞
血友病B	第IX因子	ナイーブな、およびプライミングされたレシピエントにおける阻害剤形成を防止する[26]
遺伝子療法	標的遺伝子	長期的発現のために寛容を誘導する

【００４６】

本明細書に記載の融合タンパク質において有用な抗原部分の配列を、配列表に例示し、これは、FVIII2191-2210のDNA配列(CHO細胞中での発現のためにコドン最適化された)(配列番号8)およびその翻訳物(配列番号9)；OVA323-339のDNA配列(CHO細胞中での発現のためにコドン最適化された)(配列番号10)およびその翻訳物(配列番号11)、ならびにMOG35-55のDNA配列(CHO細胞中での発現のためにコドン最適化された)(配列番号12)およびその翻訳物(配列番号13)；ヒトFVIII A2ドメインのDNA配列(CHO細胞中での発現のためにコドン最適化された)(配列番号14)およびその翻訳物(配列番号15)；ヒトFVIII C2ドメインのDNA配

列(CHO細胞中での発現のためにコドン最適化された)(配列番号16)およびその翻訳物(配列番号17)；ならびにニワトリOVAのDNA配列(CHO細胞中での発現のためにコドン最適化された)(配列番号18)およびその翻訳物(配列番号19)を含む。融合タンパク質中でのB細胞表面標的化分子としての使用のために一本鎖抗体のこれらのおよび他の配列をコドン最適化することは、当業者の権限の範囲内にある。

【００４７】

BAIT融合物

融合タンパク質の成分は、抗原、IgG部分、およびB細胞表面標的化分子の相対位置に関して異なる構成を有してもよい。いくつかの実施形態においては、融合タンパク質は、N末端からC末端に向かって、B細胞表面標的化分子、IgG4部分、および抗原(ScFv-IgG4H-抗原)を含む。他の実施形態においては、融合タンパク質は、N末端からC末端に向かって、B細胞表面標的化分子、抗原、およびIgG4部分(ScFv-抗原-IgG4H)を含む。

【００４８】

いくつかの実施形態においては、同じ型のリンカーを用いて、融合タンパク質の部分を連結する、例えば、同じ型のリンカーを用いて、抗原をIgG部分に、IgG部分をB細胞表面標的化分子に連結する。融合タンパク質の適切な折り畳みを許容するか、または促進し、効率的な分泌を可能にする好適なリンカーを選択することは、当業者の権限の範囲内にある。いくつかの実施形態においては、１つ以上のリンカーは、アミノ酸配列（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)$_3$(配列番号1)を含む。

【００４９】

本発明は、NまたはC末端で操作された標的抗原を含有する一本鎖抗CD20抗体(SvCD20)(または他のB細胞標的化分子)とのIgG融合タンパク質を含む。一方の半分が、B細胞表面タンパク質に特異的であり、他方が、標的化エピトープ(抗原)(例えば、融合物のN末端にあるか、またはB細胞標的化分子とIgG部分との間にあってもよい)との融合物である、IgGヘテロダイマーを構築するために一本鎖抗体を用いる本発明の手法は、標的化エピトープの発現を可能にし、これはレトロウイルスの使用よりもはるかに単純であり、費用が低い適用である。かくして、それは遺伝子療法自体よりも商業的に魅力がある。

【００５０】

本発明は、BAIT融合タンパク質を生成し、特徴付けるため、およびMSのためのマウスモデルにおいて上記の選択的B細胞枯渇剤と共に/それなしで用いられるBAIT融合タンパク質の寛容原性効果を決定するための方法をさらに包含する。

【００５１】

いくつかの態様において、抗原部分において変化する3つのBAITタンパク質、例えば、BAIT-MOG$_{35-55}$、BAIT-OVA$_{323-339}$(抗原特異性対照)、およびBAIT-GFP(in vitroでの特性評価のため)などを生成する。MOG-IgG(すなわち、正常な非特異的IgG骨格上のMOG$_{35-55}$)を、対照として用いる。BAIT分子のためのベクターの構築を、3つのステップに分割することができる。第1に、3つのモジュールのそれぞれを、以前に用いられた[10]、pBSSKベクター中にクローニングする。次いで、pBSSK-svCD20-hIgG4-Agを、pBSSK-svCD20ベクターに基づいて生成する。最後に、svCD20-hIgG4-Ag断片全体を、哺乳動物発現ベクターpSec-Tag2A中にライゲートする。得られるベクターはpSec-svCD20-hIgG4-Ag-Tag2である。BAITタンパク質の発現および精製は、確立された手順によるものである。精製されたBAITタンパク質を、以下に記載のように広く特徴付ける。

【００５２】

あるいは、B細胞標的化部分が異なる様々な発現カセットを、pFuse-hIgG4-Fc2(Invitrogen)などの商業的に入手可能なhIgG4融合タンパク質発現ベクター中にクローニングする。続いて、BAITタンパク質を発現させ、確立されたプロトコールにしたがって精製する。

【００５３】

以下の表2は、例示的なBAITベクターの一覧を示す。mBAITベクターは、マウス抗体配列に基づくものである。

【００５４】

【表２】

BAIT ベクター	mBAIT ベクター
pFuse-BAIT-MOG_{35-55}	pFuse-mBAIT-MOG_{35-55}
pFuse-BAIT-$FVIII_{2191-2210}$	pFuse-mBAIT-$FVIII_{2191-2210}$
pFuse-BAIT-$OVA_{323-339}$	pFuse-mBAIT-A_2
	pFuse-mBAIT-C_2
	pFuse-mBAIT-$OVA_{323-339}$
	pFuse-mBAIT-OVA

【００５５】
方法
いくつかの実施形態においては、BAIT融合タンパク質療法を、単独で独立型有効療法として用いる。いくつかの実施形態においては、選択的なB細胞枯渇手法を、BAIT融合タンパク質療法を用いずに用いる。いくつかの実施形態においては、本発明は、寛容原性BAIT融合タンパク質療法を部分的B細胞枯渇と組み合わせることを含む。いくつかの実施形態においては、本発明の療法を用いて、MS、または他の自己免疫疾患、または本明細書で考察される他の状態を処置する。
【００５６】
本発明の一態様においては、単独で、または例えば、選択的B細胞標的化剤と組み合わせて用いられるBAIT融合タンパク質は、免疫学的自己寛容を再確立し、多発性硬化症(MS)に関するものなどの疾患症状を改善することができる。
【００５７】
かくして、いくつかの態様において、本発明は、2つの相互に関連する戦略を用いる：1つは、IgG1抗マウスCD20 mAbなどの選択的B細胞枯渇剤を用いる除去のために病原性B細胞を標的化することである。例えば、IgG1アイソタイプマウス抗マウスCD20 mAbはB細胞を部分的に枯渇させることがわかっている[4、5]。かくして、IgG1アイソタイプは、濾胞性(FO)B細胞を完全に枯渇させるが、辺縁帯(MZ)B細胞を大きく使わず、寛容原性抗原提示を支持すると考えられる。第2のものは、本明細書に記載の新規BAIT融合タンパク質により容易にされる、寛容原性抗原提示のために有益なB細胞を標的化することである。寛容原性レジメとして、BAITは現在のリツキシマブ媒介性B細胞枯渇療法および/または他のMS疾患修飾薬を補完することができる。新しい選択的B細胞枯渇試薬が開発されるため、これらのものを開発プロトコールに組み込むことができる。
【００５８】
いくつかの実施形態においては、B細胞を部分的に枯渇させる新しく開発されたヒト化抗CD20 mAbは、リツキサンよりも少ない副作用で疾患を制御するのにより有効である。BAITはリツキサンと競合しないが、寛容原性抗原提示細胞として働くリツキサン処置後の新しく出現したナイーブな休止B細胞を標的化し、関連するCNS抗原に対する自己寛容を再確立することにより、それを補完する。
【００５９】
本明細書に記載のBAIT融合タンパク質療法を、MSのための寛容原性タンパク質療法のためのプラットフォームとして適合させることができる。CNS融合物IgG(例えば、非特異的包括的IgGとフレームを合わせたMOG：MOG-IgG)自体が寛容原性であり得ることが知られている[9]。本明細書に記載のBAIT融合物などの、B細胞による取込みを選択的に標的化する融合タンパク質は、より有効な寛容原であり得る。さらに、選択的B細胞枯渇療法を、CNS抗原を含む寛容原性BAIT融合タンパク質と組み合わせることは、臨床症状を軽減するのにより有効であり得る。これは、ヒトCD20トランスジェニックマウス(hCD20、C57Bｌ/6バックグラウンド)におけるEAEのMOGペプチド誘導を用いる実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルによって示される。

【００６０】
かくして、MSの基本的な自己免疫特徴をモジュレートするために、新規B細胞特異的寛容原性融合タンパク質BAITを生成し、特徴付ける。BAIT融合タンパク質を、単独で、または療法のB細胞枯渇ラウンドの後の回復期の間に投与することができる。さらに、リツキシマブによる完全なB細胞枯渇は、必ずしも病原性B細胞を標的化するための最良の戦略であるとは限らない。実際、有益な抗原特異的B細胞および調節的B細胞の枯渇は、意図しない結果を示し得る[5]。これは、部分的には、感染またはさらには進行性多巣性白質脳症などの、リツキシマブで処置された患者において見られる副作用を説明する。したがって、FO B細胞を完全に枯渇させるが、寛容原性MZ B細胞は大きく使わないでおく、部分的B細胞枯渇剤、IgG1アイソタイプ抗マウスCD20 mAbが提供される。かくして、本発明のいくつかの実施形態は、異なる目的を有する2つの革新的なB細胞標的化方法を組み合わせる。IgG1抗マウスCD20により媒介される部分的B細胞枯渇は、病原性B細胞を含有するFO B細胞を一時的に除去するが、BAIT融合タンパク質は、CD4+ T細胞への寛容原性抗原提示のために新しく生成されたナイーブな休止B細胞および残りの寛容原性MZ B細胞に標的化される。かくして、本発明は、BAIT融合タンパク質などの、選択的B細胞除去活性を有するヒト化抗CD20 mAbを含む。BAITまたは選択的B細胞枯渇は独立型療法として作用することができるが、組合せ療法も利点を提供することができる。それぞれの可能性を、MSのマウスモデルを用いる以下の実験において詳細に検査することができる。

【００６１】
例として図3Bに記載されるBAITタンパク質を取れば、3つの例示的な特性を、BAITタンパク質中で具現化することができる：融合タンパク質をB細胞に特異的に指向させる抗ヒトCD20一本鎖抗体(svCD20)；FcRまたは補体によるエフェクター機能を活性化することなく寛容効果を増強するヒトIgG4重鎖の定常領域；および標的化T細胞に対して提示し、抗原特異的寛容を誘導する抗原モジュール。svCD20は、マウスIgG2a抗CD20抗体を発現するB9E9ハイブリドーマ細胞から元々クローニングされた。svCD20は、抗CD20抗体に由来する連結されたV_HおよびV_L鎖と、その間の$(Gly_4Ser_1)_3$リンカー(配列番号1)とから構成される[15]。BAITタンパク質中のsvCD20配列は、レンチウイルスベクター系によりコードされるものと同じである。

【００６２】
有益なB細胞を使わないでおくものなどの、さらに選択的なB細胞枯渇は、完全な枯渇のものと比較してMSの処置においてより高い効能を有する。IgG1アイソタイプ抗マウスCD20 mAbは、末梢B細胞を部分的にのみ枯渇させることが示されている[4、5]。IgG2aアイソタイプ抗マウスCD20 mAbはFO B細胞とMZ B細胞の両方を完全に枯渇させるが、IgG1抗マウスCD20抗体はFO B細胞のみを枯渇させるが、MZ B細胞は大きく使わないでおき、寛容を支持する[5]。事実、IgG2a抗体は、寛容を容易にしなかった。C3活性化が抗CD20抗体を用いるMZ B細胞の枯渇のための要件であるため[19]、MZ B細胞がIgG1アイソタイプ抗マウスCD20抗体によって使わないでおかれる理由は、おそらく、このマウスIgGサブクラスが補体を固定することができないことによるものである。

【００６３】
かくして、BAIT MOG_{35-55}寛容原性タンパク質を用いる療法は、ナイーブなB細胞を標的化し、寛容のためにCNSエピトープを効率的に提示する。さらに、選択的B細胞枯渇後にMZ B細胞を使わないでおく組合せ療法は、CNS抗原に対するCD4+ T細胞の寛容を再確立し、MSのためのマウスモデルにおいて疾患症状を改善するのに役立つ。

【実施例】
【００６４】
〔実施例１〕
BAIT融合タンパク質の生成および特性評価
全体戦略
この提唱される試験における重要なステップの1つは、BAIT分子の設計を最適化し、所望の特徴を有する融合タンパク質を生成することである。BAIT分子の3つの基本モジュー

ルは、(1)B細胞標的化モジュール、(2)IgG4重鎖定常領域の部分、および(3)CNS抗原モジュールである。B細胞標的化モジュールについては、抗CD20 mAb B9E9からクローニングされた、抗CD20一本鎖抗体を、分子のN末端上に操作することができる。あるいは、抗CD19一本鎖抗体配列を用いることができる。

【００６５】

上記のように、BAIT融合タンパク質は、枯渇のためにB細胞を標的化するように設計されていない。その代わりに、それは寛容原性抗原提示のために寛容原をB細胞中に指向させるためのビヒクルとして用いられる。したがって、IgG Fc領域により媒介される補体活性化、オプソニン化およびADCC機能は、BAIT分子の設計において望ましくない。この理由から、IgG4は補体を固定しないため、ヒトIgG4の重鎖定常領域を用いることができる。さらに、IgG4重鎖のヒンジ領域を突然変異させて、FcγR1結合活性を無効化することができる。

【００６６】

抗原モジュールについては、脳炎誘発性MOG_{35-55}配列を用いることができる。MOG_{35-55}は、マウスおよびヒトにおいて非常に保存されており、BAIT融合タンパク質の寛容原性を、MOG_{35-55}/CFA誘導性マウスEAEモデルにおいて試験することができ、生成物を将来の臨床試験において用いることができる。さらに、好都合のクローニング部位を操作して、抗原モジュールに隣接させ、他のヒトCNS抗原が、原理証明実験後に、MOG_{35-55}をコードするDNAを容易に置き換えることができる。

【００６７】

それぞれの成分をPCRクローニングし、pBSSKベクター中に個別に挿入することができる。高忠実度Taq DNAポリメラーゼ(Invitrogen)を、全てのPCR反応のために用いることができる。第1に、pBSSK-svCD20-hIgG4-MOG_{35-55}を、示された制限部位を用いて構築することができる。次いで、哺乳動物発現ベクターpSec-Tag2-svCD20-hIgG4-MOG_{35-55}を、pBSSKベクターに由来する全融合断片をpSec-Tag2ベクター中にクローニングすることにより構築することができる。

【００６８】

あるいは、B細胞標的部分が異なる様々な発現カセットを、pFuse-hIgG4-Fc2(Invitrogen)などの、市販のhIgG4融合タンパク質発現ベクター中にクローニングした。詳細なクローニング手順およびその後の特性評価は以下の通りである。

【００６９】

pBSSK-svCD20-hIgG4-CNS抗原(BAIT)分子の設計および構築

pBSSK-svCD20

オリゴヌクレオチドプライマー、CD20-フォワード5'- agaggaagcttatggctcaggttca -3'(配列番号20)およびCD20-リバース5'- agagcgaattccttcagctccagct -3'(配列番号21)を設計した。下線で示された、HindIIIおよびEcoRI部位を、それぞれ、フォワードおよびリバースプライマー中に含有させた。さらに、単一ヌクレオチド「g」を、HindIII部位とsvCD20配列の間でフォワードプライマー中に含有させて読み枠を維持した。鋳型としてpCG-H-αCD20ベクター(Kneissl SおよびBuchholz CJにより親切に提供された)を用いて、プライマー対はマウス抗ヒトCD20 mAbクローンB9E9から誘導されるsvCD20をコードする断片を増幅する。PCR断片を、HindIIIおよびEcoRI制限部位を用いてpBSSKベクター中にクローニングすることができる。

【００７０】

pBSSK-hIgG4

RNAを、IgG4抗第VIII因子抗体(クローン2C11)を分泌するヒトB細胞ハイブリドーマから単離することができる。cDNAを、オリゴdTプライマーを用いて逆転写することができる。RNAseHを用いて鋳型RNAを除去した後、cDNAをPCR鋳型として用いることができる。ヒトIgG4重鎖のコンセンサス定常領域に基づいてオリゴヌクレオチドプライマー対を設計した：IgG4-フォワード5'- agagagaattccttccaccaa -3'(配列番号22)およびIgG4-リバース5'- acccacactagttttacccagagaca -3'(配列番号23)。5'末端に、プライマーはEcoRIまたはSpeI

部位を含有する(下線で示される)。CH3ドメインの末端の停止コドン「tga」は、リバースプライマー中には含まれない。増幅されたPCR断片(CH1-ヒンジ-CH2-CH3)を、EcoRIおよびSpeI制限部位を用いてpBSSKベクター中にクローニングすることができる。得られるベクターにおいて、hIgG4の36bpのヒンジ領域(agtccaaatatggtcccccatgcccatcatgcccag（配列番号24))を、製造業者の指示書にしたがって部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene)を用いて欠失させることができる。

【００７１】

pBSSK-MOG_{35-55}

MSのマウスモデルにおいてBAITを試験するために、マウスMOG_{35-55}をコードする配列(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK（配列番号25))に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを設計した：MOG_{35-55}-フォワード5'- agcagactagtatggaggtgggt -3'（配列番号26)およびMOG_{35-55}-リバース5'- attatgcggccgccttgccatttcggt -3'（配列番号27)。このフォワードおよびリバースプライマーは、それぞれ、5'および3'末端にSpeIおよびNotI部位を含有する。マウスMOGをコードするベクター(Dr. Joan Goverman, University of Washingtonにより親切に提供された)を、PCR鋳型として用いることができる。増幅された断片を、制限部位SpeIおよびNotIを用いてpBSSKベクター中にクローニングすることができる。位置42のプロリン置換によってのみマウスMOG_{35-55}と異なるヒトMOG_{35-55}は、DR2トランスジェニックマウスにおいて脳炎誘発性である[20]。ヒトMOG_{35-55}を含有するベクターを、将来の臨床試験のために、上記の部位特異的突然変異誘発を用いてpBSSK-mMOG_{35-55}に基づいて生成することができる。

【００７２】

pBSSK-svCD20-hIgG4-MOG_{35-55}、-$OVA_{323-339}$、および-GFP

次に、IgG4断片を、pBSSK-hIgG4ベクターから切断し、EcoRIおよびSpeI制限部位を用いてpBSSK-svCD20ベクター中にライゲートすることができる。得られるベクターは、pBSSK-svCD20-hIgG4と呼ばれる。pBSSK-svCD20-hIgG4-mMOG_{35-55}を構築するために、マウスMOG断片をSpeIおよびNotI部位を介して切断した後、その断片を、同じ酵素で消化されたpBSSK-svCD20-hIgG4ベクター中にライゲートすることができる。

【００７３】

pBSSK-svCD20-hIgG4-$OVA_{323-339}$およびpBSSK-svCD20-hIgG4-GFPを、pBSSK-svCD20-hIgG4ベクターに基づいて構築することができる。隣接するSpeIおよびNotI部位を有する$OVA_{323-339}$およびGFPを、関連するベクターからPCR増幅することができる。$OVA_{323-339}$のためのオリゴヌクレオチドプライマー対は、フォワード5'- agcgcactagtaagatatctcaagct -3'（配列番号28)、リバース5'- attatgcggccgcgcctgcttcattga -3’（配列番号29)である。GFPのためのプライマー対は、フォワード5'- actccactagtatggtgagcaa -3'（配列番号30)およびリバース5'- attatgcggccgccttgtacagctcgt-3'（配列番号31)である。PCR産物を、SpeIおよびNotI制限酵素で消化し、SpeI/NotI消化されたpBSSK-svCD20-hIgG4中にライゲートすることができる。

【００７４】

さらに、上記で作製されたベクターに基づいて、本発明者らは、svCD20成分を欠くさらなる対照として役立つ、pBSSK-hIgG4-MOG_{35-55}（本明細書ではMOG-IgGと呼ばれるMOG_{35-55}IgGおよびpBSSK-hIgG4-GFP（Ig-GFP))も生成することができる。サブクローニング戦略の概要を、以下の表3に示す。

【００７５】

svCD20-hIgG4-MOG_{35-55}寛容原(BAIT)の発現および精製

哺乳動物発現のために、svCD20-IgG4-MOG_{35-55}を含有する挿入物を、HindIIIおよびNotI消化によりpBSSK-svCD20-hIgG4-MOG_{35-55}ベクターから切り出すことができる。次いで、得られた断片を、HindIII/NotI消化されたpSecTag2ベクター中にライゲートすることができる。得られるベクターは、pSec-svCD20-hIgG4-MOG_{35-55}-Tag2である。pSecTagベクター中で発現される組換えタンパク質を、そのC末端上でc-Mycエピトープおよび6個のタンデムヒスチジンタグ(配列番号32)と融合させることができる。挿入物全体を配列決定して、

配列とコード枠が正確であることを確保することができる。対照発現ベクターpSec-svCD20-hIgG4-OVA$_{323-339}$-Tag2およびpSec-svCD20-hIgG4-GFP-Tag2を、同様に生成することができる。

【００７６】

CHO-K1細胞(ATCC)を用いて、BAITおよび他の対照融合タンパク質を発現させることができる。BAITの発現のために、CHO-K1細胞に、標準的なリン酸カルシウム法を用いて、svCD20-IgG4-MOG$_{35-55}$を一過的にトランスフェクトすることができる。好適な組込み物をゼオシン耐性について選択することができる。ゼオシン耐性クローンからの上清を、融合タンパク質中のC末端融合されたc-Mycタグの検出のためにドットブロットプロトコールを用いて組換え融合タンパク質発現についてスクリーニングすることができる。

【００７７】

【表３】

表 3:BAIT 分子のためのサブクローニング戦略の概要

BAIT ドメイン	鋳型	プライマー(それぞれ、出現順に、配列番号 20～23 および 26～31)	サブクローニング部位
svCD20	pCG-H-αCD20	フォワード: 5'- agagg*aagctt*atggctcaggttca -3' リバース: 5'- agagc*gaattc*cttcagctccagct -3'	HindIII, EcoRI
hIgG4	第 1 鎖 cDNA	フォワード: 5'- agaga*gaattc*cttccaccaa -3' リバース: 5'- acccac*actagt*ttacccagagaca -3'	EcoRI, SpeI
抗原	MSCV-MOG$_{1-120}$	MOG$_{35-55}$-F 5'- agcag*actagt*atggaggtgggt -3' MOG$_{35-55}$-R 5'- attat*gcggccgc*cttgccatttcggt -3'	SpeI, NotI
	pBSSK-OVA	OVA$_{323-339}$-F 5'- agcgc*actagt*aagatatctcaagct -3' OVA$_{323-339}$-R 5'- attat*gcggccgc*gcctgcttcattga -3'	
	MSCV-IRGFP	GFP-F 5'- actcc*actagt*atggtgagcaa -3' GFP-R 5'- attat*gcggccgc*cttgtacagctcgt -3'	

【００７８】

高効率クローンを同定した後、細胞を、懸濁液中での培養に適合させることができ、大規模懸濁培養からの上清中の融合タンパク質を、製造業者の指示書にしたがってNi-NTAアガロースカラム(Qiagen、Valencia、CA、USA)上でのアフィニティクロマトグラフィーにより精製することができる。精製を、Bio-Rad HPLCユニットを用いて実行することができる。最も高い標的融合タンパク質を有する画分を、OD280での吸光度によりモニタリングし、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、次いで、クマシーブルーR-250染色、ウェスタンブロット分析および質量分析により評価することができる(以下を参照されたい)。同じ技術を用いて、培養上清100mlあたりミリグラムスケールの異なる部分のマウスIgG1重鎖と一緒に融合されたFVIIIドメインを含む融合タンパク質を産生することができる。

【００７９】

6ウェルプレート中に播種された接着性CHO細胞に、pSec-svCD20-Ig-MOG$_{35-55}$ (BAIT-MOG)、pSec-svCD20-Ig-OVA$_{323-335}$ (BAIT-OVA)、またはpSec-svCD20-Ig-GFP (BAIT-GFP)をトランスフェクトした。48時間後、上清または細胞溶解物サンプルを収集し、4～12%のPAGEゲル中で分離させ、抗ヒトIgGまたはGFPと共にブロットした。モノマーBAIT融合物の予想サイズは、BAIT-MOG、BAIT-OVA、およびBAIT-GFPについて、それぞれ、約67、67、および92KDである。抗ヒトIgGまたは抗GFP抗体を用いて検出された主要な特異的バンドは、予想より小さかった。これは、発現されたタンパク質が完全長ではないことを本発明者らに示していた。さらに、GFP部分は、細胞溶解物中でのみ検出可能であったが、上清サンプル中ではそうではなかった。これらの結果は、細胞内分解および非効率的なタンパク質輸

送をもたらし得る、発現されたBAIT融合物の不適切な折り畳みの可能性を示唆していた。

【００８０】

この潜在的な問題に対処するために、本発明者らは、以下により詳細に説明されるように、抗原成分(例えば、MOGまたはFVIII)がsvCD20の下流にあり、IgG部分の上流にあるBAIT融合物を設計した。

【００８１】

BAIT融合タンパク質のGMP製造

BAIT融合タンパク質の臨床品質のGMP製造のために、上記のpSecTag2ベクター中の抗原モジュールの末端に停止コドンを導入することができる。かくして、c-Mycおよび6個のタンデムヒスチジンタグ(配列番号32)は、融合タンパク質の一部ではない。精製ステップ中に、プロテインAカラムを、Ni-NTIカラムの代わりに用いることができる。

【００８２】

BAITタンパク質の特性評価

分子量

BAIT融合タンパク質の天然の分子質量を、非変性PAGEゲル電気泳動を用いて見積もることができる。精製されたBAIT融合タンパク質(0.1μg)を、ローディングバッファー(1mMリン酸ナトリウム、pH7.0および50mM NaCl)中で混合し、標準的なプロトコールにしたがって7.5%非変性ポリアクリルアミドゲル中で分離させることができる。融合タンパク質の天然の分子質量を、タンパク質標準と比較することにより見積もることができる。

【００８３】

抗体結合および特異性

融合タンパク質の結合能力を、本発明者らがCD20について陽性であることを知っているRajiヒトB細胞株を用いてアッセイすることができる。精製された融合タンパク質BAIT-GFPを、4℃で1時間、0.1～20μg/mlの濃度でRaji細胞(10^6個)に添加することができる。PBS中で3回洗浄した後、細胞を、GFP蛍光についてフローサイトメトリーにより分析することができる。バックグラウンド染色を、svCD20ドメインを含有しないIg-GFP融合タンパク質を用いることにより決定することができる。

【００８４】

融合タンパク質のB細胞特異的結合を決定するために、ヒトCD20トランスジェニックマウスに由来する脾細胞、ならびにヒトPBMCを用いることができる。精製されたBAIT-GFPを、4℃で1時間、標準的な濃度で細胞(10^6個)に添加することができる。洗浄後、異なる細胞集団中のGFP陽性細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより決定することができる。ゲーティング戦略は、B細胞($CD19^+$)、マクロファージ($F4/80^+$)、樹状細胞($CD11c^+$)、好中球($Ly\text{-}6G^+$)、非白血球($CD45^-$)、T細胞($CD4^+$、$CD8^+CD3^+$)、血小板/巨核球($CD41^+$)である。

【００８５】

B細胞の形質導入

寛容原性抗原提示のために、表面結合した融合タンパク質はB細胞によって内在化される必要がある。融合タンパク質がB細胞によって内在化され得るかどうかを決定するために、精製されたBAIT-GFPを、ヒトCD20トランスジェニックマウスに由来する脾臓B細胞に添加し、37℃で30分～6時間インキュベートすることができる。洗浄後、細胞を、室温で5min、トリプシンで処理して、表面結合したGFP融合タンパク質を除去し、蛍光強度をフローサイトメトリーにより分析することができる。細胞を対照Ig-GFPと共にインキュベートすることにより、バックグラウンド蛍光を決定することができる。脾臓B細胞の異なる集団間の形質導入効率を、FO ($CD19^+CD23^{high}CD21^{low}$)、MZ ($CD19^+CD23^{low}CD21^{high}$)、B1 B ($CD19^+CD23^{low}IgM^{high}CD93^-CD43^+$)、および形質芽球($CD19^+IgM^{high}VLA4^{low}CD138^+$)について比較することができる。

【００８６】

in vitroでのT細胞増殖アッセイおよびアネルギー/抑制のためのアッセイ

BAIT融合タンパク質によるB細胞形質導入を、in vitroで96ウェル平底プレート中で以

下のように検査することもできる。ヒトCD20トランスジェニックマウス(C57BL/6バックグラウンド)に由来する照射された(1500rad)脾臓B細胞($2x10^5$個/100μl)に、37℃で4時間、BAIT-MOG_{35-55} (FACSの結果に基づく濃度で)またはBAIT-$OVA_{323-339}$をパルスすることができる。2D2(MOG特異的TCRトランスジェニック)に由来するCD4+ T細胞($0.5x10^5$個/100μl)またはMOG_{35-55}/CFA免疫化マウスに由来するリンパ節細胞($1x10^5$個/100μl)を、各ウェルに添加することができる。MOG_{35-55}および$OVA_{323-339}$を、それぞれ、陽性および陰性対照として用いることができる。BAIT-$OVA_{323-339}$に対するOT-II OVA特異的TCRトランスジェニック細胞の応答を、同様に試験することができる。37℃で48h後、細胞に1μCiの3H-チミジンをさらに12～16hパルスし、3H-チミジンの取込みを、以前の刊行物[21]にしたがって標準的な方法により決定することができる。BAIT-MOG_{35-55}またはOVAペプチドを含有しないウェルから得られたCPMを差し引いて、デルタCPMを得ることができる。

【００８７】

BAIT-MOG_{35-55}が2D2 T細胞を刺激することができない場合、それらがその後の2段階アッセイにおいてアネルギー化されたか、または抑制的になるかどうかを決定するべきである。基本的には、「アネルギー」について、BAITで予備培養されたT細胞(24ウェル培養に由来する)を洗浄した後、最適な用量のMOG_{35-55}および新鮮に照射された脾臓細胞APCで「チャレンジ」し、増殖およびサイトカイン産生(IFNγ、IL-4)についてアッセイすることができる。

【００８８】

抑制(およびTreg誘導)についてアッセイするために、BAITで予備培養された細胞(2D2、MOG免疫化またはナイーブなC57Bl/6マウスに由来する)を、様々な比で(標的2D2 T細胞を一定に保持する)CFSE-標識された2D2脾細胞に添加し、CFSE希釈を、フローサイトメトリーを用いて測定することができる。さらに、2D2-FoxP3GFP脾臓細胞を一次培養物中で用いて、FoxP3+TregがBAIT-MOG_{35-55}との培養時に増加するかどうかを決定することができる。

【００８９】

in vivoでの寛容アッセイ

この計画の長期目標は、臨床試験における使用に向けたステップとして、EAEにおける療法としてBAIT-MOG_{35-55}を用いることである。上記の予備的in vitro分析に基づいて、C57Bl/6マウスを、予防的に処置した後、CFA+百日咳中のMOGペプチドで免疫するか、または(より重要なことには)次の目的で概略されるように、本発明者らの標準的なEAEプロトコールにおける症状出現の後に処置することができる。

【００９０】

他のBAITタンパク質

一本鎖抗CD19 mAb配列を、上記のように、融合物のN末端でクローニングして、svCD20配列を置き換えることができる。BAIT MOG_{35-55}はアネルギーまたは抑制を誘導することができるが、2D2細胞と共にFoxP3+細胞の増加が予想される。調節的T細胞抑制アッセイは、当業界でよく確立されている。MS患者からのOb.1A 12 T細胞クローンを用いて、翻訳のためにMBPペプチドを用いてBAIT構築物を改変することができる。IgG4重鎖タンパク質のさらなる突然変異を作製して、FcγR結合活性を防止する、BAIT分子中のそれぞれの成分の位置を調整する、および/または最終融合産物中のc-mycおよび6個のタンデムヒスチジンタグ(配列番号32)を除去することができる。

【００９１】

〔実施例２〕

MSのためのマウスモデルにおける選択的B細胞枯渇剤と共に/それなしで用いられるBAIT融合タンパク質の寛容原性効果の決定

全体戦略

本発明は、疾患症状を軽減するだけでなく、根本的な自己免疫問題に対処することができる、MSのための有効な新規生物療法を確立する。BAIT-MOG_{35-55}を、MZ B細胞を使わず、寛容を支持する部分的B細胞枯渇剤であるIgG1抗マウスCD20 mAbと組み合わせて試験す

ることができる。BAIT-MOG_{35-55}が、MSのためのマウスモデルであるEAEにおいて、それ自体で(一般のMOG-IgGよりも良好に)、または有効な療法としての部分的B細胞枯渇と共に作用することができるかどうかを決定するべきである。さらに、MS患者のPBMC再構成$Rag2^{-/-}$マウスにおけるBAIT寛容原性融合タンパク質療法を試験することができる。最初に、C57BL/6バックグラウンドのヒトCD20トランスジェニックマウス(hCD20 Tg；認可されたMTAの下でDr. Mark Shlomchikにより提供された)を、in vivoでの実験におけるドナーとレシピエントの両方として用いる。B細胞上で発現されるhCD20トランスジーンは、融合タンパク質中のsvCD20により認識される(および上記で検証される)。重要なことに、これらのB細胞は、内因性マウスCD20を依然として発現し、IgG1抗マウスCD20抗体を用いる枯渇を可能にする。疾患誘導のために、活性MOG_{35-55}により誘導された慢性EAEモデルを、この試験において用いる。疾患経過を、以前の刊行物[21、23、24]において用いられた標準的な0～5のスコアリングシステムを用いて毎日評価することができる。さらに、脊髄組織に関する組織学的評価(以下を参照されたい)を、様々な時点で実施して、寛容原性療法の際に進行し得る潜在的なCNS修復および再ミエリン化を検査することができる。

【００９２】

MSのマウスモデルにおける寛容原性融合タンパク質BAITの効果の決定

BAIT-MOG_{35-55}単独での投与が寛容原性であり、MOG_{35-55}により誘導されるEAEに対する治療効果を有するかどうかを決定するべきである。この実験において、6～8週齢のメスhCD20 Tgマウス(n=8)を、4mg/mlのマイコバクテリウム・ツベルクロシス(Mycobacterium tuberculosis) H37Ra(DIFCO、Detroit、MI)を含有するCFA中に乳化された100μgのMOG_{35-55}ペプチドを用いる標準的なプロトコール(尾の側面および基部への皮下注射)で0日目にEAEについて積極的に誘導することができる。0日目および48h後に、マウスはまた、0.2mlのPBS中の200ngの百日咳毒素(Sigma-Aldrich)を腹腔内的に受けることができる。

【００９３】

-7日目(予防的)または+10日目(治療的)で開始して、マウスに、100μgのBAIT-MOG_{35-55}、100μgのBAIT-$OVA_{323-339}$(特異性対照)、MOG-IgGまたはPBS(ビヒクル対照)を、5日間にわたって毎日i.v.注射することができる。疾患経過および組織病理を、以下に記載のように評価することができる。45日目に、処置群および対照群からのマウスを、0.9%の生理食塩水、次いで、冷4%パラホルムアルデヒドでかん流し、脊髄を取り出し、4%パラホルムアルデヒド中で後固定し、切片をルクソールファストブルー/過ヨウ素酸-Schiff-ヘマトキシリンで染色し、光学顕微鏡により分析して、脱髄および炎症病変を評価することができる。炎症を、0=炎症なし、1=軟髄膜および血管周囲空間のみにおける炎症細胞、2=脊髄実質における軽度の炎症浸潤、3=実質における中程度の炎症浸潤、4=実質における重度の炎症浸潤としてスコア化することができる。脱髄を、0=脱髄なし、1=軽度の脱髄、2=中程度の脱髄、3=重度の脱髄としてスコア化することができる。

【００９４】

CNS修復および再ミエリン化に対するBAIT-MOG_{35-55}の潜在的な効果を検査するために、別のコホートのhCD20 Tgマウス(n=5)を、疾患誘導のために最初にMOG_{35-55}/CFA/百日咳毒素で免疫することができる。BAIT-MOG、BAIT-OVAまたはPBSの投与を、疾患のピーク(約21日目)の間に開始することができる。マウスを、毎日および実験の終わりに(免疫化の45日後)スコア化し、脊髄組織病理を上記のように実施することができる。CNS炎症および脱髄状態を、BAIT-MOG_{35-55}群と対照群との間で比較することができる。

【００９５】

MSのためのマウスモデルにおける選択的FO B細胞枯渇の効果の決定

IgGアイソタイプの抗マウスCD20 mAb(Biogen Idecにより提供される)は、B細胞枯渇に関して異なる効果を有することが以前に見出された。かくして、IgG2a抗CD20 mAbは完全なB細胞枯渇を媒介するが、IgG1抗CD20抗体はMZ B細胞を大きく使わず、寛容を支持する[5]。BAIT処置とは無関係のMSのためのMOG誘導性マウスモデルにおけるIgG1対IgG2a抗CD20 mAbの効果を比較する。6～8週齢のメスhCD20 Tgマウス(n=8)を、上記のようにEAEについて積極的に誘導することができる。マウスを、-7日目または7日目にIgG1抗CD20抗体、IgG2a

抗CD20抗体、またはPBS(ビヒクル)で処置することができる。疾患経過を、上記のスコアリングシステムを用いて免疫化後に毎日評価することができる。さらに、実験の終わり(通常は45日目)に、脊髄を上記のように脱髄の証拠について検査することができる。

【００９６】

MSのためのマウスモデルにおける組合せ療法(B細胞枯渇 + BAIT処置)の効果の決定

最後に、選択的FO B細胞枯渇と、BAIT-MOG_{35-55}療法とを組み合わせる戦略を、MOG誘導性EAEにおいて評価することができる。メスの6～8週齢のhCD20 Tgマウス(n=8)を、MOG_{35-55}/CFA/百日咳毒素を用いて0日目に積極的に誘導することができる。疾患誘導の2週間前に、マウスに、250μg(約10mg/kg)のIgG1抗CD20抗体をi.v.注射することができる。+7日目に開始して、マウスに、100μgのBAIT-MOG_{35-55}、100μgのBAIT-$OVA_{323-339}$(特異性対照)、MOG-IgGまたはPBS(ビヒクル対照)を5日間にわたって毎日、i.v.注射することができる。疾患経過およびCNS組織病理を、上記のセクションに記載のように追跡することができる。

【００９７】

予想される転帰、潜在的なチャレンジ、および代替戦略

この試験は、寛容原性抗原提示のためのB細胞の標的化およびCNS抗原特異的CD4+ T細胞に対する寛容の誘導に焦点を合わせたものである。したがって、MOG_{35-55}ペプチドにより誘導されるマウスEAEを選択して、提唱される療法の効能を評価した。異なるアイソタイプの抗マウスCD20抗体を用いるB細胞枯渇の効果は、以前にも報告されている[5](Zhang AHら、Blood. 2011)。単回用量の抗CD20 mAbを用いた場合、B細胞枯渇のピークは約2週で起こる。その後、B細胞レパートリーはゆっくりと、徐々に回復する。組合せ療法戦略におけるBAIT-MOG_{35-55}注射の開始時までに、新しく出現したナイーブな休止B細胞および残存するMZ B細胞は、B細胞特異的寛容原性融合タンパク質のための理想的な標的である。BAIT処置は、MOG-IgGよりも有効である(または低用量で有効である)と予想され、IgG1抗CD20枯渇との組合せ療法はEAEを治療的に処置する際にさらにより有効であり得る。B細胞表面CD20が、プロセッシングおよび提示にとって必要とされるようにB細胞により効率的にエンドサイトーシスされない場合、融合物中のsvCD20を、抗CD19一本鎖抗体により置き換えることができる。しかしながら、ヒトCD19トランスジェニックマウスは初期のB細胞発生において重大な欠陥を有すると報告されたため[25]、抗マウスCD19一本鎖配列を融合物中で使用し、野生型マウスを原理証明EAE実験のために使用することができる。

【００９８】

〔実施例３〕

以下により詳細に説明され、図3Bに例示されるように、構成：B細胞-標的化分子-抗原-IgG4Hを有するBAIT融合物を設計および構築した。

【００９９】

BAIT発現ベクターの構築

svCD20-$FVIII_{2191-2210}$およびsvCD20-$OVA_{323-339}$をコードする2つのpFuse発現ベクターを構築した。さらに、svCD19-MOG_{35-55}-hIgG4をコードするpFuse発現ベクターも生成した。抗マウスsvCD19に基づくBAITタンパク質を、mBAITと省略して、抗ヒトCD20 scFvに基づくこれらの融合物を区別した。

【０１００】

図5は、B細胞標的化モジュールにおいて異なるBAITおよびmBAIT発現カセットを例示する。前者は、ヒトB細胞またはヒトCD20トランスジェニックマウスB細胞に特異的である抗ヒトCD20一本鎖可変断片(svCD20)を用いる。後者は、標的化のために抗マウスCD19 scFv(msvCD19)を用いることによりマウスB細胞にとって特異的である。クローニングおよびタンパク質発現を容易にするために、市販のhIgG4融合タンパク質発現ベクター、pFuse-hIgG4-Fc2(Invivogen)を用いた。scFv-抗原断片を、EcoRIおよびEcoRV制限部位を用いて、IL-2シグナル配列とヒトIgG4ヒンジとの間でpFuse-hIgG4-Fc2ベクター中にクローニングした。svCD20-抗原またはmsvCD19-抗原cDNA断片を、CHO細胞中での発現のためにコドン最適化し(配列番号2および5を参照されたい)、GenScriptにより合成した。他の抗原、例えば

、FVIII C2およびA2ドメインを含有するBAITおよびmBAIT発現ベクターを、抗原成分に隣接する同じ制限部位を用いて生成することができる。$OVA_{323-329}$またはOVAを含有するBAITを、抗原特異性対照として用いた。

【０１０１】

さらに、$mBAIT\text{-}MOG_{35-55}$のための発現ベクターを生成した。EcoRIおよびEcoRV/BamHIに隣接した$svCD19\text{-}MOG_{35-55}$ DNA断片を、GenSriptにより合成した。$svCD19\text{-}MOG_{35-55}$挿入物を、EcoRIおよびBamHIを用いて中間体$pUC57\text{-}svCD19\text{-}MOG_{35-55}$ベクターから切り出した後、EcoRI/BglII消化されたpFuse-hIgG4-Fc2ベクター中にライゲートした。続いて、挿入物のサイズを確認した後、正確な発現ベクターのコロニーを、図6に例示されるような制限分析によってスクリーニングした。

【０１０２】

〔実施例４〕

$BAIT\text{-}FVIII_{2191-2210}$および$BAIT\text{-}OVA_{323-339}$融合タンパク質の生成

$BAIT\text{-}FVIII_{2191-2210}$および$BAIT\text{-}OVA_{323-339}$融合タンパク質を、上記の発現ベクターによって発現させた。$BAIT\text{-}FVIII_{2191-2210}$および$BAIT\text{-}OVA_{323-339}$融合タンパク質の発現および分泌は、一過的にトランスフェクトされたCHO細胞中で成功した。

【０１０３】

図7により例示されるように、挿入物を、制限分析(図7A、図7B)により分析および確認し、ゲル精製し、EcoRI/BglII消化されたpFuse-hIgG4-Fc2発現ベクター中にクローニングした。正確な挿入物を有するベクターについてスクリーニングするためにEcoRIおよびNcoIを用いる制限分析の後、選択されたベクターをさらなるトランスフェクションおよびタンパク質発現分析のために精製した。

【０１０４】

具体的には、ウェスタンブロット分析を実施して、発現を検証した(図7C)。CHO細胞に、$pFuse\text{-}BAIT\text{-}FVIII_{2191-2210}$または$BAIT\text{-}OVA_{323-339}$プラスミドDNAをトランスフェクトした。トランスフェクションの48h後に上清を収集し、NuPage 4～12%Bis-Trisゲル中でのウェスタンブロットによりタンパク質発現を分析した。還元条件下で、ただ1つの主要バンドが、両タンパク質について約56KDのサイズで検出された。非還元条件を用いるウェスタンブロットにより示されるように、大部分のBAIT融合タンパク質が、ポリマーの形態にあった。用いたブロッティング抗体は、モノクローナル抗ヒトIgG抗体(λ鎖特異的)およびHRPウサギ抗マウスIgG抗体(H+L)であった。

【０１０５】

〔実施例５〕

安定にトランスフェクトされたCHO細胞株の生成

本実施例は、$BAIT\text{-}FVIII_{2191-2210}$および$BAIT\text{-}OVA_{323-339}$融合タンパク質のための安定にトランスフェクトされたCHO細胞株が確立され、これらの株中でのBAITタンパク質発現が検証されたことを示すものである。

【０１０６】

6ウェルプレート中の接着性CHO細胞に、リポフェクタミンLTX試薬を用いて、2.5μgの$pFuse\text{-}BAIT\text{-}FVIII_{2191-2210}$または$BAIT\text{-}OVA_{323-339}$プラスミドDNAをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、500μg/mlのゼオシンを用いて20日間にわたって選択した。次いで、選択された安定にトランスフェクトされたCHO細胞を、8%CO2、37℃で、125rpmにて振盪しながら、1xGlutaMax、0.5x pen-strepおよび100μg/mlゼオシンを含有する無血清FreeStyle CHO培地を用いて懸濁培養条件に適合させた。80mlの合計容量で250mlのポリカーボネート使い捨てフラスコ中、1X10E5個/mlで細胞を播種した。上清サンプルを懸濁培養液から毎日収集し、細胞数を計測した。図8Aの細胞増殖曲線は、生細胞が全てのデータ点で95%を超えていたことを示す。

【０１０７】

還元条件下でNuPage 4～12%Bis-Trisゲル中の安定にトランスフェクトされたCHO細胞からの上清サンプルに対して、ウェスタンブロット分析を実施した。図8Bにおいて、レーン

2～6および7～11は、それぞれ、BAIT-FVIII$_{2191-2210}$およびBAIT-OVA$_{323-339}$安定株からの1～5日目の上清サンプルであった。BAITタンパク質発現のレベルは、懸濁培養の日数にわたって蓄積し、約56KDでのただ1つの単一バンドが両融合タンパク質について検出された。用いたブロッティング抗体は、モノクローナル抗ヒトIgG抗体(λ鎖特異的)およびHRPウサギ抗マウスIgG抗体(H+L)であった。

【０１０８】

〔実施例６〕

BAIT融合タンパク質の効能の決定

一度、それぞれのBAIT融合タンパク質の発現が、トランスフェクトされたCHO細胞中で検証されたら、BAIT融合タンパク質を確立されたプロトコールに従って精製する。

【０１０９】

BAITについてはヒトPBMC B細胞またはヒトCD20トランスジェニックマウスに由来する脾臓B細胞を、mBAITについてはC57Bl/6マウス脾臓B細胞を用いて、in vitroでのB細胞特異的結合を検査する。続いて、in vitroでの取込み/提示を、社内で生成されたFVIII$_{2191-2210}$特異的ヒトT細胞株、ならびにBAIT-OVA$_{323-339}$およびmBAIT-MOG$_{35-55}$について、それぞれ、OT-IIおよび2D2トランスジェニックマウスに由来するT細胞を用いるT細胞増殖アッセイによって分析することができる。

【０１１０】

さらに、多発性硬化症に関するBAIT-MOG$_{35-55}$の効能を、ヒトCD20トランスジェニックマウスを用いて検査する。さらに、阻害剤を用いる多発性硬化症および血友病Aに関するmBAIT-MOG$_{35-55}$およびmBAIT-A2/mBAIT-C2の効能を、それぞれ、マウスモデルにおいて検査する。

【０１１１】

〔実施例７〕

BAIT融合タンパク質BAIT$_{hCD20-FVIII2191-2210}$のin vitroでのB細胞特異的結合

BAIT融合タンパク質(BAIT$_{hCD20}$-FVIII$_{2191-2210}$)の結合能力を、CD20について陽性であることが知られるRajiヒトB細胞株を用いてアッセイした。Raji細胞(5x10^{5}個)を、37℃で1時間、1μgの精製されたBAIT$_{hCD20}$-FVIII$_{2191-2210}$と共にインキュベートした。次いで、細胞を、BAIT融合タンパク質のヒトIgG4 Fc領域を認識するAPC抗ヒトIgG抗体で染色した。PBSバッファーで3回洗浄した後、フローサイトメトリーにより細胞を分析した。細胞をライブシングレット上でゲート化した。データは、BAIT融合タンパク質がCD20+B細胞に結合したことを示す。図9を参照されたい。

【０１１２】

ヒトPBMC B細胞のB細胞に結合するBAIT融合タンパク質の能力も実施した。ヒトPBMCを、ビオチン化されたBAIT$_{hCD20}$-FVIII$_{2191-2210}$と共にインキュベートするか、または対照として未処理のままにした。インキュベーション後、細胞を、4℃で15分間、ヒトFcR遮断試薬(Miltenyi Biotech)で遮断した。細胞を、FITC結合ストレプトアビジン、APC eFluo780(生存能力染料)およびCD19-APCで細胞外染色した後、PE結合ストレプトアビジンで細胞内染色した。洗浄後、異なる細胞集団中の細胞外および細胞内細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより決定した。重複ドットプロット(示さず)により、CD19+B細胞のみがFITC-ストレプトアビジン陽性であることが示され、これはB細胞特異的結合を示している。4℃でのインキュベーションと比較して、37℃で1時間のインキュベーション後にも有意な数のB細胞がPE-ストレプトアビジン陽性であったが、これは、BAIT融合タンパク質のB細胞取込みを示唆している。

【０１１３】

37℃で60min、ビオチン化されたBAIT$_{hCD20}$-FVIII$_{2191-2210}$で処理され、上記のように染色された細胞の共焦点画像を取得した(示さず)。非重複細胞外および細胞内蛍光シグナルは、BAIT融合タンパク質のB細胞結合および取込みを示す。

【０１１４】

〔実施例８〕

特異的CD4+エフェクターT細胞の増殖応答に対するBAIT融合タンパク質BAIT-FVIII$_{2191-2210}$の効果

社内で生成されたFVIII$_{2191-2210}$特異的ヒトT細胞株を用いるT細胞増殖アッセイにより、BAIT融合タンパク質BAIT-TVIII$_{2191-2210}$のin vitroでの取込み/提示を分析した。HLA DR1/DR2ドナーからのヒトB細胞を、抗CD19磁気ビーズ(Miltenyi)を用いて精製し、2μg/mlのCD40L + 10ng/mlのIL-4で3日間活性化させた。次いで、活性化されたB細胞を、1μg/mlのBAIT$_{hCD20}$-FVIII$_{2191-2210}$、BAIT$_{hCD20}$-OVA$_{323-339}$または組換えFVIIIの非存在下または存在下、5:1の比で増殖染料eFluor 450標識17195 Tエフェクターと共に同時培養した。3日後、17195 Tエフェクターの増殖状態を、eFluor 450蛍光シグナルの希釈に基づいてフローサイトメトリーによって評価した。図10を参照されたい。この実験は、BAIT融合物のFVIII$_{2191-2210}$エピトープが、活性化ヒトB細胞によって適切にプロセッシングされ、特異的T細胞に提示されたことを示す。

【０１１５】

休止B細胞に対するT細胞の増殖応答に対するBAIT融合タンパク質の効果も試験した。HLA DR1/DR2ドナーに由来する精製されたヒトB細胞を、1μg/mlのBAIT$_{hCD20}$-FVIII$_{2191-2210}$、BAIT$_{hCD20}$-OVA$_{323-339}$または組換えFVIIIの非存在下または存在下、5:1の比で標識17195 Tエフェクターと共に直接同時培養した。17195 Tエフェクターの増殖応答を、上記のように評価した。図10を参照されたい。この実験は、BAIT$_{hCD20}$-FVIII$_{2191-2210}$またはFVIIIをパルスした休止B細胞が特異的T細胞の増殖応答を支援しなかったことを示す。T細胞増殖の非存在は、活性を抑制しながらT細胞アネルギーまたは細胞集団を誘導することにより、休止B細胞による抗原提示が寛容を支持することを示唆する(この結果に関する可能性の低い代替的説明は、休止B細胞がBAITにより送達される抗原を取込み、提示することができなかったということである)。

【０１１６】

HLA DR1/DR2ドナーに由来するヒトPBMCを、5μg/mlのBAIT$_{hCD20}$-FVIII$_{2191-2210}$もしくはBAIT$_{hCD20}$-OVA$_{323-339}$、または1μg/mlの組換えFVIIIの非存在下または存在下、20:1の比で標識17195 Tエフェクターと共に同時培養した。17195 Tエフェクターの増殖応答を、上記のように評価した。図10を参照されたい。この実験は、BAIT$_{hCD20}$-FVIII$_{2191-2210}$をパルスされたヒトPBMCが特異的T細胞の増殖応答を支援しなかったことを示す。上記で考察されたように、この結果は、BAIT融合タンパク質を用いることによる抗原の送達が寛容誘導を支持することを示している。

【０１１７】

〔実施例９〕

ナイーブなマウスにおいてFVIIIに対する寛容を誘導するFVIII BAITのin vivoでの効能

FVIII BAIT融合タンパク質がFVIIIナイーブマウスにおいて寛容原性であることを示すために、トランスジェニックFVIIIノックアウトマウスに、FVIII BAIT融合タンパク質を投与した後、FVIIIを投与し、FVIIIに対する免疫応答を評価することができる。

【０１１８】

例えば、0日目に、第1群に10μgのmBAIT-FVIII C2を静脈内投与し、第2群に10μgのmBAIT-OVAを注射し、第3群に50μgのmBAIT-FVIII C2を注射し、第4群に50μgのmBAIT-OVAを注射することができる。次いで、7、14および21日目に、血液を引き出して、FVIIIに対する免疫応答を決定することができる。さらに、マウスを安楽死させて、リンパ球増殖およびELIspotアッセイのために脾臓を取得することができる。

【０１１９】

第2群および第4群はFVIIIに対する寛容を示さないと予想される。第1群および第3群は、おそらく用量依存的様式で、FVIIIに対する寛容を示し得る。

【０１２０】

〔実施例１０〕

FVIII免疫化マウスに対する寛容を誘導するFVIII BAITのin vivoでの効能

FVIII BAIT融合タンパク質がFVIIIで免疫された被験体にとって寛容原性であることを

示すために、FVIIIノックアウトマウスをFVIIIで免疫し、FVIII BAIT融合タンパク質を投与し、FVIIIに対する免疫応答をBAIT処置の前後で評価することができる。

【０１２１】

例えば、マウスに、0、7および14日目にrFVIII(100μlのPBS中の1μg；i.v.)を投与することができる。21日目に、血液を引き出して、FVIIIに対する免疫応答を決定することができる。マウスを無作為に4つの群に分割することができる。28、35および42日目に、第1群に、10μgのmBAIT-FVIII C2を静脈内投与し、第2群には10μgのmBAIT-OVAを静脈内投与し、第3群には50μgのmBAIT-FVIII C2を静脈内投与し、第4群には50μgのmBAIT-OVAを静脈内投与することができる。35、42および49日目に、血液を引き出して、FVIIIに対する免疫応答を決定することができる。49日目に、マウスにrFVIII(100μlのPBS中の1μg；i.v.)を投与することができる。56日目に、血液を引き出して、FVIIIに対する免疫応答を決定することができる。さらに、マウスを安楽死させて、リンパ球増殖およびELIspotアッセイのために脾臓を取得することができる。

【０１２２】

第2群および第4群はFVIIIに対する寛容を示さないと予想される。第1群および第3群は、おそらく用量依存的様式で、FVIIIに対する寛容を示し得る。

【０１２３】

〔実施例１１〕

MOG_{35-55}ペプチド/CFA/PTで誘導されたEAEマウスにおいて寛容を誘導するMOG BAITのin vivoでの効能

多発性硬化症に対するMOG BAIT融合タンパク質の効能を、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導したマウスにおいて示すことができる。

【０１２４】

例えば、マウスに、CFA中で乳化されたMOG35-55ペプチドを用いてEAEを誘導することができる(0日目)。また、0日目および2日目に、マウスに、百日咳毒素(PT)(200μlのPBS中の50ng)を腹腔内投与することができる。EAEの臨床兆候を、7日目に開始して毎日評価することができる。EAEマウスを、4つの群に無作為に割り当てることができる。7、14、21および28日目に、第1群に10μgのmBAIT-MOG_{35-55}を静脈内投与し、第2群には10μgのmBAIT-OVAを静脈内投与し、第3群には50μgのmBAIT-MOG_{35-55}を静脈内投与し、第4群には50μgのmBAIT-OVAを静脈内投与することができる。35日目に、マウスを安楽死させて、ミエリン免疫組織化学染色のために脊髄サンプルを取得することができる。

【０１２５】

第1群および第3群は、おそらく用量依存的様式で、EAEからの保護を示すと予想される。

【０１２６】

参考文献

1 Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 358:676-88.

2 Reichardt P, Dornbach B, Rong S, et al. 2007. Naïve B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood.* 110:1519-1529.

3 Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, et al. 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.* 118: 3420-30.

4 Yu S, Dunn R, Kehry MR, Braley-Mullen H. 2008. B cell depletion inhibits spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice. *J Immunol.* 180:7706-13.

5 Zhang AH, Skupsky J, Scott DW. 2011. Effect of B-cell depletion using anti-CD20 therapy on inhibitory antibody formation to human FVIII in hemophilia A mice. *Blood.* 117:2223-6.

6 Zambidis ET, Scott DW. 1996. Epitope-specific tolerance induction with an engineered immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:5019-24.

7 Brumeanu TD, Casares S, Harris PE, Dehazya P, Wolf I, von Boehmer H, Bona CA. 1996. Immunopotency of a viral peptide assembled on the carbohydrate moieties of self immunoglobulins. *Nat Biotechnol.* 14:722-5.

8 De Groot AS, Moise L, McMurry JA, Wambre E, Van Overtvelt L, Moingeon P, Scott DW, Martin W. 2008. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". *Blood.* 112:3303-11.

9 Legge KL, Gregg RK, Maldonado-Lopez RM, et al. 2002. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med.* 196:217-227.

10 Melo ME, Qian J, El-Amine M, et al. 2002. Gene transfer of Ig-fusion proteins into B cells prevents and treats autoimmune diseases. *J Immunol.* 168:4788-95.

11 Lassila O, Vainio O, Matzinger P. 1988. Can B cells turn on virgin T cells? *Nature.* 334:253-5.

12 Eynon EE, Parker DC. 1992. Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J Exp Med.* 175:131-8.

13 Fuchs EJ, Matzinger P. 1992. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science.* 258:1156-9.

14 Sonoda KH, Stein-Streilein J. 2002. CD1d on antigen-transponting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur J immunol.* 32:848-57.

15 Schultz J, Lin Y, Sanderson J, et al. 2000. A tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy. *Cancer Res.* 60:6663-9.

16 Borel Y, Lewis RM, Stollar BD. 1973. Prevention of murine lupus nephritis by carrier-dependent induction of immunologic tolerance to denatured DNA. *Science.* 182:76-8.

17 Borel Y. 1980. Haptens bound to self IgG induce immunologic tolerance, while when coupled to syngeneic spleen cells they induce immune suppression. *Immunol Rev.* 50:71-104.

18 Canfield SM, and Morrison SL. 1991: The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the C_H2 domain and is modulated by the hinge region. *J. Exp. Med.* 173:1483-1491.

19 Gong Q, Ou Q, Ye S, et al. 2005. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol.* 174:817-26.

20 Offner H, Burrows GG, Ferro AJ, et al. 2011. RTL therapy for multiple sclerosis: a phase I clinical study. *J Neuroimmunol.* 231:7-14.

21 Zhang AH, Li X, Onabajo OO. 2010. B-cell delivered gene therapy for tolerance induction: role of autoantigen-specific B cells. *J Autoimmunity.* 35:107-13.

22 Beers SA, French RR, Claude Chan HT, et al. 2010. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood.* 115:5191-5201.

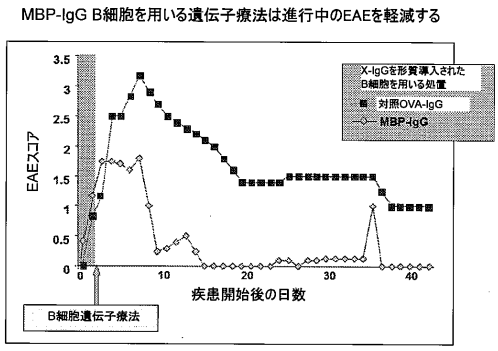
23 Xu B, Scott DW. 2004. A novel retroviral gene therapy approach to inhibit specific antibody production and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis induced by MOG and MBP. *Clin Immunol.* 111:47-52.

24 Su Y, Zhang AH, Li X, et al. 2011. B cells "transduced" with TAT-fusion proteins can induce tolerance and protect mice from diabetes and EAE. *Clin Immunol.* 140:260-67.

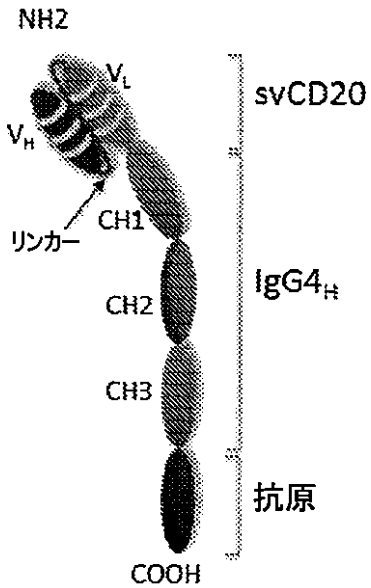
25 Zhou LJ, Smith HM, Waldschmidt TJ, et al. 1994. Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B-lymphocyte development. *Mol Cell Biol.* 14:3884-94.

26. X. Wang *et al.*, Immune tolerance induction to factor IX through B cell gene transfer: TLR9 signaling delineates between tolerogenic and immunogenic B cells. *Mol Ther* **22**, 1139-1150 (2014).

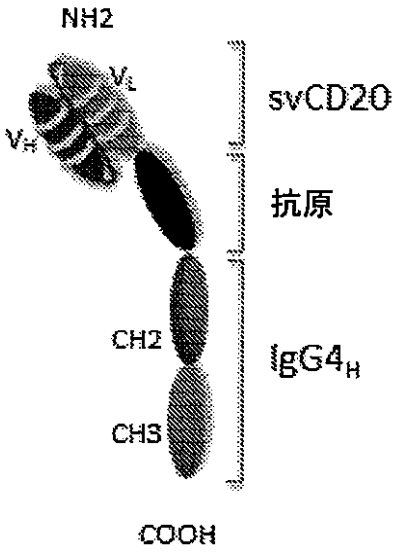
【図１】



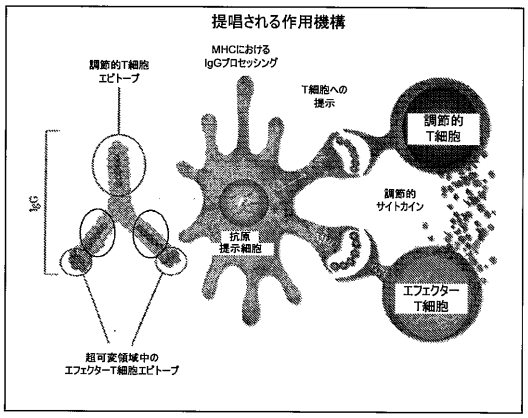
【図２Ａ】



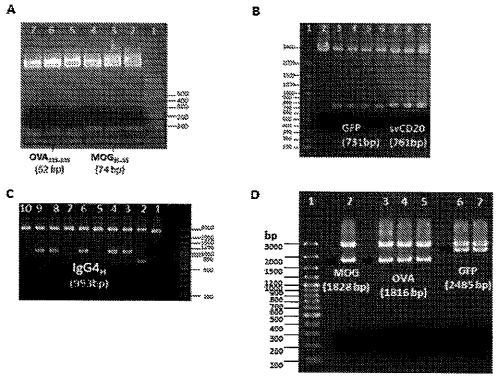
【図２Ｂ】



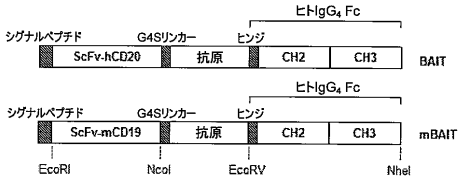
【図３】



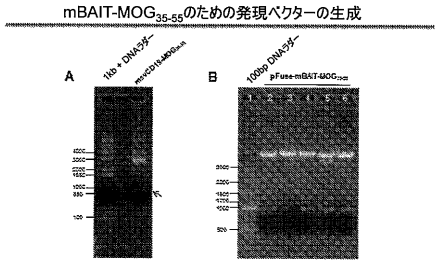
【図４】



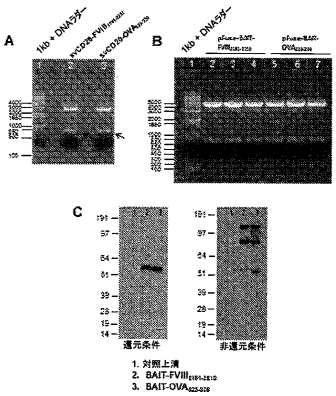
【図５】



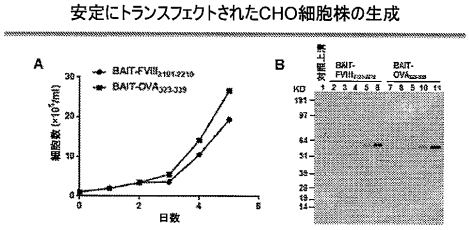
【図６】



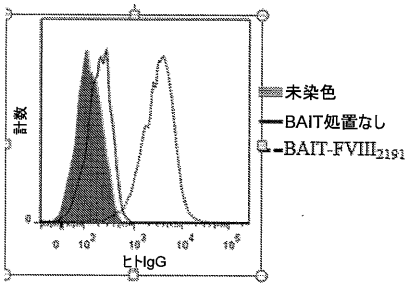
【図７】



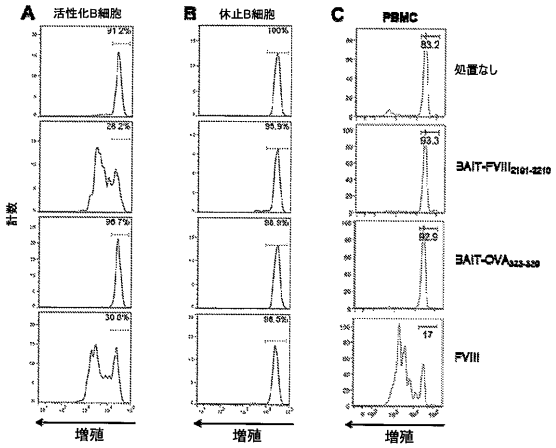
【図８】



【図９】



【図１０】



【配列表】

2017521046000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/029642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/755 C07K14/78 C07K16/28 C07K14/47
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 A61K

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, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MELO MARCO E F ET AL: "Gene transfer of Ig-fusion proteins into B cells prevents and treats autoimmune diseases", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 168, no. 9, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 4788-4795, XP002535132, ISSN: 0022-1767 cited in the application abstract; figures 1,2 ----- -/--	1-28

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
21 July 2015	07/08/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Renggli-Zulliger, N

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/029642

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XU B ET AL: "A novel retroviral gene therapy approach to inhibit specific antibody production and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis induced by MOG and MBP", CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 111, no. 1, 1 April 2004 (2004-04-01) , pages 47-52, XP002348620, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1016/J.CLIM.2003.12.013 the whole document	1-28
Y	A.-H. ZHANG ET AL: "Effect of B-cell depletion using anti-CD20 therapy on inhibitory antibody formation to human FVIII in hemophilia A mice", BLOOD, vol. 117, no. 7, 17 February 2011 (2011-02-17), pages 2223-2226, XP055201923, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2010-06-293324 cited in the application abstract	1-28
Y	ZAMBIDIS E T ET AL: "EPITOPE-SPECIFIC TOLERANCE INDUCTION WITH AN ENGINEERED IMMUNOGLOBULIN", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 93, 1 May 1996 (1996-05-01), pages 5019-5024, XP002911069, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.93.10.5019 cited in the application abstract	1-28
Y	NEWMAN R ET AL: "MODIFICATION OF THE FC REGION OF A PRIMATIZED IGG ANTIBODY TO HUMAN CD4 RETAINS ITS ABILITY TO MODULATE CD4 RECEPTORS BUT DOES NOT DEPLETE CD4+ T CELLS IN CHIMPANZEES", CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 98, no. 2, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 164-174, XP001098835, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1006/CLIM.2000.4975 abstract	1-28
A	US 2003/064063 A1 (SAXON ANDREW [US]) 3 April 2003 (2003-04-03) the whole document	1-28

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/029642

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRANDON K. SACK ET AL: "Transient B Cell Depletion or Improved Transgene Expression by Codon Optimization Promote Tolerance to Factor VIII in Gene Therapy", PLOS ONE, vol. 7, no. 5, 24 May 2012 (2012-05-24), page e37671, XP55157381, DOI: 10.1371/journal.pone.0037671 abstract -----	1-28
Y	HAUSER STEPHEN L ET AL: "B-cell depletion with Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, US, vol. 358, no. 7, 14 February 2008 (2008-02-14), pages 676-688, XP002567454, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMOA0706383 cited in the application abstract -----	1-28
A	KATY MALPASS: "Multiple sclerosis: Defect in peripheral B-cell tolerance identified in MS", NATURE REVIEWS NEUROLOGY, vol. 9, no. 7, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 358-358, XP055202085, ISSN: 1759-4758, DOI: 10.1038/nrneurol.2013.112 abstract -----	1-28

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/029642

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003064063 A1	03-04-2003	EP 2335726 A1	22-06-2011
		JP 2010180223 A	19-08-2010
		US 7879334 B1	01-02-2011
		US 2003064063 A1	03-04-2003
		US 2003082190 A1	01-05-2003
		US 2009317389 A1	24-12-2009
		ZA 200308316 A	03-11-2004

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 39/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｇ
Ａ６１Ｋ 48/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｕ
Ａ６１Ｐ 3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ
Ａ６１Ｐ 27/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｐ 19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ 29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02	
Ａ６１Ｐ 21/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02	
Ａ６１Ｐ 7/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ 25/28	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/04	
Ａ６１Ｐ 37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04	
Ｃ１２Ｎ 5/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28	
Ｃ０７Ｋ 16/46	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06	
		Ｃ１２Ｎ	5/10	
		Ｃ０７Ｋ	16/46	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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,DK,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),OA(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,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(74)代理人 100169971
弁理士 菊田 尚子
(74)代理人 100169579
弁理士 村林 望
(72)発明者 ツァン，アイーホン
アメリカ合衆国 ２１２２９ メリーランド州，バルティモア，アパートメント ディー，アランドライブ ４３１０
(72)発明者 スコット，デーヴィッド
アメリカ合衆国 ２０８１４ メリーランド州，ベセスダ，ブラッドリー ブールバード ５９０２

Ｆターム(参考) 4B065 AA94X AB01 BA02 CA44
4C084 AA13 NA14 ZA15 ZA33 ZA53 ZA94 ZA96 ZB05 ZB08 ZB11 ZC19 ZC35
4C085 AA03 AA13 AA14 AA33 BB11 BB12 BB13 BB18 BB22 BB23 BB36 BB41 BB42 CC21 CC22 DD51 DD62 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86 EA20 FA72 FA74 GA26