

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7670614号
(P7670614)

(45)発行日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(24)登録日 令和7年4月21日(2025.4.21)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/0784(2010.01)	C 1 2 N	5/0784
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	31/10
請求項の数 22 (全57頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-542444(P2021-542444)	(73)特許権者	503146324
(86)(22)出願日	令和2年1月22日(2020.1.22)		ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2022-518771(P2022-518771 A)		The Brigham and Women's Hospital, Inc.
(43)公表日	令和4年3月16日(2022.3.16)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02115 ボストン フランシス ストリート 75
(86)国際出願番号	PCT/US2020/014642	(74)代理人	100092783
(87)国際公開番号	WO2020/154424		弁理士 小林 浩
(87)国際公開日	令和2年7月30日(2020.7.30)	(74)代理人	100120134
審査請求日	令和5年1月13日(2023.1.13)		弁理士 大森 規雄
(31)優先権主張番号	62/795,498	(74)代理人	100153693
(32)優先日	平成31年1月22日(2019.1.22)		弁理士 岩田 耕一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	アスター, ジョン シー.
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗原提示好中球由来樹状細胞およびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

樹状細胞の集団を生成する方法であって、
FcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBの一方または両方を発現する好中球を含む好中球の集団を準備するステップと；
培養下の前記好中球を、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）ならびに抗原および抗体を含む免疫複合体（IC）と接触させるステップであって、前記抗体が、前記抗原に結合する抗原結合性部分ならびにFcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBに結合するFc領域を含む、ステップと；
好中球が樹状細胞に分化するために十分な条件下および時間で、GM-CSFおよびICの存在下で、培養下において好中球の前記集団を維持するステップとを含む、前記方法。

【請求項2】

前記抗原がタグを含み、抗体が前記抗原の前記タグ部分に結合する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記抗原が、腫瘍抗原である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

がんを有する対象を処置するための医薬組成物であって、請求項3に記載の方法によって生成される前記樹状細胞を含む、前記医薬組成物。

【請求項 5】

がんを処置する方法において使用するための、請求項 3 に記載の方法によって生成される樹状細胞。

【請求項 6】

前記抗原が、病原体に由来する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

病原体に感染した対象を処置するための医薬組成物であって、請求項 6 に記載の方法によって生成される前記樹状細胞を含み、前記抗原が、前記対象が感染した前記病原体に由来する、前記医薬組成物。

【請求項 8】

病原体による感染症を処置する方法において使用するための、請求項 6 に記載の方法によって生成される樹状細胞であって、前記抗原が、対象が感染した前記病原体に由来する、前記樹状細胞。

【請求項 9】

樹状細胞の集団を生成する *in vitro* 方法であって、

FcγRIIA および／または FcγRIIIB の一方または両方を発現する好中球を含む好中球の集団を準備するステップと；

培養下の好中球の前記集団を、

抗原、ならびに FcγRIIA および／または FcγRIIIB に結合する抗原結合性ドメインを含む抗体であるコンジュゲートであって、融合タンパク質または化学的コンジュゲートである前記コンジュゲート、ならびに

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) と接触させるステップと；

好中球が樹状細胞に分化するために十分な条件下および時間で、前記コンジュゲートおよび GM-CSF の存在下で、培養下において好中球の前記集団を維持するステップとを含む、前記方法。

【請求項 10】

前記抗原が、腫瘍抗原である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

がんを有する対象を処置するための医薬組成物であって、請求項 10 に記載の方法によって生成される樹状細胞を含む、前記医薬組成物。

【請求項 12】

がんを処置する方法において使用するための、請求項 10 に記載の方法によって生成される樹状細胞の集団。

【請求項 13】

前記抗原が、病原体に由来する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

病原体に感染した対象を処置するための医薬組成物であって、請求項 13 に記載の方法によって生成される前記樹状細胞を含み、前記抗原が、前記対象が感染した前記病原体に由来する、前記医薬組成物。

【請求項 15】

病原体による感染症を処置する方法において使用するための、請求項 13 に記載の方法によって生成される樹状細胞の集団であって、前記抗原が、対象が感染した前記病原体に由来する、前記集団。

【請求項 16】

樹状細胞の集団を生成する方法であって、

FcγRIIA および／または FcγRIIIB の一方または両方を発現する好中球を含む好中球の集団を準備するステップと；

培養下の前記好中球を、抗原に結合する抗原結合性部分ならびに FcγRIIA および／または FcγRIIIB に結合する Fc 領域を含む抗体、ならびに、顆粒球マクロファ-

10

20

30

40

50

ジコロニー刺激因子（GM-CSF）と、接触させるステップと；

好中球が樹状細胞に分化するために十分な条件下および時間で、GM-CSFと前記抗体の存在下で、培養下において好中球の前記集団を維持するステップ
とを含む、前記方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法によって生成される樹状細胞の集団。

【請求項 18】

好中球の前記集団を得た対象を、処置する方法において使用するための、請求項 16 に記載の方法によって生成される樹状細胞の集団。

【請求項 19】

前記対象が、骨髄性腫瘍または感染症を有する、請求項 18 に記載の使用のための樹状細胞の集団。

【請求項 20】

前記感染症が、細菌、真菌、またはウイルス感染症である、請求項 19 に記載の使用のための樹状細胞の集団。

【請求項 21】

対象を処置する方法において使用するための医薬組成物であって、

前記医薬組成物は、請求項 16 に記載の方法により生成される樹状細胞の集団を含み、

請求項 16 に記載の方法において用いられる FcγRIIA および／または FcγRIIIB の一方または両方を発現する好中球を含む好中球の前記集団は、前記対象から得られるものであり、

前記方法は、前記樹状細胞の集団を前記対象に投与するステップを含むものである、前記医薬組成物。

【請求項 22】

前記対象が、骨髄性腫瘍または感染症を有する、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、2019年1月22日に出願した米国仮特許出願番号第62／795,498号の利益を主張する。前記の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究または開発

本発明は、国立保健研究所（National Institutes of Health）によって授与された認可番号HL065095の下で政府の支援によりなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

がんまたは感染症に対する免疫応答を生じるかまたは促進する際に使用するための方法および組成物であって、GM-CSFと、(i) 抗原およびFcγRIIAもしくはFcγRIIIBに結合するFc領域を含むその抗原に対する抗体を含む免疫複合体、(ii) 抗原および抗FcγRIIIB抗体を含むコンジュゲート、または(iii) 抗FcγRIIIB抗体との組合せを使用して、好中球の樹状細胞への分化を促進することを含む方法および組成物が本明細書に記載される。

【背景技術】

【0004】

樹状細胞（DC）は、リンパ器官において、ナイーブT細胞に対する抗原を提示するのに必須である。細胞外タンパク質のDCによる取り込みによって、MHCIIにおけるペプチドの提示がもたらされるが、一方、細胞質タンパク質から生じたペプチドは、MHCIIに負荷され、それぞれ、ナイーブCD4⁺ヘルパーT細胞およびCD8⁺細胞傷害性T細胞を活性化する。DCはまた、抗原を交差提示し、ここで、ベシクルに取り込まれた細

10

20

30

40

50

胞外抗原は、サイトゾルおよびMHC I経路に到達し、CD8⁺T細胞をプライミングする。この特性は、DCに限られると考えられ、がんおよび感染症を処置するための細胞に基づく免疫療法に活用される^{1、2、3}。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、少なくとも部分的に、好中球によるFcγRに媒介される抗原取り込みによって、ナイーブCD4⁺およびCD8⁺T細胞を活性化する遊走性樹状細胞へのそれらの分化がもたらされるという発見に基づく。

【0006】

微生物排除を専門とする好中球は、サイトカイン刺激後に抗原提示細胞の機能を獲得することができる。ここで、本発明者らは、抗原を含有する免疫複合体の取り込みによって、好中球が、ナイーブCD4⁺およびCD8⁺T細胞を活性化し、かつ*in vivo*で遅延型過敏性応答および腫瘍免疫を誘導する樹状細胞様の特徴を有する細胞（好中球由来のDC、NDDC）へと変換されることを示す。ヒト化マウス由来の好中球は、FcγRIIIBとFcγRIIAの両方が、NDDCの生成をサポートすることを示す。マウスの好中球FcγRIIIBに対する、静脈内送達された、抗原にコンジュゲートした抗体は、血中および脾臓中でNDDCを生成し、CD8⁺T細胞の増殖および細胞溶解機能をサポートし、かつGM-CSFの存在下で腫瘍成長を低下させる。同様に、抗原にコンジュゲートした抗FcγRIIIBは、ヒト好中球をNDDCに変換する。よって、FcγRIIIBに媒介される抗原送達を活用して、腫瘍および病原体に対する有効な獲得免疫を誘引することができる。

【0007】

よって、樹状細胞（DC）の集団を生成するための*in vitro*方法が本明細書において提供される。この方法は、FcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBの一方または両方を発現する好中球を含む好中球の集団を準備するステップと；培養下の好中球を顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）ならびに抗原および抗体を含む免疫複合体（IC）と接触させるステップであって、抗体が、抗原に結合する抗原結合性部分ならびにFcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBに結合するFc領域を含む、ステップと；好中球がDCに分化する条件下で、およびそれに十分な時間、GM-CSFおよびICの存在下で、培養下において好中球の集団を維持するステップとを含む。

【0008】

一部の実施形態では、抗原はタグを含み、抗体は抗原のタグ部分に結合する。

【0009】

一部の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。これらの細胞は、例えば、がんを処置する方法において使用することができる。がんを有する対象を処置する方法であって、この方法によって生成される細胞の有効量を対象に投与するステップを含む方法も本明細書において提供される。

【0010】

一部の実施形態では、抗原は、病原体に由来する。これらの細胞は、例えば、感染症を処置する方法であって、抗原が、対象が感染した病原体に由来する、方法において使用することができる。病原体に感染した対象を処置する方法であって、生成されるこれらの細胞の有効量を対象に投与するステップであって、抗原が、対象が感染した病原体に由来する、ステップを含む方法も本明細書において提供される。

【0011】

(i) 抗原、および(ii) FcγRIIIに結合する抗原結合性ドメインを含む抗体を含むコンジュゲート（例えば、融合タンパク質または化学的コンジュゲート）も本明細書において提供される。一部の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原または病原体由来の抗原である。

【0012】

さらに、樹状細胞（DC）の集団を生成するための *in vitro* 方法が本明細書において提供される。本方法は、FcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBの一方または両方を発現する好中球を含む好中球の集団を準備するステップと；培養下の好中球の集団を本明細書に記載のコンジュゲートと、および必要に応じて顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）と接触させるステップと、好中球がDCに分化する条件下で、およびそれに十分な時間、コンジュゲートおよびGM-CSFの存在下で、培養下において好中球の集団を維持するステップとを含む。

【0013】

一部の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。これらのDCは、例えば、がんを処置する方法において使用することができる。がんを有する対象を処置する方法であって、これらの方法によって生成されるDCの有効量を対象に投与するステップを含む方法も本明細書において提供される。

10

【0014】

一部の実施形態では、抗原は、病原体に由来する。これらのDCは、例えば、感染症を処置する方法であって、抗原が、対象が感染した病原体に由来する、方法において使用することができる。病原体に感染した対象を処置する方法であって、これらのDCの有効量を対象に投与するステップであって、抗原が、対象が感染した病原体に由来する、ステップを含む方法も提供される。

【0015】

さらに、対象を処置するための方法であって、(i) 抗原、および(ii) FcγRIIに結合する抗原結合性ドメインを含む抗体を含む本明細書に記載されるコンジュゲートの有効量と、必要に応じて顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）とを対象に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、対象はがんを有し、抗原は腫瘍抗原である。一部の実施形態では、対象は、病原体による感染症を有し、抗原は、病原体に由来する。

20

【0016】

樹状細胞（DC）の集団を生成するための方法であって、例えば対象から、FcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBの一方または両方を発現する好中球の集団を準備するステップと；培養下の好中球を抗原に結合する抗原結合性部分ならびにFcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBに結合するFc領域を含む抗体と接触させるステップと；好中球がDCに分化する条件下で、およびそれに十分な時間、培養下において好中球の集団を維持するステップとを含む方法も本明細書において提供される。

30

【0017】

一部の実施形態では、好中球の集団は、GM-CSFおよび／またはICの存在下で維持される。

【0018】

例えば、対象、好ましくは好中球の集団を得た対象を処置する方法において使用するための、本明細書に記載の方法によって生成される樹状細胞の集団も本明細書において提供される。

【0019】

一部の実施形態では、FcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBの一方または両方を発現する好中球を含む好中球の集団は対象から得られ、本方法は、分化した樹状細胞を好中球の集団が得られた対象に投与するステップをさらに含む。

40

【0020】

一部の実施形態では、対象は、骨髄性腫瘍または感染症、例えば細菌、真菌、またはウイルス感染症を有する。

【0021】

骨髄性腫瘍または感染症、例えば細菌、真菌、またはウイルス感染症を有する対象を処置する方法も本明細書において提供される。本方法は、FcγRIIに結合する抗原結合性ドメインを含む、抗体の有効量を対象に投与するステップを含む。一部の実施形態で

50

は、対象は、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、または骨髄増殖性腫瘍（MPN）からなる群から選択される骨髄性腫瘍を有する。

【0022】

用語「抗原」は、それ自体または好適な担体分子もしくは細胞に連結した場合のいずれかによって、生物における免疫応答を誘導することが可能である任意の構造を含む。したがって、本発明による抗原は、ハプテンとしての役割を果たす低分子化合物ならびに腫瘍細胞などの細胞全体ならびにポリペプチド、それらに由来するオリゴペプチド、糖脂質などの脂質、多糖および核酸などのその部分を含む。

【0023】

別段に定義されていなければ、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者によって通常理解されているのと同じ意味を有する。本発明において使用するための方法および材料が本明細書に記載されており；当技術分野において公知の他の好適な方法および材料も使用されてよい。材料、方法、および実施例は例示のみであり、限定的であることを意図しない。本明細書において言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリー、および他の参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が支配することになる。

【0024】

本発明の他の要件および利点は、以下の詳細な説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1A-B】免疫複合体によるFcγRのエンゲージメントは、好中球の樹状細胞への分化を促進する。A~B) 野生型マウスから単離した成熟した好中球を、OVA-抗-OVA、Nip-OVA-抗-NipもしくはBSA-抗-BSAから構成される示したモデル免疫複合体(IC)または個々の構成成分と共に2時間インキュベートし、洗浄し、GM-CSFと共に培養したか(A)、あるいはSLE患者のもしくは正常な(NH)血清、または抗RNP陽性SLE血清由来のIgGおよびRNP(SLE-IgG+RNP)もしくは正常な血清とRNPからのIgG(NH-S-IgG+RNP)により生成したICで処置し、GM-CSFを含まない培地中で培養した(B)。3日後に、細胞を回収し、生存率について評価し、フローサイトメトリーによって好中球(Ly6G)およびDC(CD11c、MHCI I)のマーカについて解析した。この集団をさらなるDCマーカ、CD80、CD86およびCCR7について解析した。データは、平均±s.e.m.である。A)においては一元ANOVAおよびダネットの多重比較検定およびB)においては多重t-検定によって、P値を計算した。*P<0.05および**P<0.005。C~D) 正常なヒト対照(N)およびSLE患者からの血液試料を、系統陰性の(Lin-; CD3-CD19-CD56-)細胞(C)における示した好中球(CD10、CD15)およびDC(CD11c、MHCI I)マーカについて解析し、SLE試料をCD80、CCR7および樹状サブセットマーカ(Clec9A、CD141)(D)についてさらに評価し、SLE疾患活性指数(SLEDAI)のスコアと相関させた。マンホイットニー解析を使用するノンパラメトリック検定によって統計的有意差を決定し、スピアマン検定(*P<0.05)によって相関を解析した。E) Ly6G遺伝子座のtdTomatoのノックインを有するマウスを抗GBM腎炎にさせた。14日目に、示した組織をナイーブマウス(対照)および抗GBM腎炎にさせたマウスから単離し、CD45+、Lin-およびtdTomato陽性細胞をDCマーカ(CD11c+MHCI I+)について評価した。この集団をDCマーカについてさらに解析し(中央のパネル)、DCサブセットマーカ(下のパネル)を抗GBM腎炎にさせたマウスにおいてさらに評価した。ダンボンフェローニを用いる対応のない比較に関するスチューデントt-検定を使用して、抗GBM腎炎動物に対する対照のtdTomato+CD11c+MHCI I+、CD86+またはCCR7+事象の平均パーセンテージを比較した。*P<0.

10

20

30

40

50

0.5 および $**P < 0.005$ 。F～G) 野生型、 $\gamma^{-/-}$ 、FcγRIIA (2A) / $\gamma^{-/-}$ および FcγRIIIB (3B) / $\gamma^{-/-}$ マウス由来の好中球を SLE IC (F) または FcγRIIIB 抗体-抗原コンジュゲート (3G8-OVA) (G) と共にインキュベートし、A) におけるように解析した。多重 t-検定を使用して、OVA と OVA-IC または正常 (N) と SLE (S) の血清の間の有意差を決定した ($**P < 0.005$)。

【図 1 C】 (上記の通り。)

【図 1 D】 (上記の通り。)

【図 1 E】 (上記の通り。)

【図 1 F-G】 (上記の通り。)

【図 2 A】 好中球の FcγRIIA または FcγRIIIB による抗原の取り込みによって、CD4 および CD8 細胞を活性化する DC が生成される。A) 単離した WT および $\gamma^{-/-}$ 好中球を FITC-OVA または FITC-OVA-IC と共に、示した時間インキュベートした。FITC 陽性シグナルは、FITC-OVA 取り込みの尺度である。陽性細胞の平均 $\% \pm s.e.m.$ を与える。1 群当たり $n = 5$ 。対応のない学生 t-検定を使用して、様々な時点の WT と $\gamma^{-/-}$ の間の $Ly6G^{+}FITC^{+}$ 事象の平均パーセンテージを比較した ($**P < 0.005$)。B～C) NDDC を、GM-CSF 単独 (-)、OVA または OVA-IC により生成した。培養の 3 日後に、付着細胞を、H2Kb-MHC クラス I との関連で OVA^{257~264} ペプチドを認識する CFSE 標識 CD8⁺ T 細胞である OT-I と共にインキュベートした。陽性対照として、GM-CSF で生成した NDDC を、OVA ペプチド SIINFEEK (B)、または I-Ab-MHC クラス II との関連で OVA^{323~339} ペプチドを認識する CD4⁺ T 細胞である OT-II (C) でパルス標識した。CFSE 色素希釈は、増殖細胞の別個の世代を表す。グラフは、細胞分裂の平均 $\% \pm s.e.m.$ を示す。ダネット多重比較を用いる一元 ANOVA を使用して、示されたように異なる遺伝子型の GM-CSF (-)、OVA および OVA-IC の平均パーセンテージを比較した。* $P < 0.05$ および $**P < 0.005$ 。D) MyD88/TRIF^{-/-} マウスから単離した好中球を B～C におけるように処置し、OT-I および OT-II の増殖を評価した ($n = 2$)。

【図 2 B】 (上記の通り。)

【図 2 C】 (上記の通り。)

【図 2 D】 (上記の通り。)

【図 3 A-B】 好中球由来の DC は遊走性であり、抗原依存性遅延型過敏性応答および B16F10 腫瘍免疫を促進する。野生型 (A、C～E) または β -アクチン-RFP (B) マウス由来の OVA-IC または OVA を与えられた好中球を *ex vivo* で培養し、NDDC を生成した。A) NDDC を CFSE 標識し、-3 日目に *i.v.* 注射した。0 日目に、血液、脾臓、肝臓および肺中のそれらの存在をフローサイトメトリーによって決定した。B) -7 日目および 0 日目に、マウスの足蹠に OVA-IC β -アクチン-RFP⁺ NDDC を注射し、膝窩リンパ節に生体内顕微鏡を実施した。ドゥエル時間の秒数、NDDC の存在下または非存在下での視野 (FOV) における OT-I 細胞数および RFP⁺-NDDC と相互作用する OT-I 細胞数を評価した。データは、 $n = 3$ のマウスの、マウス 1 匹当たり 3 視野からの平均であった (* $P < 0.05$ 、 $**P < 0.005$)。NDDC 周囲の OT-I-GFP⁺ CD8⁺ T 細胞のクラスター形成および NDDC を含まないエリアにおける CD8⁺ T 細胞のランダム分布の代表的画像を示す。スケールバー: 15 μ M。C) OVA または OVA-IC により生成した NDDC を -7 日目に *i.v.* 注射した。0 日目に、可溶性 OVA (+) または PBS (-) を、それぞれ、右足蹠または左足蹠に注射した。1 日目に、両足蹠における足蹠膨潤を評価し、組織学的解析のために足を回収した。炎症スコアを右のパネルに示す。対応のない学生 t-検定を使用して、足蹠厚および炎症スコアの平均パーセンテージを比較した。t-検定によって有意差を評価した (* $P < 0.05$ および $**P < 0.005$)。D) NDDC (OVA なし)、または WT もしくは MyD88/TRIF^{-/-} 由来の OVA もしくは OVA-IC

10

20

30

40

50

A-I Cを負荷されたNDDCを、-7日目にi.v.注射した。B16F10-OVA細胞を0日目にs.c.で埋め込み、腫瘍体積を経時的に測定した。1群当たりのマウス数は括弧内である。すべての他の群に対するOVA-I Cの腫瘍体積のデータ比較のために一元ANOVAを使用した(*P<0.05および**P<0.01)。回収時に、OVA(左)およびOVA-I C(右)群の脾臓(上)および流入領域リンパ節(下)のOVAペプチド特異的CD8⁺T細胞を、OVA-ペプチド四量体複合体を使用して、FACによって定量した。平均±s.e.m. 対応のない学生t-検定を使用して、OVA-I C試料に対してOVAを比較した。**P<0.01。E) レシピエントWTマウスに、D) におけるように、OVA-I Cを負荷されたNDDCをi.v.で、およびB16F10-OVAをs.c.で注射し、タイムラインに示したように、抗CD4もしくは抗CD8枯渇抗体またはアイソタイプ対照による処置に供した。腫瘍成長を経時的に評価した。1群当たりのマウス数は括弧内である。一元ANOVAを使用して、抗CD8と抗CD4またはアイソタイプとの間の腫瘍体積を比較した(*P<0.05および**P<0.01)。血液試料のFAC解析によって、CD8およびCD4⁺T細胞枯渇を確認した(右のパネル)。対応のない学生t-検定を実施し、アイソタイプと比較した(**P<0.01)。

【図3C】(上記の通り。)

【図3D】(上記の通り。)

【図3E】(上記の通り。)

【図4A】血中の好中球上のFcγRIIIBの抗体にコンジュゲートした抗原とのエンゲージメントによって、免疫原性DCが生成される。野生型、γ^{-/-}、FcγRIIA(2A)/γ^{-/-}、FcγRIIIB(3B)/γ^{-/-}およびFcγRIIIB+FcγRIIA(2A3B)/γ^{-/-}マウスを使用した。A) FITC-OVA(3G8-OVA)にコンジュゲートした抗FcγRIIIB 3G8抗体をマウスにi.v.で与え、FITC-OVAの取り込み(上のパネル)ならびに好中球およびDCのマーカー(中央と下のパネル)を、示した時間に血中および脾臓中で評価した。血中の代表的なFACプロファイルを示す。一元ANOVAを実施して、γ^{-/-}と3B/γ^{-/-}または2A3B/γ^{-/-}との間の平均±s.e.m.を比較した(**P<0.005)。B) -3日目に3G8-OVAの、および0日目にCFSE標識したOT-I CD8⁺T細胞のi.v.注射をマウスに与えた。3日目に、脾臓を回収し、CD8の増殖をCFSE希釈によって評価した。脾臓におけるCD8分裂細胞(バー)および開始時のCD8集団(Con、ライトグレー)の代表的ヒストグラムを示す。ANOVAおよびダネットの補正を使用して、γ^{-/-}と2A3B/γ^{-/-}または3B/γ^{-/-}マウスとの間の有意差を決定した(**P<0.005)。C) -10日目に3G8-OVAの、ならびに0日目に、それぞれ高度および低度のCFSEで標識した、OVA-ペプチドでパルス刺激されたおよびパルス刺激されていない、標的野生型脾細胞のi.v.注射をマウスに与えた。16時間後に脾臓を回収し、死滅した標的細胞の%を評価した。平均±s.e.m.を評価し、ANOVAおよびダネットの補正を使用して統計的有意差について比較した。WTを2A3B/γ^{-/-}、3B/γ^{-/-}、2A/γ^{-/-}およびγ^{-/-}と比較した。**P<0.005。D~F) -10日目から-5日目に毎日、GM-CSFのi.p.注射を、および-10日目に3G8-OVAまたはFITC-OVAのi.v.注射をマウスに与えた。0日目に、B16F10-OVA細胞を皮下に埋め込んだ。D) 腫瘍成長を評価した。群当たりのマウス数は括弧内であり、スケールバー=5mmであり、腫瘍成長速度の統計解析は、追加の図S3に記載した。2A3B/γ^{-/-}+3G8-OVAと他の群の間で**p<0.005。E) 回収時に、MHC I四量体、CD4およびTreg細胞を使用して、OVA-ペプチドに特異的なCD8エフェクターT細胞(CD62^{lo} CD44^{hi})について脾臓を解析した。γ^{-/-}およびWTに対する2A3B/γ^{-/-}の有意差について、ダネットの多重比較を用いる一元ANOVAを使用した。*P<0.05。F) GM-CSFで前処理したヒトの全血を3G8-OVAまたはFITC-アイソタイプ対照と共にインキュベートし、示した時間に、%FITC陽性好中球を決定した。3G8とは別

10

20

30

40

50

個のエピトープに結合する抗FcγRIIIB抗体REA (589) を使用して、FcγRIIIBの内在化を評価した。抗体IV.3を使用して、FcγRIIAレベルを評価した。多重t-検定を使用して、示した時点におけるアイソタイプと3G8-OVAの間の有意差を評価した (**P<0.005)。G) F) におけるように処理した血液を、白血球を単離するためのHetaSep処理およびRBC溶解に供した。細胞を2日間培養し、好中球(CD10、CD15) およびDC (CD11c、MHCI) マーカーについて解析した。この集団を、共刺激分子、CD80、CD86、ケモカイン受容体CCR7およびDCサブセットマーカー(XCR1、Clec9A、CD141) についてさらに調査した。アイソタイプと3G8-OVAで処理した血液試料の間の有意性について、多重t-検定による比較を行った (*P<0.05および**P<0.005)。

10

【図4A-2】(上記の通り。)

【図4B-C】(上記の通り。)

【図4D】(上記の通り。)

【図4E-F】(上記の通り。)

【図4G】(上記の通り。)

【図5A】A) マウスの骨髄から単離したマウス好中球の純度を評価するためのゲーティング戦略。細胞を、CD11b、Ly6G、MHCI、CD11cおよびCD115で染色し、評価した。B) モデルICまたはそれらの個々の構成成分で処置した好中球から生成したNDDC上でのDCマーカーCD11cおよびMHCI、共刺激分子CD80およびCD86ならびに遊走受容体CCR7の発現に関するゲーティング戦略。OVA-ICにより生成したNDDCに関する代表的戦略を示す。単一細胞をFSC-HおよびFSC-Aを使用してゲートした。系統マーカー(CD3、NK1.1、CD19) に対して陰性であり、固定可能な生存率色素(fixable viability dye) に対して陰性であるすべての生細胞を、CD11c、MHCIおよびLy6Gに対してさらにゲーティングした。次いで、CD80、CD86およびCCR7の発現について、陽性細胞をチェックした。C) 示されたモデルICまたは個々の構成成分を使用して、NDDCを生成した。3日後に、XCR1、CD8aおよびCD103(DC1サブセット) またはCD11c⁺MHCI⁺Ly6G⁺細胞上のSiglec-H(形質細胞様DCマーカー) について、細胞を解析した。データは、一元ANOVAおよびダネットの多重比較検定に基づく、すべてのモデルICに関するOVA-ICまたは抗OVAに対するOVAの平均±s.e.m.の間の比較である。D) 正常な血清(NHS)、SLE患者の血清または正常もしくは抗RNP陽性SLEの血清由来のRNPおよびIgGを用いて生成したICと共に培養した好中球上でのDCマーカー、共刺激分子およびCCR7の発現に関するゲーティング戦略。SLE血清により生成したNDDCに関する代表的戦略を示す。E) NHS、SLE患者の血清、または正常もしくは抗RNP陽性SLEの血清由来のRNPおよびIgGを用いて生成したICから生成したNDDC上のXCR1、CD8aおよびCD103(DC1サブセット) のサブセット解析。F) CD80、CCR7およびDCサブセットマーカーについて解析したヒト対照およびSLE患者由来の血液試料に関するゲーティング戦略。G) WTおよびMyD88^{-/-}TRIF^{-/-}由来のNDDCを、CD11c、MHCIおよびLy6Gの発現について解析した(上のパネル)。陽性細胞をCD86、CD80(中央のパネル) およびCCR7(下のパネル) についてさらに評価した。ダンボンフェローニによる対応のない比較のためのスチューデントt-検定を使用した (**P<0.005)。

20

30

40

【図5B-C】(上記の通り。)

【図5D-E】(上記の通り。)

【図5F】(上記の通り。)

【図5G】(上記の通り。)

【図6】WTおよびβ2マイクログロブリン欠損(-/-) マウスから単離した好中球を、GM-CSF単独(-)、OVAまたはOVA-ICで処理し、3日間培養した。付着したNDDCをCFSE標識したOT-I T細胞またはOT-II T細胞と共に培養した

50

。OT-I増殖に対する陽性対照として、GM-CSFで生成したNDDCを、OVAペプチドSIINFELKでパルス刺激した。CFSE色素希釈によって、増殖パーセントを測定した。

【図7A】A) FITC-OVAにコンジュゲートした抗FcγRIIIB 3G8抗体(3G8-OVA)を、i.v.でマウスに与えた。3.5時間後、血液を単離し、FITC-OVA、FcγRIIIB(CD16)およびFcγRIIA(CD32)の内在化を評価した。抗CD16抗体であるREA 589は、3G8とは別個のエピトープに結合する。FITC-OVA、FcγRIIIBおよびFcγRIIAのゲーティング戦略を示す。B) FcγRIIIB+FcγRIIAを発現するヒト化トランスジェニックマウスにおけるCD115⁺およびLy6C^{hi}細胞におけるFcγRIIIBおよびFcγRIIA発現の基礎レベルを決定するためのゲーティング戦略。CD115⁺Ly6C^{hi}集団(n=4)に対して、FcγRIIIBおよびFcγRIIAに対する平均±s.e.m.を与える。C) 3G8-OVAコンジュゲートのi.v.注射の72時間後に、2A3B/γ^{-/-}およびγ^{-/-}マウスの脾臓におけるCD11c⁺MHCII⁺NDDCの3G8-OVA陽性事象の存在を評価するためのゲーティング戦略。D) 回帰解析を使用して、異なる群間の傾斜曲線係数(腫瘍成長率)を比較した。Prismによる回帰解析を使用し、傾斜と切片が異なるか否かについて検査した。一元ANOVAおよびダネットの多重比較を使用して、全体的比較を行った。すべての群の腫瘍体積に関する傾向線をExcelを使用して作成して示す。2A3B/γ^{-/-}+3G8-OVAにおける腫瘍成長をWT+FITC-OVA、γ^{-/-}+3G8-OVAおよび3B/γ^{-/-}と比較した(**P<0.005)。E) B16F10-OVAを注射したマウスから回収した脾臓のT細胞サブセット解析の表。MHCII-四量体ならびにCD8エフェクター、CD4およびTreg細胞に関するマーカーを使用して、OVAペプチドに特異的なCD8エフェクターT細胞(CD62^{lo}CD44^{hi})について、脾臓を解析した。T細胞活性化マーカー(CD25;CD69)増殖マーカー(Ki67)、転写調節因子(tbet)およびPD1に関する結果も示す。他の群と比較した2A3B/γ^{-/-}+3G8-OVAにおいて**P<0.05。

【図7B】(上記の通り。)

【図7C-D】(上記の通り。)

【図7E】(上記の通り。)

【図8】FcγRに媒介される抗原-抗体取り込みにより、抗原特異的T細胞応答を促進する抗原を負荷された樹状細胞への好中球の分化がもたらされる。抗原-抗体免疫複合体(IC)とex vivoでインキュベートした好中球は、抗原取り込みを増強する(1)。i.v.注射した抗FcγRIIIB抗原(タンパク質またはペプチド)コンジュゲート(FcγRIIIBワクチン)は、抗原に選択的に結合し、好中球による抗原内在化を誘発する(2)。方法1)または2)によるFcγRのエンゲージメントにより、好中球の樹状細胞への分化およびMHCIIおよびMHCII上での抗原の効率的負荷を促進するシグナルが伝達される。i.v.注射したNDDC(1)またはin vivoで生成したNDDC(2)は脾臓に移動する。ここで、これらはナイーブCD4⁺およびCD8⁺T細胞に対して抗原を提示し、脾臓から遊走して、それぞれ、ヘルパーT細胞応答および細胞溶解応答を促進する抗原特異的エフェクターT細胞を生成する。

【図9A-B】A) 腫瘍抗原にコンジュゲートした抗FcγRIIIB抗体を含むNDDCワクチンの略図。B) 好中球を標的とする抗FcγRIIIB抗体のみ(外因性抗原を含まない)を使用する方法の略図。C) 一実験では、活性化T細胞によるIFN生成を検出したELISPOTアッセイの定量が示される。この実験は、独立した正常なドナーおよび患者1(急性骨髄性白血病と診断された)および患者2(骨髄異形成症候群と診断された)に対する2つの実験のうちの1つの代表例である。D) アイソタイプ対照またはワクチンと共にインキュベートした示された試料に対する代表的画像を示す。

【図9C-D】(上記の通り。)

【発明を実施するための形態】

【0026】

ヒトでは、循環血液の白血球の60～70%は好中球であり、これらは、病原体を破壊し、寿命の制限された最終分化形態であると考えられる免疫エフェクター細胞である⁴。しかし、生存因子GM-CSFおよびサイトカインと共に培養された好中球は、DC表現型マーカーおよび機能的特徴を獲得することができ⁵、マウスおよびヒト患者の炎症病変において検出される^{5、6}。エフェクター免疫における好中球由来のDCの効力、潜在的に、好中球由来のDCを遊走および交差提示させることができる分子経路の特定、および治療効果のためにこれらの細胞を可能な限り利用するための戦略は、ほとんど検討されていない。

【0027】

骨髓細胞上に存在する低親和性FcγRは、抗原-抗体免疫複合体(IC)に結合し、いくつかの免疫機能を媒介する^{7、8}。マウスでは、FcγRIIIおよびFcγRIVは、細胞表面での発現およびシグナル伝達のために、疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含有するγ鎖を必要とし、γ鎖欠損を有するマウス(γ^{-/-})は、いくつかの自己免疫疾患モデルにおいて、組織傷害から保護される。しかし、マウスおよび非ヒト霊長類のFcγRのレパートリーは、ヒトと異なる^{7、8}。ヒトは、好中球、単球、好酸球、DCおよび血小板上に低親和性ITAM含有単一ポリペプチドであるFcγRIIAを発現するが、一方、グリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)と連結したFcγRIIIBは、好中球上でほとんど排他的に発現される。γ鎖が会合したFcγRIIIAは、ナチュラルキラー細胞および単球/マクロファージ上で発現される⁹。FcγRIIAは、好中球の細胞傷害機能を促進し¹⁰、DCでは、そのマウスのカウンターパートがそうであるように¹²、成熟および交差提示を増強する¹¹。マウスにおけるFcγRIIAのトランスジェニック発現は、自己免疫媒介性傷害に対する感受性を増加させ、抗腫瘍ワクチン応答を駆動し^{11、12}、アナフィラキシーを促進し得る⁹。FcγRIIIBの機能についてはほとんど知られていない。これは、FcγRIIAと共同して一部の好中球の機能を促進し¹⁰、単独で、ICにより誘導される好中球の蓄積をサポートすることができる¹³。さらに、FcγRIIAと同様に、FcγRIIIBは、ICの形質膜陥入を生じ、血管壁内に沈着したICの取り込みをサポートすることができる¹⁴。FcγRIIIBは、主に、B細胞、マクロファージおよびDC上で発現されるヒトおよびマウスにおいて保存された阻害性受容体である⁸。これは、好中球上でも検出されるが、主に、稀なFcγRIIB.4プロモーターハプロタイプを有する個体において検出される¹⁵。

【0028】

理論に拘束させることを望むものではないが、本明細書において示されるように、血中好中球のFcγRに媒介される抗原取り込みによって、抗原取り込みと成熟DC様表現型への好中球の分化とを同時に駆動するシグナルが伝達され、よって、脾臓に蓄積し、MHCIおよびMHCIに依存するT細胞活性化を促進する、抗原を負荷された多数のDCが確保される(図8の概略図を参照されたい)。抗体に媒介される腎臓炎症のモデルおよび高循環レベルの免疫複合体を有するSLE患者におけるNDDCの存在は、免疫複合体がin vivoでのNDDC生成を促進することができることを示唆する。FcγRに媒介される抗原-抗体取り込みの分化とのカップリングにより、抗原への二次的曝露中の場合のように、オプソニン化された非自己抗原由来のペプチドのCD8⁺細胞傷害性細胞への提示が優先的に有利になるため^{11、12}、自己免疫応答が回避され得る。FcγRIIIBの単独でのエンゲージメントは、好中球の、遊走性の交差提示DCへの分化を誘発するのに十分である。これにより、血液由来の抗原に応答する自然免疫と獲得免疫を関連付ける際のこの謎に包まれた好中球特異的GPI連結受容体の新たな役割が特定され、ICにより誘導される分化はITAMシグナル伝達を必要としないことを示す。しかし、in vitroでT細胞増殖を刺激する同等の能力にもかかわらず(図2B~C)、FcγRIIAとFcγRIIIBの両方を発現するマウスは、優れたCTL増殖、標的細胞の死滅を有した(図4B~C)。古典的なDCでは、持続的なT細胞応答には、TLRリ

10

20

30

40

50

ガンドおよび／または追加の共刺激シグナルの同時送達が必要とされる¹。FcγRに依存するNDDCの生成は、アジュバントの非存在下で生じ、代わりにGM-CSFを必要とした。臨床的には、豊富に存在する血中好中球からex vivoでDCを生成することによって、がん免疫療法のための自己DCの生成におけるアフェレシスの、現在の必要性を回避することができる¹。ADCCとFcγRによるワクチン効果の両方を示すことが公知の抗腫瘍抗体であるモノクローナル抗体¹¹でオプソニン化された腫瘍細胞との好中球の培養によって、オプソニン化された腫瘍細胞の抗原サンプリングも促進され、同時に、好中球はDC分化へと駆動され得る。FcγRIIIB抗体-抗原コンジュゲートによる静脈内免疫化は、in situで多量のDCを生成するのと、最適なT細胞活性化および交差提示のための抗原を送達するのとの両方のロバストなプラットフォームとなり得る。注目すべきことに、がんにおける好中球の腫瘍形成促進機能と抗腫瘍形成機能については記載されてきたが³²、生体防御において周知のオプソニン受容体であるFcγRのエンゲージメントによって、好中球の腫瘍形成促進能が利用され得る。まとめると、本研究は、DCを生成することと、交差提示に好ましい区画に抗原を送達することの両方のための新たな経路としてのFcγRIIIBに媒介される抗原の送達を特定した。このプロセスは、必要に応じてGM-CSF処置と組合せて、がんおよび感染症と闘うために免疫原性DCを生成するよう活用することができる。

【0029】

よって、抗原特異的免疫を誘導する（例えば、がんまたは感染症を処置する）方法が本明細書において提供される。これらの方法は、抗原を好中球に送達し、その結果、抗原取り込みによって、CD4+ヘルパーT細胞およびCD8+細胞傷害性T細胞を活性化する抗原提示DCへの、好中球の分化が誘発される。送達の方法は、1) ヒト特有のFcγRIIA、およびGPIに連結したFcγRIIIBまたはマウスの対応物を好中球上でエンゲージして、続いて患者に投与されるin vitroでNDDCを生成する抗原-抗体免疫複合体、および2) ヒト好中球の表面で選択的に発現され、in vivoでNDDCを生成することが知られている、活性化ヒトFcγRIIIBをエンゲージする抗原（ワクチン）にコンジュゲートした抗FcγRIIIB抗体である。好中球のDCへの分化を誘導することに加えて、抗原送達の上記方法は、可溶性抗原の提示より優れた抗原提示をもたらす、このことは、免疫複合体に存在する抗原提示が可溶性抗原のものを上回るという古典的DCにおける公開された知見（Wen et al., EMBO Mol Med 8, 1120-1133 (2016)）と一致する。

【0030】

よって、対象を処置するための2つの方法が本明細書に記載される。方法1または2のいずれかを使用して、がんまたは感染性疾患を有する患者を処置して、がんまたは感染症のリスクを低減するために予防ワクチンとして潜在的に使用して、抗原特異的免疫を増加させることができる。

【0031】

この文脈で使用される場合、がんを「処置する」ことは、がんの少なくとも1つの症状を改善することを意味する。がんの処置のための本明細書に記載の化合物の治療有効量の投与によって、低下または安定化した腫瘍負荷、低下または安定化した腫瘍サイズ、低下または安定化した腫瘍成長率、低下または安定化した腫瘍血清マーカー、および低下または安定化した転移のリスクがもたらされ得る。対象は、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトまたは獣医学の対象であってもよい。ヒトは、本明細書における例としてヒトが使用されるが、他の哺乳動物も、種に適切な抗体および他の試薬を用いて、本発明の方法を使用して処置されてもよい。

【0032】

本方法は、全体的に、腫瘍、例えば、がんを有する対象を特定するステップを含む。本明細書で使用される場合、用語「がん」は、自律的成長に対する能力、すなわち、急速に増殖する細胞成長によって特徴付けられる異常な状況または状態を有する細胞を指す。過剰増殖性疾患および新生物疾患の状況は、病理性、すなわち疾患状況の特徴付けるかもし

10

20

30

40

50

くは構成するものとして分類されてもよく、または非病理性、すなわち正常からは逸脱するが、疾患状況に関連しないものとして分類されてもよい。一般的に、がんは、1つまたは複数の腫瘍、すなわち異常な細胞集団の存在に関連することになる。用語「腫瘍」は、組織病理学的な種類または侵襲性の段階とは関係なく、すべてのタイプのがん性成長または発癌プロセス、転移組織または悪性に形質転換された細胞、組織、もしくは器官を含むことを意味する。「病理学的過剰増殖性」細胞は、悪性腫瘍成長によって特徴付けられる疾患状況において生じる。一般的に、本明細書に記載の方法は、免疫系の細胞の悪性腫瘍である、固形腫瘍または造血器腫瘍を有する対象において実践され得る。がんを有する対象を特定または診断するための方法は、当技術分野で公知である。

【0033】

腫瘍は、様々な器官系、例えば肺、乳房、甲状腺、リンパ系、消化管、および尿生殖器管の悪性腫瘍、ならびにほとんどの結腸がん、腎細胞癌、前立腺がんおよび／または精巣腫瘍、肺の非小細胞癌、小腸のがんおよび食道のがんなどの悪性腫瘍を含む腺癌を含む。用語「癌」は、当技術分野で認識されており、呼吸器系癌、消化器系癌、尿生殖器系癌、精巣癌、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌、および黒色腫を含む上皮または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。一部の実施形態では、疾患は、腎癌または黒色腫である。例示的な癌としては、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸および卵巣の組織から形成されるものが挙げられる。この用語は、例えば、癌および肉腫の組織から構成される悪性腫瘍を含む、癌肉腫も含む。「腺癌」は、腺組織に由来するかまたは腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌を指す。用語「肉腫」は、当技術分野で認識されており、間葉系の派生物である悪性腫瘍を指す。

【0034】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法によって評価または処置されるがんとしては、上皮がん、例えば、肺がん（例えば、非小細胞肺がん（NSCLC））、乳がん、結腸直腸がん、腎臓がん、頭頸部がん、前立腺がん、または卵巣がんが挙げられる。上皮悪性腫瘍は、上皮組織に罹患するがんである。

【0035】

NDDC療法の潜在的標的であるがんの追加の例としては、悪性血液疾患が挙げられる。本明細書で使用される場合、用語「血液腫瘍」は、骨髄の前駆体細胞に対して生じるがん、例えば、急性白血病、骨髄増殖性腫瘍、および骨髄異形成症候群；末梢リンパ組織から生じるがん、例えば、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、および白血病もしくは成熟TおよびB細胞（例えば、慢性リンパ球性白血病）；または形質細胞もしくは形質細胞前駆体から生じるがん（例えば、多発性骨髄腫およびリンパ形質細胞性リンパ腫）を含む。

【0036】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法によって評価または処置されるがんとしては、骨髄性腫瘍、免疫系の悪性腫瘍、例えば、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、または骨髄増殖性腫瘍（MPN）が挙げられる。

【0037】

方法1 - 細胞療法

第1の方法は、GMCSFの存在下で、FcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBに結合し、好中球の樹状細胞（DC）への分化を促進する抗原-抗体免疫複合体に曝露される好中球の使用を含む。これらのDCは、本明細書において、NDDCと称され、GM-CSFと可溶性抗原によって生成されるDCよりも、CD4+T細胞およびCD8+T細胞の増殖を促進するのにより有効であることが期待される。好中球は、ヒトの循環白血球の55～70%に相当するため、より多数の好中球を単回の採血において回収することができる。本方法は、活性化FcγRを、古典的DCの特定の特徴である、分化を促進させることと、CD4+T細胞への抗原提示およびCD8細胞への交差提示を容易にすることの両方にエンゲージする免疫複合体を、*in vitro*で抗原に送達する。

【0038】

一般的に、本方法は、好中球の集団を準備するステップを含む。好ましくは、好中球は、自己由来であるが、HLA適合の異種好中球を使用してもよい。末梢血の試料から好中球を得るための方法は、当技術分野で公知であり、市販のヒト好中球濃縮キット（EAS YSEP）を含んでもよい。一部の実施形態では、好中球の集団は、FcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBを発現する細胞に関して、例えば、FACS、マイクロ流体デバイス、または他の細胞選別方法を使用して濃縮される。

【0039】

好中球をGMCSF（例えば、5～15 ng/ml、例えば8～12 ng/ml、例えば10 ng/mlのGMCSF）および抗原-抗体免疫複合体の存在下でインキュベートする。これらの免疫複合体としては、腫瘍関連抗原（例えば、がん精巢（CT）抗原、ヒト生殖系細胞においてのみ正常に発現されるが、悪性腫瘍のサブセットには存在しないタンパク質）、例えば、表Aに列挙されたCT抗原、または腫瘍特異的変異から生じるネオ抗原が挙げられる。ネオ抗原は、タンパク質配列を変更するいずれかのゲノム変異から生じ得る。例えば、Hu, Ott, Wu “Towards personalized, tumor-specific, therapeutic vaccines for cancer.” Nat Rev Immunol. 2018 Mar;18(3):168-182; Vigneron et al., Cancer Immun. 2013; 13: 15; Hutchison and Pritchard, Mamm Genome. 2018; 29(11): 714-730; Teku and Vihinen, Sci Rep. 2018; 8: 12735; Renkvis t et al., Cancer Immunology and Immunotherapy 2001; 50:3-15を参照されたい。

【0040】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 A - 腫瘍抗原(CT 抗原)

MAGEA1	SPANXN3	TAF7L	
MAGEA2	SPANXN4	TDRD1	
MAGEA3	SPANXN5	TDRD6	
MAGEA4	XAGE1D	TDRD4	
MAGEA5	XAGE1C	TEX15	
MAGEA6	XAGE1B	FATE1	
MAGEA8	XAGE1	TPTE	
MAGEA9	XAGE2	CT45A1	
MAGEA10	XAGE3	CT45A2	10
MAGEA11	XAGE-3b	CT45A3	
MAGEA12	XAGE-4/RP11-167P23.2	CT45A4	
BAGE	XAGE5	CT45A5	
BAGE2	DDX43	CT45A6	
BAGE3	SAGE1	HORMAD1	
BAGE4	ADAM2	HORMAD2	
BAGE5	PAGE5	CT47A1	
MAGEB1	CT16.2	CT47A2	
MAGEB2	PAGE1	CT47A3	
MAGEB5	PAGE2	CT47A4	
MAGEB6	PAGE2B	CT47A5	
MAGEB3	PAGE3	CT47A6	
MAGEB4	PAGE4	CT47A7	
GAGE1	LIPI	CT47A8	20
GAGE2A	VENTXP1	CT47A9	
GAGE3	IL13RA2	CT47A10	
GAGE4	TSP50	CT47A11	
GAGE5	CTAGE1	CT47B1	
GAGE6	CTAGE-2	SLCO6A1	
GAGE7	CTAGE5	TAG	
GAGE8	SPA17	LEMD1	
SSX1	ACRBP	HSPB9	
SSX2	CSAG1	CCDC110	
SSX2b	CSAG2	ZNF165	
SSX3	DSCR8	SPACA3	
SSX4	MMA1b	CXorf48	
CTAG1B	DDX53	THEG	30
LAGE-1b	CTCFL	ACTL8	
CTAG2	LUZP4	NLRP4	
MAGEC1	CASC5	COX6B2	
MAGEC3	TFDP3	LOC348120	
SYCP1	JARID1B	CCDC33	
BRDT	LDHC	LOC196993	
MAGEC2	MORC1	PASD1	
SPANXA1	DKKL1	LOC647107	
SPANXB1	SPO11	TULP2	
SPANXC	CRISP2	CT66/AA884595	
SPANXD	FMR1NB	PRSS54	
SPANXN1	FTHL17	RBM46	
SPANXN2	NXF2	CT69/BC040308	40

【 0 0 4 1】

【表 1 - 2】

CT70/BI818097	CDCA1	TEKT5	
SPINLW1	PEPP2	NR6A1	
TSSK6	OTOA	TMPRSS12	
ADAM29	CCDC62	TPPP2	
CCDC36	GPATCH2	PRSS55	
LOC440934	CEP55	DMRT1	
SYCE1	FAM46D	EDAG, NDR	
CPXCR1	TEX14	DNAJB8	
TSPY3	CTNNA2	CSAG3B	
TSGA10	FAM133A	CTAG1A	10
HIWI, MIWI, PIWI	LOC130576	GAGE12B	
PIWIL2	ANKRD45	GAGE12C	
ARMC3	ELOVL4	GAGE12D	
AKAP3	IGSF11	GAGE12E	
Cxorf61	TMEFF1	GAGE12F	
PBK	TMEFF2	GAGE12G	
C21orf99	ARX	GAGE12H	
OIP5	SPEF2	GAGE12I	
CEP290	GPAT2	GAGE12J	
CABYR	TMEM108	GAGE13	
SPAG9	NOL4	LOC728137	
MPHOSPH1	PTPN20A	MAGEA2B	20
ROPN1	SPAG4	MAGEA9B/LOC728269	
PLAC1	MAEL	NXF2B	
CALR3	RQCD1	SPANXA2	
PRM1	PRAME	SPANXB2	
PRM2	TEX101	SPANXE	
CAGE1	SPATA19	SSX4B	
TTK	ODF1	SSX5	
LY6K	ODF2	SSX6	
IMP-3	ODF3	SSX7	
AKAP4	ODF4	SSX9	
DPPA2	ATAD2	TSPY1D	
KIAA0100	ZNF645	TSPY1E	30
DCAF12	MCAK	TSPY1F	
SEMG1	SPAG1	TSPY1G	
POTED	SPAG6	TSPY1H	
POTEE	SPAG8	TSPY1I	
POTEA	SPAG17	TSPY2	
POTEG	FBXO39	XAGE1E	
POTEB	RGS22	XAGE2B/CTD-	
POTEC	サイクリン A1	2267G17.3	
POTEH	C15orf60		
GOLGAGL2 FA	CCDC83		

【0042】

40

ネオ抗原が使用される場合、好ましくは個々の対象において発現されるネオ抗原が、例えば、Hu et al., Nat Rev Immunol. 2018 Mar;18(3):168-182 ; Ott et al., Nature . 2017 Jul 13;547(7662):217-221 ; Carreno et al., Science. 2015 348(6236): 803-808 ; および Linette and Carreno, Trends Mol Med. 2017 Oct;23(10):869-871に記載されるように特定および使用される。

【0043】

一部の実施形態では、腫瘍抗原は抗原を認識する抗体に結合し（抗原結合性ドメインを介して）、FcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBに結合し（Fcドメインを介して）、細胞表面の受容体にクラスター形成をもたらし、次に、FcγRおよび結合した抗体-抗原複合体の内在化をもたらす。一部の実施形態では、抗体は、IgGであり、好

50

ましくは処置される個々の対象から単離したIgGである。一部の実施形態では、IgGを精製するために、血清試料をプロテインG高性能アガロースビーズと共にインキュベートする；対象からIgGを精製するための他の方法を使用してもよい。あるいは、他の個体由来のIgG、例えば、市販のIgGを使用してもよい。組換えIgGを使用してもよい。ヒト対象では、好ましくは、ヒトまたはヒト化IgGが使用される。一部の実施形態では、抗体は、FcγRIIIBおよび／またはFcγRIIAに結合するために選択または最適化される。Fab領域は抗原を認識するが、一方、Fc領域はFcγRに結合する。Fcに対する親和性は、FcγRIIAおよびFcγRIIIBのバリエーションならびにIgGのサブクラスによって影響を受ける。ヒトIgGの4つのサブクラス（IgG1～4）が存在する。IgGのFcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBへの結合親和性は、IgG1およびIgG3に対して最も高い（Bruhns et al., Blood 113, 3716-3725 (2009); Ivan and Colovai, Hum Immunol 67, 479-491 (2006); Bruggeman et al., J Immunol 199, 204-211 (2017)）。補体活性化能がより低いことはFcγR結合にとって都合がよいため、IgG1はIgG3よりも好ましいことになる。ほとんどの抗腫瘍治療用抗体はまた、IgG1である。FcγR結合は、FcドメインのAsn297におけるN連結グリコシル化によって影響を受ける。コアN連結グリコフォームは、ガラクトース、フコースおよび／またはシアル酸により改変され、最大500の異なるグリコフォーム生成し得る（Jefferis, Nat Rev Drug Discov 8, 226-234 (2009)）。低フコシル化は、FcγRIIIBとのIgG1の相互作用によって好都合であるが、FcγRIIAへの作用は最小限である（Bruhns et al., Blood 113, 3716-3725 (2009); Bruggeman et al., J Immunol 199, 204-211 (2017); Jefferis, Nat Rev Drug Discov 8, 226-234 (2009); Mizushima et al., Genes Cells 16, 1071-1080 (2011); Ferrara et al., Proc Natl Acad Sci U S A 108, 12669-12674 (2011); Subedi and Barab, MAbs 8, 1512-1524 (2016); Peipp et al., Blood 112, 2390-2399 (2008)）。よって、低フコシル化されるIgG1は、好中球をFcγRIIAおよびFcγRIIIBとエンゲージするために生成されることになる。例えば、Derer et al., MAbs. 2014 Mar 1; 6(2): 409-421; Zhang et al., J Biol Chem. 2016 Dec 30; 291(53): 27134-27146; Derer et al., Blood 2013 122:3466; Bruhns et al., Blood 2009 113:3716-3725を参照されたい。

【0044】

一部の実施形態では、抗体は、抗原を認識し、それに直接結合する抗体である。例えば、腫瘍の細胞外または細胞内抗原への既存のまたは新たな治療用抗体（例えば、乳がんに対するHER2/neu、非小細胞肺癌のような多くの上皮腫瘍、結腸直腸がんに関するEGFR（例えば、Corraliza-Gorjon et al., 2017 Front Immunol. Doi.org/10.3389/fimmu.2017.01804を参照されたい）または外在化する細胞内のがんに関連するホスファターゼであるPRL-3（Trenevska et al., 2017 Front Immunol. Doi.org/10.3389/fimmu.2017.01001））である；あるいは、抗原は、抗体が結合するタグとの融合タンパク質として生成され得る。例えば、一部の実施形態では、抗原-抗体複合体は、抗原が「タグ」（例えば、患者において現在使用されるKLH、Wimmers et al., Scientific Reports 7, Article number: 43486 (2017)、またはポリヒスチジン、FLAG、Softag1およびSoftag3、ならびにStreptag II（例えば、Arnau et al., Protein Expression and Purification 48 (2006) 1-13を参照されたい））またはヒト化抗体が結合するヒトペプチド配列と共に生成される方法によって生成される。例えば、ヒト化マウス抗KLHモノクローナル抗体（Abcam、Sino Biologicals、Rockland Immunochemicals）を使用することができる。この方法なら、抗体を、各抗原に対して適合させる必要はないであろう。抗原/抗体免疫複合体は、好中球と共にインキュベートされて、NDDC提示抗原を生じることになる。

【0045】

好中球はまた、抗腫瘍抗体でオプソニン化された腫瘍細胞の存在下でインキュベートさ

10

20

30

40

50

れて、デブリおよび抗原の好中球による取り込みと、その後の抗原提示DCへの分化を生じ得る。

【0046】

好中球はまた、IV3がFcγRIIAを特異的に認識する抗FcγRIIB（3G8）-抗原コンジュゲート（方法2に記載される）およびFcγRIIA（IV3）-抗原コンジュゲートと共にインキュベートされてもよい。別の実施形態は、1つのIgG1分子内にFcγRIIBおよびFcγRIIAに対する抗原結合性部位を含有し、したがって、両方の受容体と同時にエンゲージおよびクラスター形成することになる二重特異的抗体である（Sedykh et al., 2018. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives Drug Des Devel Ther. 12: 195-208）。

10

【0047】

好中球は、免疫複合体およびGM-CSFの存在下で、細胞が樹状細胞（上記のように、本明細書においてNDDCと称される）へと成熟するのに十分長い間、例えば、2～5日間、インキュベートされる。

【0048】

NDDCは、必要に応じて、増殖を可能にするためにさらなる時間培養を維持され得る。次いで、細胞は、洗浄され、必要に応じて精製および／または濃縮され、対象に、例えば、静脈内に投与され得る。回収されたNDDCは、使用前に凍結されてもよい。

【0049】

本明細書において示されるように、*in vitro*で生成されたNDDCを、「モデル」抗原であるオボアルブミン（OVA）および抗OVAを用いて作製された抗原-抗体複合体と共に静脈内送達することによって、脾臓におけるそれらの蓄積が生じる。免疫化されたマウスは、典型的に、腫瘍の流入領域リンパ節の抗原特異的CD8⁺T細胞と関連する、B16F10-OVA黒色腫に対する免疫を示した。この免疫は、CD8⁺T細胞をマウスから枯渇させる場合、もとに戻った。さらに、免疫化されたマウスは、抗原に対する遅延型過敏性応答を示し、このことは、NDDCがCD4⁺T細胞機能を刺激することを示唆した。

20

【0050】

これらの特徴は、抗原の送達に利用される以下の2つの現在の技術より優れている：

【0051】

本発明の方法は、自己の単球を単離し、その後、サイトカインおよび抗原と共に細胞を培養することによって、*in vitro*で抗原負荷DCを生成し、その後、細胞を患者に再導入する、血液アフェレシスに依拠する現在使用されている技術に優る利点を提供する（例えば、Van Willigen et al., Frontiers in Immunol. 2018 Oct 1;9:2265; Tanyi et al., Sci Transl Med. 2018 Apr 11;10(436)を参照されたい）。末梢血細胞の小集団にしか相当しない血中単球（2%）とは異なり、好中球は、末梢血白血球の55～70%に相当し、このことにより、多数のこれらの細胞が単回の採血から単離され、NDDCへの分化が可能となり、血液アフェレシスの必要が排除される。FcγRIIAおよびFcγRIIBにエンゲージする免疫複体内の抗原の提示によっても、抗原交差提示およびCD8⁺T細胞の活性化が促進され、これは、可溶性抗原が単独で与えられる場合に最小である。

30

【0052】

方法2 - 抗原にコンジュゲートした抗FcγRIIB抗体

in vitro/ex vivoで細胞治療方法において使用するための細胞を準備するため、または*in vivo*で抗原への免疫応答を刺激するために、腫瘍抗原にコンジュゲートした抗FcγRIIB抗体を含む構築物が使用される方法も、本明細書において提供される。

【0053】

本明細書において示されるように、ヒトFcγRIIBまたはFcγRIIB+FcγRIIAを発現する好中球の、抗FcγRIIB-OVAコンジュゲート（ワクチ

40

50

ン)とのインキュベーションによって、抗原取り込みおよび好中球のNDDCへの分化転換が生じた。FcγRIIIBを欠如する好中球は、この処置に回答しなかった。抗原にコンジュゲートしたFcγRIIIB抗体(ワクチン)とインキュベートしたヒト好中球は、抗原を内在化させ、NDDCに分化する。

【0054】

よって、一部の実施形態では、コンジュゲートを、例えば、方法1において上記に記載したように、GMCSFの存在下で、ヒト好中球と共にインキュベートして、NDDCへの分化を駆動し、次いで、それを必要とする対象に投与することができる。

【0055】

in vivo実験では、抗FcγRIIIB-OVA抗原コンジュゲートの静脈内送達によって、抗原取り込みおよび血中でのNDDCの生成がもたらされ、脾臓に蓄積された。免疫化されたマウスは、in vivoでのCD8 T細胞増殖および細胞傷害性Tリンパ球(CTL)アッセイにおいて評価されたように、抗原特異的細胞溶解性CD8 T細胞を発生させ、B16F10-OVA黒色腫モデルにおいて抗原(すなわち、OVA)特異的CD8 T細胞を発生させた。抗FcγRIIIB-OVA抗原およびGM-CSFの5回連続の注射により処置されたマウスは、B16F10-OVA黒色腫モデルにおいて抗原(すなわち、OVA)特異的CD8+T細胞を発生させ、腫瘍成長の有意な低下を示した。

【0056】

よって、一部の実施形態では、コンジュゲートは、必要に応じてGMCSFに加えて、対象に静脈内送達される。これらの方法を使用して、抗原を静脈内に送達し、in vivoで、好中球のNDDCへの分化を促進し、次に、抗原特異的細胞傷害性T細胞を生成することができる。NDDCのin vivoでの生成は、好中球がNDDCへと分化するため、腫瘍細胞のファゴサイトーシスおよびトロゴサイトーシスによって、好中球が追加の抗原を取り込むことを可能にするという利点を有する。

【0057】

本発明の方法は、抗原にコンジュゲートした抗体の古典的なDC受容体への注入に依拠し、有効性のためにtolll様受容体アゴニストなどのアジュバント(Macri et al., Clin Transl Immunology, 2016 Mar 18;5(3):e66;これらのアジュバントは、本発明の方法を使用するのに必要とされない)を包含することを必要とする、現在使用されている技術に優る利点を提供する。関連する古典的DCサブセットにアクセスするための送達経路はまた、課題を残したままである。現在使用されている技術において標的とされるDC受容体は、他の細胞型において存在することが多く、このことは、望ましくない副作用の可能性を増加させるが、一方、本明細書に記載のアプローチは、好中球上にほとんど排他的に発現されるFcγRIIIBを特異的に標的とする。さらに、上記のように、DCに対して好中球を標的とすることは、好中球が循環白血球の大きな割合に相当するため、有利であり、これにより、in vitroだけでなくin vivoでも、生成され得る抗原提示細胞の数が増加する。

【0058】

本発明の方法では、腫瘍抗原にコンジュゲートした抗FcγRIIIBを含む構築物が使用される(例えば、図9Aを参照されたい)。腫瘍抗原は、上記に記載されている。抗FcγRIIIBは、これらを作製する方法がそうであるように、当技術分野で公知である。抗FcγRIIIB抗体は、例えば、Abbexa Ltd; Abcam; Abomics; antibodies-online; Aviva Systems Biology; Biogems International, Inc.; BioLegend; Biorbyt; CEDARLANE; Cell Sciences; Creative Diagnostics; Elabscience Biotechnology Inc.; EXBIO Praha, a.s.; GeneTex; Invitrogen Antibodies; LifeSpan BioSciences; MBL International; Miltenyi Biotec; MyBioSource.com; N

10

20

30

40

50

S J B i o r e a g e n t s ; O r i G e n e T e c h n o l o g i e s ; P e n i n s u l a L a b o r a t o r i e s I n t e r n a t i o n a l , I n c . ; P r o S c i , I n c ; R & D S y s t e m s ; S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , I n c . ; S i g n a l w a y A n t i b o d y L L C ; S i n o B i o l o g i c a l , I n c . ; S o u t h e r n B i o t e c h ; S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s , I n c . ; および United States B i o l o g i c a l から、市販されている。一部の実施形態では、抗体は、3 G 8 である（例えば、b i o l e g e n d 、 S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y などから入手可能；例えば、Perussia and Trinchieri, J Immunol. 1984 Mar;132(3):1410-5を参照されたい）。これらの抗体は、例えば、免疫原性を低下させるか、または半減期を変更するために、現状のまま使用されても改変されてもよい。

10

【0059】

一部の実施形態では、抗体は、マクロファージおよびNK細胞上に存在するF c γ R I I A (C D 1 6 a : G P I に連結したF c γ R I I I B の膜貫通型アイソフォーム、C D 1 6 b) も認識する。一部の実施形態では、抗体は、F c γ R I I I A に結合しないF c γ R I I I B 特異的抗体である。

【0060】

方法3 — 抗F c γ R I I I B 抗体（抗原にコンジュゲートしない）

一部の実施形態では、抗F c γ R I I I B は、骨髄性腫瘍および病原体もしくは感染細胞のデブリの取り込み後または病原体による好中球自体の感染後に、好中球が抗原を獲得する感染症を含むがこれらに限定されない、好中球が抗原の供給源である状態に対して、単独で（関連するコンジュゲートした抗原を含まない、例えば、図9Bを参照されたい）使用されてもよい。

20

【0061】

骨髄性腫瘍

特別ながん処置の問題は、骨髄性腫瘍（急性骨髄性白血病（A M L）、骨髄異形成症候群（M D S）、および骨髄増殖性腫瘍（M P N）を含む）、ネオ抗原を生じるドライバーおよびパッセンジャーの変異を有する自然免疫系の前駆細胞由来の高齢者の一般的腫瘍（Lindsley and Ebert, 2013）において見出される。これらの腫瘍は、通常、現在の化学療法レジメンによる処置後に再発し、患者は、高齢過ぎておよび／または病状が重すぎて、同種異型幹細胞移植に耐えることができないことが多い（Webster and Pratz, 2018）。

30

【0062】

腫瘍細胞を抗原提示細胞に変換するためのこれらのex vivoでの操作を伴う、これらの腫瘍、特にAMLに関するいくつかの免疫治療戦略が開発されている。これらの方法は、依然として、前臨床研究および臨床試験において評価されており、GMP実験室における腫瘍細胞の、抗原提示分子および共刺激分子をコードするcDNAによる変換（Shi et al., 2018）；腫瘍細胞の、これらの分子を発現する自己樹状細胞との融合（Rosenblatt et al., 2016）；または自己樹状細胞の、腫瘍ネオ抗原による負荷（例えば、（Van Acker et al., 2019）を参照されたい）（それぞれ、そのあとに、患者に再注入される）を、様々なかたちで伴う。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、変異したクローンを起源とする好中球をNDDCに変換するF c γ R I I I B 抗体（外因性抗原を含まない）を使用する。これは、方法1において上記のように対象由来の好中球を使用して、in vitroで、またはin vivoでなされてもよく、これにより、ex vivoでの操作に対する必要性、および多数の自己樹状細胞を単離する必要性（好中球の存在量が少ないことによる課題となり、よって血液アフェレシスを必要とし得る）も排除することになる。MHC I上に内因性ネオ抗原を負荷された、F c γ R I I I B 抗体により誘導されるNDDCは、自己T細胞の活性化を刺激し、これらの新生物の根源にある白血球幹細胞を含む悪性骨髄細胞を死滅させることになる。この戦略は、腫瘍細胞のex vivoでの操作を必要としないか、または腫瘍ネオ抗原についてのいかなる知識も必要とし

40

50

ない。これは、がん細胞が、それら自体に対する免疫応答を開始するように誘導される戦略であり、それ自体、現在利用可能な方法に対して実質的進歩を表す。

【0063】

感染性疾患

好中球は、病原体（例えば、細菌、真菌およびウイルス）もしくは感染した細胞物質の取り込みによって、または細胞内細菌（Rungelrath et al., 2020）、ヘルペスウイルス（Larochelle et al., 1998 ; Saez-Lopez et al., 2005）およびインフルエンザAウイルス（Cassidy et al., 1988 ; Hufford et al., 2012 ; Wang et al., 2008 ; Zhao et al., 2008）などのある特定の生物による直接的な感染によって、感染性疾患における免疫原性の「外来」抗原の供給源であってもよい。ウイルス感染した好中球は、CD8エフェクターT細胞を刺激してIFN γ を生成するが、抗腫瘍免疫に必須の細胞傷害性応答（Hufford et al., 2012）は刺激しないことが示された。さらに、好中球は、DCなどの古典的抗原提示細胞に限定された必須の特性であり、その後の免疫応答の開始に必要なとされる（Hufford et al., 2012）、ナイーブCD8 T細胞をプライミングすることは示されなかった。CD8エフェクターT細胞による認識とその後の標的細胞の死滅のためのMHCIでペプチドを提示する観察された能力は、病原体に対して宿主を保護するために進化したほとんどの有核細胞の共通する特性である。さらに、ウイルス感染した好中球は、CD8 T細胞応答および他の免疫機能をサポートし、よって、制限された抗原提示機能を有するナイーブおよびCD4エフェクターT細胞の活性化に必要なMHCIを発現しない。これらの方法は、直接感染したかまたは病原体を取り込んだ好中球を、*in vivo*で、抗Fc γ RIIIB-抗原コンジュゲートに関して示されたように（図4C）、ナイーブCD4およびCD8 T細胞の活性化を促進し、CD8 T細胞の細胞溶解機能を促進するNDDCへと変換するための、Fc γ RIIIB（外因性抗原を含まない）の使用を含む。これは、対象由来の好中球を使用して、方法1において上記されたように、*in vitro*で、または抗Fc γ RIIIB抗体の投与によって*in vivo*で、なされ得る。上記に記載したように、これは、免疫原性の病原体由来の抗原についてのいかなる知識も必要としない。

【0064】

抗体

用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、免疫グロブリン分子、好ましくはIgG、およびその改変形態、または抗原結合性断片、バリエーション、または誘導体を指す。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、脱免疫化もしくはヒト化抗体、完全ヒト抗体、非ヒト抗体、（例えば、マウス）、または単鎖抗体であってもよい。一部の実施形態では、抗体はエフェクター機能を有し、補体を固定し得る。抗体およびその断片を作製するための方法は当技術分野で公知であり、例えば、Harlow et al., editors, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) ; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, (N.Y. Academic Press 1983) ; Howard and Kaser, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* (CRC Press; 1st edition, Dec 13, 2006) ; Kontermann and Dubel, *Antibody Engineering Volume 1* (Springer Protocols) (Springer; 2nd ed., May 21, 2010) ; Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology) (Humana Press; Nov 10, 2010) ; およびDubel, *Handbook of Therapeutic Antibodies: Technologies, Emerging Developments and Approved Therapeutics*, (Wiley-VCH; 1 edition September 7, 2010) を参照されたい。抗体がファージディスプレイ技法によって得られる場合、BIAcoreシステムにおいて用いられるように表面プラズモン共鳴を使用して、本明細書に記載の抗体のいずれか1つのものと同じエピトープに結合するファージ抗体の有効性を増加させることができる（Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105 ; Malmborg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13）。キメラ抗体の産生について、例えば、国際公開第WO 89 / 09622号パンフレットにおいて記載されている。ヒト化抗体の産生のための方法は、例えば、欧州特許出願公開第023

9400号明細書および国際公開第WO90/07861号パンフレットに記載されている。本発明に従って利用される抗体のさらなる供給源は、いわゆる異種抗体である。マウスにおけるヒト様抗体などの異種抗体の産生に関する一般的原理は、例えば、国際公開第WO91/10741号パンフレット、同第WO94/02602号パンフレット、同第WO96/34096号パンフレットおよび同第WO96/33735号パンフレットに記載されている。

【0065】

本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合性断片、バリエーション、もしくは誘導体の改変形態は、当技術分野で公知の技法を使用して、全前駆体または親抗体から作製することができる。例示的な技法は、本明細書においてより詳細に議論される。本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合性断片、バリエーション、もしくは誘導体は、当技術分野で公知である技法を使用して、作製または製造することができる。ある特定の実施形態では、抗体分子またはその断片は、「組換え産生される」、すなわち、組換えDNA技術を使用して産生される。抗体分子またはその断片を作製するための例示的な技法は、本明細書の他の箇所により詳細に議論される。

【0066】

本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合性断片、バリエーション、もしくは誘導体は、例えば、共有結合によって、抗体がそのコグネートエピトープに特異的に結合することを妨げないような、いずれかの種類の分子の抗体への共有結合によって、改変される誘導体も含む。例えば、限定としてではなく、抗体誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解による切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結によって改変された抗体を含む。多数の化学改変のいずれかは、特定の化学開裂、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む公知の技法によって実行されてもよい。さらに、誘導体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

【0067】

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合性断片、バリエーション、もしくは誘導体は、処置される動物、例えば、ヒトにおいて、有害な免疫応答を誘引しない。ある特定の実施形態では、結合分子、例えば、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合性断片は、患者、例えば、ヒト患者に由来し、その後、それらが由来する同種、例えば、ヒトにおいて使用され、有害な免疫応答の発生を緩和または最小化する。

【0068】

脱免疫化も使用して、抗体の免疫原性を低下させることができる。本明細書で使用される場合、用語「脱免疫化」は、T細胞エピトープを改変する抗体の変更を含み、例えば、国際公開第WO98/52976号パンフレットおよび同第WO00/34317号パンフレットを参照されたい。例えば、開始抗体由来のVHおよびVL配列を解析し、各V領域由来のヒトT細胞エピトープの「マップ」は、相補性決定領域(CDR)および配列内の他の重要な残基に関してエピトープの位置を示す。T細胞エピトープマップからの個々のT細胞エピトープを、最終抗体の活性を変更するリスクの低い、代替アミノ酸置換を特定するために解析した。アミノ酸置換の組合せを含む代替VHおよびVL配列の範囲が示され、これらの配列は、その後、ある範囲の結合ポリペプチド、例えば、本明細書に開示される診断および処置方法において有用なFcγRIIIに特異的な抗体またはその免疫特異的断片へと組み込まれ、次いで、機能について試験される。典型的には、12から24個の間のバリエーション抗体が生成され、試験される。次いで、改変されたV領域およびヒトC領域を含む完全な重鎖および軽鎖を、全抗体の産生のために細胞株中に導入される発現ベクター、およびその後のプラスミド中にクローニングされる。次いで、抗体は、適切な生化学アッセイおよび生物学アッセイにおいて比較され、最適なバリエーションが特定される。

【0069】

一部の実施形態では、3G8抗体のヒト化バージョンが使用される。3G8は、Fcγ

R I I I (C D 1 6) に特異的な、十分に特徴付けられたマウス I g G k 1 m A b である。ヒト化 3 G 8 抗体は、標準的方法を使用して生成されることになる。F c γ R I I A マウス抗体である I V . 3 (Chen et al. Ann Rheum Dis 78, 228-237 (2019)) について記載された、最も一般的な方法は、マウス 3 G 8 抗体の重鎖および軽鎖の相補性決定領域 (C D R) の、最も近縁なヒト生殖系の可変重鎖遺伝子および可変カップ鎖遺伝子への移植である。C D R 移植によってエピトープへの親和性の喪失が生じ得るため (Safdari et al., Biotechnol Genet Eng Rev 29, 175-186 (2013))、結合が改善されたバリエーションは、C D R 移植されたドメインにおいてアミノ酸置換によって生成されることになる。これらの置換は、抗体供給源のうちの 1 つとして 3 G 8 を使用した、ヒト化二重特異的 E G F R x C D 1 6 抗体に対して特定されたもの (Asano et al., FEBS J 279, 223-233 (2012)) に従ってもよい。

10

【0070】

抗原を抗体にコンジュゲートするための方法も当技術分野で公知である。例えば、本明細書に記載の抗体ポリペプチドは、融合タンパク質を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなってもよい。これらの融合タンパク質は、例えば、免疫グロブリン F c γ R I I I 結合抗体および少なくとも 1 つの異種腫瘍抗原の配列を含むキメラ分子である。アミノ酸配列は、通常、別々のタンパク質中に存在してもよく、これらは融合ポリペプチドにおいて一緒になるか、またはこれらは、通常、同一のタンパク質中存在してもよいが、融合ポリペプチドにおいて新たな配置となるような位置にある。融合タンパク質は、例えば、化学合成によって、またはペプチド領域が所望の関係でコードされるポリヌクレオチドを作成および翻訳することによって、作成されてもよい。

20

【0071】

用語「異種」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに適用される場合、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、それが比較される実体の残りの部分のものとは別個の実態に由来することを意味する。例えば、本明細書で使用される場合、抗体、またはその抗原結合性断片、バリエーション、もしくは類似体に融合される「異種ポリペプチド」は、同一種の非免疫グロブリンポリペプチド、または異なる種の免疫グロブリンもしくは非免疫グロブリンポリペプチドに由来する。

【0072】

本明細書の他の箇所でもより詳細に議論されるように、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合性断片、バリエーション、もしくは誘導体は、さらに、N もしくは C 末端で異種ポリペプチドに組換え融合されるか、またはポリペプチドもしくは他の組成物に化学的にコンジュゲート (共有結合および非共有結合によるコンジュゲーションを含む) されてもよい。

30

【0073】

また、所与の抗体は、多くの種類の改変を含有してもよい。抗体は、例えば、ユビキチン化の結果として、分岐されてもよく、これらは、分岐を含むかまたは含まない環状であってもよい。環状抗体、分岐抗体、および分岐環状抗体は、翻訳後の自然なプロセスから得られてもよく、または合成方法によって作製されてもよい。改変としては、アセチル化、アシル化、A D P - リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合的架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、G P I アンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、転移 R N A により媒介されるタンパク質へのアミノ酸付加、例えば、アルギニル化、およびユビキチン化が挙げられる；例えば、Proteins - Structure and Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983);

40

50

Seifter et al., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646 ; Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48-62) を参照されたい。

【0074】

当業者は、コンジュゲートが、コンジュゲートされる選択された薬剤に応じて、種々の技法を使用してアセンブルされ得ることを認識するであろう。例えば、ビオチンを含むコンジュゲートは、例えば、FcγRIII-抗体ポリペプチドを、ビオチンN-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのビオチンの活性化エステルと反応させることによって調製することができる。様々な部分を抗体、またはその抗原結合性断片、バリエーション、もしくは誘導体にコンジュゲートするための技法は周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985) ; Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987) ; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985) ; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985)、およびThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158を参照されたい。例えば、一般的なカップリング方法を使用して、抗体を、遊離アミノ基、カルボン酸基、またはスルフヒドリル基を介して抗原に連結することができる。いくつかの一般的に使用される架橋試薬としては、グルタルアルデヒド（分子をペプチドのN末端に連結する）、カルボジイミド（EDC）（ペプチドのC末端に結合する）；スクシンイミドエステル（例えば、MBS、SMCC）（遊離アミノ基およびシステイン残基に結合する）；ベンジジン（BDB）（チロシン残基に連結する）、ペリオデート（炭水化物基に結合する）；イソチオシアネート；カルボジイミド／活性化エステル（EDC／NHS）カップリングが挙げられ；反応性アジド基は、翻訳後の改変として、酵素ライゲーションを使用して、タンパク質表面に特異的に導入される部位であってもよく、これは、次に、高効率のクイック化学反応を使用してアルキン含有ポリマーにコンジュゲートされ得る。例えば、Paeth et al., Methods Enzymol. 2017;590:193-224を参照されたい。

【0075】

本明細書に記載の抗体は、ポリペプチドのin vivo半減期を増加させるため、または当技術分野で公知の方法を使用するイムノアッセイにおいて使用するために、異種ポリペプチドに融合させてもよい。例えば、一部の実施形態では、PEGは、in vivo半減期を増加させるために、本明細書に記載の抗体にコンジュゲートされてもよい；例えば、Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106-119 ; Adv. In Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531 ; またはWeir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512を参照されたい。

【0076】

感染性疾患の処置およびリスクの低減

本明細書に記載の方法および組成物の一部の実施形態では、腫瘍抗原の代わりに、病原体に関連する抗原が使用される。病原体は、例えば、ウイルス、細菌、真菌、または寄生生物病原体であってもよく；抗原は、ウイルスおよびそれらの部分ならびに細菌などの任意の原核生物および真核生物を含む。例えば、病原体は、フェシウム菌（*E. faecium*）、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）、肺炎桿菌（*K. pneumoniae*）、アシネトバクターバウマンニ（*A. baumannii*）、緑膿菌（*P. aeruginosa*）、およびエンテロバクター（*Enterobacter*）種、ヒトパピローマウイルス、チフス菌（*Salmonella typhi*）（腸チフス）、コレラ菌（*Vibrio cholera*）、ペスト菌（*Yersinia pestis*）、肺結核、マラリア／熱帯熱

マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、デング熱、インフルエンザウイルス、リッサウイルス、髄膜炎ウイルス、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) B型、シャガス病、トリパノソーマ症、リーシュマニア症、バベシア症、またはライム病であるか、またはそれと関連してもよい。これらの病原体を標的とする際に使用するためのペプチドを特定するための方法は、当技術分野で公知である。例えば、Verma et al., *Vaccine*. 2018 Jun 27;36(28):4014-4022 (typhoid); Vakli et al., *Comput Biol Chem*. 2018 Feb;72:16-25 (leishmaniasis); Cockburn and Seder, *Nat Immunol*. 2018 Nov;19(11):1199-1211 (malaria); Earla et al., *J Anc Dis Prev Rem* 2014, Vol 2(1): R1-001; および Delany et al., *EMBO Mol Med*. 2014 Jun; 6(6): 708-720を参照されたい。具体例としては、H I V / A I D sに関するT a tタンパク質、g a g p 2 4 / p 4 1およびn e f (Steinman, *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 21, 3-8 (2008)); マラリアに関するマラリア原虫のサーカムスポロゾイト (Steinman, *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 21, 3-8 (2008)); 肺炎に関するペスト菌 (*Yersinia Pestis*) のL c r V (Steinman, *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 21, 3-8 (2008)); リーシュマニア症に関する森林型熱帯リーシュマニア (*Leishmania major*) のL A C K (リーシュマニア活性化Cキナーゼ) 抗原 (Steinman, *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 21, 3-8 (2008)); 肺炎球菌 (*streptococcus pneumonia*) に関する肺炎荚膜血清型抗原 (Reglinski et al., *NPJ Vaccines* 3, 53 (2018)); チフス菌に関するV i 荚膜多糖 (Li et al., *NPJ Vaccines* 3, 1 (2018)); ジカウイルスに関するZ I K Vの非構造1 (N S 1) タンパク質 (Brault et al., *Sci Rep* 7, 14769 (2017)); 感染性の盲目 (眼のトラコーマ) の原因であるクラミジアトラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) 血清型Eに関する主要外膜タンパク質 (M O M P) (Pal et al., *Infect Immun* 73, 8153-8160 (2005)) が挙げられる。

【0077】

本方法および組成物を使用して、感染症を有する対象を処置するか、または後天性の感染症のリスクを低減するかもしくは後天性の感染症の重症度を低減することができる。

【0078】

医薬組成物および投与方法

本明細書に記載の方法は、有効成分として抗F c γ R I I I抗体を含む医薬組成物の使用を含むことができる。

【0079】

医薬組成物は、典型的には、薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という言語は、薬学的投与に適合可能な食塩水、溶媒、分散媒、コーティング、抗微生物および抗真菌剤、等張剤などを含む。補充活性化化合物は、組成物中に導入されてもよく、例えば、G M C S Fは、F c γ R I I I抗体-抗原コンジュゲート免疫化に含まれてもよい。組成物は、T細胞応答を増加させるために、アジュバントを含んでもよい。例えば、T細胞応答を増強するナノ粒子 (例えば、Stano et al., *Vaccine* (2012) 30:7541-6およびSwaminathan et al., *Vaccine* (2016) 34:110-9に記載されるように) が含まれてもよい。Panagioti et al., *Front. Immunol.*, 16 February 2018; doi.org/10.3389/fimmu.2018.00276も参照されたい。あるいはまたはさらに、ポリ-ICLC (カルボキシメチルセルロース、ポリイノシン-ポリシチジン酸、およびポリ-リシン二本鎖RNA)、イミキモド、CpGオリゴデオキシヌクレオチドおよび製剤 (IC31、QB10)、AS04 (3-O-デスアシル-4'-モノホスホリルリピドA (MPL) と製剤化されたアルミニウム塩、AS01 (MPLおよびサポニンQS-21)、ならびに/またはMPLAを含むアジュバントを使用してよい。例えば、Coffman et al., *Immunity*. 2010 Oct 29; 33(4): 492-503; Martins et al., *EBioMedicine* 3:67-78, 2016; Del Giudice, *Seminars in Immunology*, 2018, doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001; およびAuricchio et al., *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2018; 37:86を参照されたい。

【0080】

医薬組成物は、典型的には、その意図される投与経路に適合するように製剤化される。

投与経路の例としては、非経口、例えば静脈内投与が挙げられる。

【0081】

好適な医薬組成物を製剤化する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005; および the books in the series Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY) を参照されたい。例えば、非経口の適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の構成成分を含んでもよい：注射用の水、生理食塩水溶液、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または他の合成溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗細菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素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、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝剤および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性の調整のための薬剤。pH は、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整されてもよい。非経口調製物は、アンプル、ディスポーザブルシリンジまたはガラスもしくはプラスチック製の多人数用バイアル内に封入されてもよい。

【0082】

注射可能な使用に好適な医薬組成物には、滅菌した水溶液（水溶性の場合）または分散液および滅菌した注射可能な溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末が含まれる。静脈内投与では、好適な担体として、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。すべての場合において、組成物は、無菌でなければならず、易注射性（easy syringability）が存在する程度に流体であるべきである。それは、製造および保存の条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌のような微生物の夾雑作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であってもよい。適当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌および抗真菌剤、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、チメロサルなどによって達成され得る。多くの場合には、組成物中に、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、組成物中に、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およびゼラチンを含むことによってもたらされ得る。

【0083】

滅菌注射用溶液は、適切な溶媒中に必要な量の活性化化合物を、必要に応じて、上記に列挙された成分のうちの1つまたは組合せと共に導入し、その後、濾過滅菌することによって調製することができる。一般的には、分散液は、基礎的な分散媒と上記に列挙されたものから必要とされる他の成分とを含有する滅菌ビヒクル中に、活性化化合物を導入することによって調製される。滅菌注射用溶液の調製用の滅菌粉末の場合には、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、有効成分とその事前に滅菌ろ過された溶液に由来するいずれかの追加の所望の成分との粉末が得られる。

【0084】

一部の実施形態では、治療用化合物は、身体からの急速な排出に対して治療用化合物を保護することになる担体、例えば、埋め込みおよびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤と共に調製される。エチレンビニルアセテート、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ酪酸などの生分解性の、生体適合性ポリマーが使用されてもよい。このような製剤は、標準的な技法を使用して調製されるか、または例えば、Alza Corporation および Nova Pharmaceuticals, Inc から商業的に得られてもよい。リボソーム懸濁液（選択された細胞を標的とするリボソームを細胞抗原に対するモノクローナル抗体と共に含む）を薬学的に

許容される担体として使用することもできる。これらは、当技術分野で公知の方法に従って、例えば、米国特許第4,522,811号明細書に記載されるように、調製することができる。

【0085】

医薬組成物は、投与のための使用説明書と一緒に、容器、パック、またはディスペンサー内に含まれてもよい。

【実施例】

【0086】

本発明は、以下の実施例においてさらに記載されるが、これらは、特許請求の範囲に記載の本発明の範囲を限定するものではない。

【0087】

材料および方法

以下の材料および方法を以下の実施例において使用した。

【0088】

マウス

すべてのマウスは、C57BL/6バックグラウンドであり、以下を含む：野生型マウス、FcRγ^{-/-} (Takai et al., Cell 76, 519-529 (1994))、ヒトFcγRsを発現するγ^{-/-}マウス (FcγRIIA/γ^{-/-}、FcγRIIIB/γ^{-/-}およびFcγRIIA+FcγRIIIB/γ^{-/-}) (Tsuboi et al., Immunity 28, 833-846 (2008))、β2m^{-/-} (Koller et al., Science 248, 1227-1230 (1990)) (The Jackson Laboratory 番号002087)、MyD88/TRIF^{-/-} (Yamamoto et al., Science 301, 640-643 (2003))、Ly6Gプロモーターの下でtdTomatoを発現する「キャッチアップ」マウス (Hasenberg et al., Nat Methods 12, 445-452 (2015))、H2Kb (The Jackson Laboratory 番号003831) の状況下でのOT-I (オボアルブミン残基257~264 (SIINFELK; 配列番号1) を認識するトランスジェニックT細胞受容体を発現する)、OT-I/ベータアクチン-GFP (OT-Iマウスをベータアクチン-GFPマウスと交雑することによって得られる) およびベータアクチンRFP (The Jackson Laboratory、番号005884)。動物は、特別な病原体フリーの施設で維持した。すべてのin vivo実験は、年齢および性別の一致した動物で行った。ブリガム・アンド・ウィメンズ病院の動物実験委員会 (Brigham and Women's Hospital Animal Care and Use Committee) が、この研究のすべての手順を承認した。

【0089】

ヒトボランティアおよびSLE患者および血清

SLE患者に関する研究のために、末梢血試料は、健康な対照と1997ACR分類基準を満たしたSLEを有する患者から得た。この研究は、Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran (IRE-2297) のIRBによって承認され、すべての参加者はインフォームドコンセントにサインした。自己免疫疾患の家族歴を有さない健康なボランティアを対照として動員した。本研究参加者の臨床的および人口統計的特徴を表1にまとめる。ヒトSLEの血清試料をBeth Israel Deaconess Medical Center and Instituto Nacional de Ciencias Medicas y de la Nutricion Salvador ZubiranのLupus Clinicから入手した。正常なヒト好中球に関する研究、および正常な血清の採取のために、血液試料をブリガム・アンド・ウィメンズ病院の治験審査委員会 (Brigham and Women's Hospital Institutional Review Board) (P001694/PHS) によって承認されたヒト対象の保護のためのプロトコルに従って、健康なボランティアから入手した。すべてのボランティア対照に書面のインフォームドコンセントを与えた。

【0090】

【表 2】

表 1. 研究集団の人口統計的および臨床的特徴。

	SLE 患者(SLE) n=15	正常(N) n=6
女性 n (%)	13 (86.6%)	4 (66.6%)
年齢 n (%)	37.3 ± 4.2	25.6 ± 1.1
SLEDAI 平均±SEM	6.26 ± 1.9	
腎炎 n (%)	8 (53%)	
C3 mg/dL	90.6 ± 8.8	
C4 mg/dL	23.3 ± 3.8	
dsDNA IU/mL	84.1 ± 32.2	
ESR mm/hr	9.3 ± 4.4	
CRP mg/L	0.46 ± 0.15	

略語：SLE、全身性エリテマトーデス；HC、健康な対照；SEM、平均値の標準誤差；SLEDAI、全身性エリテマトーデスの疾患活性指数；dsDNA、二本鎖DNA抗体；ESR、赤血球沈降速度；CRP、C反応性タンパク質。

【0091】

試薬

マウスGM-CSF（番号315-03）、ヒトGM-CSF（番号300-03）、マウスG-CSF（番号AF-250-05）は、Peprotechからのものである。BSA（番号A-7970）、OVA（番号A5503）抗BSAウサギ抗体（番号B7276）および抗OVAウサギ抗体（番号C6534）は、Sigma Aldrichからのものである。FITC-OVA（番号O23020）は、ThermoFisherからのものである。NIP-OVA（OVA当たり11個のNIP）および抗NIPヒトIgG1（マウスのラムダ軽鎖とヒトの重鎖とのキメラ抗体）は、Richard Blumberg（Brigham and Women's Hosp、Boston）から寄贈された。2 FITC-OVA：1 IgGの比でFITC-OVA（番号O23020、ThermoFisher）にコンジュゲートした抗FcγRIIIB（3G8）（BioLegend）は、以下に記載したようにBioLegendによって生成された。

【0092】

Accutase cell detachment solution（番号07920）は、STEMCELL Technologiesからのものである。使用したFACS抗体は、カタログ番号、クローンおよび希釈液を含めて、表2.1および2.2に示す。枯渇実験では、抗マウスCD4（GK1.5、番号BE0003）、抗マウスCD8（2.43、番号BE0061）およびラットIgG2bアイソタイプ対照（LTF-2、番号BE0090）は、BioCellから入手した。

【0093】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 2.1 マウス骨髄由来の好中球および NDDC のフローサイトメトリー解析

抗体	フルオロフォア	会社	クローン	カタログ 番号	希釈
CD3	BV605	BioLegend	17A2	100237	1:100
CD11c	BV605	BioLegend	N418	117334	1:100
F4/80	BV605	BioLegend	BM8	123133	1:100
CD80	BV605	BioLegend	16-10A1	104729	1:100
NK-1.1	BV605	BioLegend	PK136	108739	1:100
Ly-6G	BV605	BioLegend	1A8	127639	1:100
CCR7	Pe/Cy7	BioLegend	4B12	120123	1:100
Ly-6G	PB	BioLegend	1A8	127611	1:100
Ly-6C	PB	BD	Al-21	562727	1:100
CD11b	PB	BioLegend	M1/70	101224	1:100
CD103	PB	BioLegend	2E7	121421	1:100
Ly-6C	PB	BioLegend	HK1.4	128013	1:100
CD86	PB	BioLegend	GL-1	105022	1:100
Ly-6G	Pe/Cy7	BioLegend	1A8	127618	1:100
CD115	Pe/Cy7	BioLegend	AFS98	135524	1:100
CD40	Pe/Cy7	BioLegend	3/23	124622	1:100
CD103	Pe/Cy7	BioLegend	2E7	121425	1:100
CD11b	Pe/Cy7	BioLegend	M1/70	101216	1:100
CD8a	Pe/Cy7	BioLegend	53-6.7	100722	1:100
CD8a	PerCP	BioLegend	53-6.7	100732	1:100
CCR7	PerCP	BioLegend	G043H7	353242	1:100
MHC クラス II	PerCP	BioLegend	AF6-120.1	116415	1:100
Ly-6G	PerCP	BioLegend	1A8	127616	1:100
Ly-6G	APC	BioLegend	1A8	127614	1:100
CD11c	APC	BioLegend	N418	117310	1:100
Ly-6C	AF647	BioLegend	HK1.4	128009	1:100
CD8a	APC	BioLegend	53-6.7	100711	1:100
CD115	APC	BioLegend	AFS98	135509	1:100
CD11b	Pe	BioLegend	ICRF44	301306	1:100
CD86	Pe	BioLegend	34F	200308	1:100
CCR7	Pe	BioLegend	4B12	120105	1:100
CD11c	Pe	BioLegend	N418	117307	1:100
CD115	Pe	eBioscience	AFS98	12-1152-82	1:100
Ly-6G	FITC	BioLegend	1A8	127606	1:100
CD80	FITC	BioLegend	16-10A1	104705	1:100
CD8a	FITC	BioLegend	5H10-1	100804	1:100
H-2 K ^b OVA 四量体 (OVA257~264 [SIINFEKL])	Pe	NIH			1:600

【 0 0 9 4 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

抗体	フルオロフォア	会社	クローン	カタログ 番号	希釈
CD3	BV605	BioLegend	17A2	100237	1:100
Foxp3	PB	BioLegend	MF-14	126419	1:100
CD69	PB	BioLegend	H1.2F3	104527	1:100
CD4	PB	BioLegend	GK1.5	100443	1:100
CD4	PB	BioLegend	RM4-4	116008	1:100
CD69	Pe/Cy7	BD	H1.2F3	552879	1:100
CD25	Pe/Cy7	BioLegend	PC6.1	102016	1:100
CD44	Pe/Cy7	BioLegend	IM7	103030	1:100
CD62l	APC	BioLegend	MEL-14	104411	1:100
Ki67	PerCP	BioLegend	B56	561284	1:100
T-bet	AF647	BioLegend	4B10	644803	1:100
PD-1	APC	BioLegend	RMP1-30	109112	1:100
CTLA-4	APC	BioLegend	UC10-4B9	106310	1:100
CD3	APC	BioLegend	145-2C11	100311	1:100
PD-1	Pe	BioLegend	RMP1-14	114117	1:100
MHC クラス II	Pe	eBioscience	NIMR-4	12-5322-81	1:100
CD25	PE-CF594	BD	PC61	562695	1:100

10

20

【 0 0 9 5 】

30

40

50

【表 4】

表 2.2 ヒト血中および培養血中の好中球および NDDC のフローサイトメトリー解析

抗体	フルオロフォア	会社	クローン	カタログ番号	希釈
CD80	APC-H7	BD	L307.4	561134	1:100
XCR1	Pe	BioLegend	S15046E	762603	1:100
CD86	BV421	BioLegend	IT2.2	305426	1:100
CD141	Pe/Cy7	BioLegend	M80	344109	1:100
CD11c	BV421	BD	3.9	565807	1:100
CD14	APC	BioLegend	M5E2	301808	1:100
CD15	BV605	BioLegend	W6D3	323031	1:100
CD10	Pe	Ancell Corporation	SN5c/L4-1A1	157-050	1:100
SiglecH	Pe	eBioscience	eBio440c	12-0333-80	1:100
CD11c	APC/Cy7	BioLegend	Bu15	337218	1:100
CD11b	Pe	BioLegend	ICRF44	301306	1:100
HLA-DR	Bv605	BioLegend	L243	307639	1:100
Clec9a	AF488	R&D Systems	683409	FAB6049G	1:100
CD10	BV421	BD	H10a	562902	1:200
CD11c	AF647	BioLegend	3.9	301619	1:100
CD197	BV421	BD	150503	562555	1:100
CD80	Pe/Cy7	BioLegend	2D10	305218	1:100
CD86	PerCP	BioLegend	IT2.2	305419	1:100
CD11b	Pe/Cy7	BioLegend	M1/70	101216	1:100
CD15	PerCP	BioLegend	W6DE	323020	1:100
Clec9A	Pe	BioLegend	8F9	353803	1:100
CD16	Pe	BD	3G8	555407	1:100
CD32	Pe	BD	FLI8.26	550586	1:100
CD16	APC Vio770	MACS-Miltenyi Biotech	REA589	130-109-147	1:100

【 0 0 9 6 】

【表 5】

正常および SLE 患者の血液試料について:

抗体	フルオロフォア	会社	クローン	カタログ番号	希釈
CD11c	PE	BioLegend	301606	3.9	1:20
CD10	APC/Cy7	BioLegend	312212	HI10A	1:20
CD15	FITC	BioLegend	301903	HI98	1:100
HLA-DR	PE/Cy7	BioLegend	307616	L243	1:100
CD3	PerCP/Cy5.5	BioLegend	300328	HIT3a	1:100
CD19	PerCP/Cy5.5	BioLegend	302230	HIB19	1:100
CD56	PerCP/Cy5.5	BioLegend	318322	HCD56	1:100
CD14	Pacific Blue	BioLegend	301828	M5E2	1:100
CD197 (CCR7)	Pacific Blue	BioLegend	353210	G043H7	1:100
CD80	APC	BioLegend	305220	2D10	1:100
CD141	BV605	BD OptiBuild	740421	1A4	1:100
CD370 (Clec9)	APC	BioLegend	353806	8F9	1:100

【0097】

【表6】

アイソタイプ対照およびFc遮断試薬

ヒト TruStain FcX	Biolegend	422302
マウス BD Fc Block	BD	553141
マウス IgG1k	BD	557273
マウス IgG1k-FITC	Invitrogen	11-4714-81

10

【0098】

Biolegendによって使用されるコンジュゲーション方法

3G8へのFITC-OVAコンジュゲーションはクリック化学反応によって達成される。FITC-OVAの凍結乾燥粉末(Thermo Fisher、カタログ番号023020)をリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、アジドを含有する試薬、Azido-PEG4-NHS Ester(Click Chemistry Tools)を用いて活性化した。アジドで活性化したFITC-OVAは、G-25セファデックス樹脂によって精製される。3G8抗体は、DTTによって活性化され、その後、DBCO-PEG4-Maleimide(Click Chemistry Tools)によって活性化される。DBCOにより改変された3G8抗体をアジドで活性化したFITC-OVAと、1:3(抗体:色素)のモル比でインキュベートする。コンジュゲーションをアジ化ナトリウムでクエンチし、スーパーデックス200カラムに負荷し、遊離FITC-OVAから遊離抗体を分離する。1:1および1:2(Ab:FITC-OVA)を含有する画分を、およそ1.4~1.5の最終比でプールした。

20

【0099】

モデルICの生成

不溶性免疫複合体を生成するために、2mg/mlの抗OVA、抗NIP-OVAまたは抗BSA抗体を含有する溶液を、PBS中0.2mg/mlのOVA、FITC-OVA、NIP-OVAもしくはBSAまたは0.1mg/mlのOVA、FITC-OVA、NIP-OVAもしくはBSAに1:1の比で添加し、37℃で一晩インキュベートして、それぞれ、IC溶液1およびIC溶液2と称されるICを生成した。混合物中の過剰な抗体は、沈殿の出現をもたらす(不溶性免疫複合体)。

30

【0100】

血清、IgGの単離およびRNPとの免疫複合体の生成

末梢血をBD Vacutainer(商標) Venous Blood Collection Tubes SST中に採血した。チューブを2500/gで30分間遠心分離した。血清をアリコートし、-80℃で凍結させた。IgGを精製するために、血清試料をProtein G 高性能アガロースビーズ(Genesee Scientific、番号20-538)と共にインキュベートした。抗体を0.1MのGlycine(pH2.7)で溶出し、試料を中和緩衝液(1MのTris-HCl、pH9)で即座に中和した。次いで、試料をPBSで一晩透析し、100kDaの遠心分離フィルター(Millipore、UFC910024)を使用して濃縮した。SLE-IgG/RNP免疫複合体を生成するために、2mg/mlの精製したSLE IgGまたは正常なヒトIgGを含有する溶液を等体積のPBS(Ca、Mgを含まない)中0.3mg/mlのSm/RNP複合体(番号SRC-3000、Immunovision)と混合し、37℃で4時間インキュベートした。20ul/mlの免疫複合体溶液を好中球に添加し、ヒトまたはマウスの樹状細胞を生成した。RNPは、3ug/mlで使用した。SLE-IgGまたは正常ヒトIgGは単独で、20ug/mlで使用した。

40

50

【0101】

骨髓由来マウス好中球の単離、処置および培養

好中球の単離：マウスを安楽死させ、20ccのシリンジに取り付けた25ゲージのニードルを使用して、大腿骨および脛骨を氷冷したRPMI 1640で洗い流し、細胞懸濁液を1mlのピペットチップを数回通過させることによって細胞塊を分散させた。採取した細胞を、70μmのストレーナーに通して50mlのファルコンチューブ中に濾過し、ペレット化させ、2%のFBSおよび1mMのEDTAを含有するPBS中に 1×10^8 個の細胞/mlで再懸濁させた。EasySep Mouse Neutrophil Enrichment Kit 19762 (STEMCELL Technologies) を使用して、陰性選択によって好中球を単離した。単離した細胞のアリコートを得て、トリパンブルー色素排除によって好中球数および生存率を決定した。生存率は、蛍光生存率色素Fixable Viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher) を使用して、FACSによっても決定した。純度は、フローサイトメトリーによって評価した（図6を参照されたい）。

10

【0102】

in vitroでNDDCを生成するための条件：単離したマウス好中球をRPMI 培地（10%のウシ胎仔血清およびペニシリン/ストレプトマイシン（50U/mlのペニシリンおよび50μg/mlのストレプトマイシン）を補充した、L-グルタミンおよび25mMのHEPESを含むRPMI）中に再懸濁させた。1ウェル当たり 2×10^6 個の細胞を、2mlのRPMI培地中6ウェルプレートにプレーティングし、5%のCO₂中37℃でインキュベートした。さらに、以下のうちの1つまたは複数と共に、好中球を培養した：GM-CSF（10ng/ml）、SLE患者のIgGまたは正常なヒトIgG（20μg/ml）（10ng/mlのGM-CSFを含むか、またはSLE患者の血清もしくは正常なヒト血清（50ul/ml）を単独で（GM-CSFを含まない）含む）。ICで処置するために、「モデル免疫複合体の生成」に記載したように調製したICを含有する溶液を使用前に十分に混合し、細胞を、10μl/mlのIC溶液1と10μl/mlのIC溶液2（OVA、FITC-OVA、NIP-OVAまたはBSAを含有するIC）と共にインキュベートした。抗原単独で処置するために、可溶性OVA、FITC-OVA、NIP-OVAまたはBSAを、それらの各IC中に含有されたものと等量である量の、1.5μg/mlで使用した。抗体単独で処置するために、細胞を、20μg/mlの抗OVA、抗BSAまたは抗NIP-OVAと共にインキュベートした。好中球を、ファルコンチューブ内の培地中で、5%のCO₂、37℃で、穏やかに揺動しながらインキュベートした。300gで細胞をペレット化させ、PBSで洗浄し、10ng/mlのGM-CSFを補充したRPMI培地中で培養した。3日間の培養後に、非付着細胞と付着細胞を、Accutase (STEMCELL Technologies) を使用して回収し、PBSで洗浄し、記載したように、フローサイトメトリー解析のためにFACS緩衝液中に再懸濁させた。in vivo注射では、Accutaseで回収した付着細胞のみを使用した。

20

30

【0103】

ヒト好中球処置およびin vitroでの培養条件

40

末梢血を、健康なヒトボランティアから、クエン酸三ナトリウム、クエン酸およびデキストロース (Vacutainer ACD溶液A、BD) を含有するチューブ中に採血した。細胞の培養に使用した自家血清を、BD Vacutainer (商標) Venous Blood Collection Tubes SST中に採血し、2500×gで30分間遠心分離し、上清を回収することによって得た。in vitroでNDDCを生成するために、血液にGM-CSF（10ng/ml）を37℃で30分間補充し、その後、FITC-IgGアイソタイプ対照またはFcγRIIIB（3G8）-FITC-OVAコンジュゲートを添加し2時間おいた。次いで、血液を、製造業者のプロトコールに従ってHetaSep (STEMCELL Technologies) と共にインキュベートし、赤血球を枯渇させ、白血球を濃縮した。白血球の豊富な血漿層をPBS

50

で洗浄し、残留した赤血球を塩化アンモニウム溶液を使用して氷上で10分間溶解させ、PBSで洗浄し、2.5%の自家血清およびペニシリン／ストレプトマイシン（50 U／mlのペニシリンおよび50 µg／mlのストレプトマイシン）を補充した、L-グルタミンおよび25 mMのHEPESを含むRPMI中に再懸濁させた。2 × 10⁶個の細胞を、10 ng／mlのGM-CSFまたは健康なドナーもしくはSLE患者由来の50 µl／mlの血清を補充した2 mlの培地中6ウェルプレートにプレATINGした。48時間後、Accutaseを使用して細胞を回収し、記載したように、フローサイトメトリーによって樹状細胞の分化を評価した。

【0104】

フローサイトメトリー

FACSCanto IIまたはLSRFortessa-12-color分析器のいずれかにおいて、フローサイトメトリーを実施した。FCS（フローサイトメトリー標準フォーマット）3.0データファイルを使用して、FlowJo（Mac version 10.5）を使用して分析したデータをエクスポートした。各蛍光色素について、補正制御を作成した。BDマルチカラー補正ビーズをFITC、Pe、Pe／Cy7、PerCP Cy5.5、APC、APC／Cy7、BV421およびBV605に対する補正制御として染色した。すべての実験では、細胞をFixable Viability Dye eFluor 780（ThermoFisher）で染色し、死細胞をゲートアウトした。フォワードゲートおよび側面散乱ゲート（side scatter gate）を使用して、二重項とデブリ（FSC-A、FSC-H、SSC-A × SSC-H）を識別した。適合したアイソタイプを対照として使用し、陰性ゲーティングはFMO（蛍光マイナスワン）戦略に基づいた。生存細胞のみが本研究に含まれた。

【0105】

表面染色では、FACS緩衝液（2%のFCSと2 mMのEDTAを補充したPBS）中の単一の細胞懸濁液を、マウスのBD Fc遮断またはヒトのTruStain FcXと共に4℃で20分間インキュベートした。試料を、示した蛍光色素コンジュゲート抗体と共に4℃で30分間インキュベートし、PBSで洗浄し、1%のパラホルムアルデヒドで固定した。

【0106】

マウス骨髄由来好中球およびNDDCのフローサイトメトリー解析

骨髄由来好中球およびNDDCの表現型および機能分析のために、以下の細胞表面マーカーに対する抗体を使用した：CD11c、MHC-II、Ly6G、CD80、CD86およびCCR7（詳細は表2.1を参照されたい）。系統陰性の生存集団内で（CD3、NK1.1およびCD19）、CD11c⁺およびMHC-II⁺事象をゲーティングし、Ly6G発現を解析した。CD11c⁺MHC-II⁺およびLy6G⁺集団を、共刺激分子CD80、CD86および遊走性マーカーCCR7の発現についてさらに解析した。CD11cゲートは、FM対照に基づき、CD80、CD86およびCCR7は、アイソタイプおよびFM対照に基づいた。表示された数は、%として表現したCD11c⁺、MHC-II⁺およびLy6G⁺事象である。サブセットDCマーカーであるXCR1、CD103およびCD8aを、CD11c⁺、MHC-II⁺およびLy6G⁺集団に関してさらに解析した。取り込みの解析のために、FITCおよびLy6Gゲートをアイソタイプ対照に基づいて設定した。抗Ly6GをAPC蛍光色素と連結させた。OT-IおよびOT-II実験では、抗CD3、抗CD4および抗CD8抗体を使用した。CD3⁺、CD4⁺またはCD8⁺の一重項をさらなる解析のためにゲーティングした。ヒストグラムは1つの代表的ドナーに由来し、CFSE⁺事象の集団を示し（黒塗りのヒストグラム）、アイソタイプ対照に基づいて設定した。透明のヒストグラムは、CFSE⁺事象の0日目の染色を示す。

【0107】

細胞内染色のために、固定した細胞を表面マーカーについて染色し、BD perm／wash緩衝液（BD Biosciences）で透過処理した。次いで、細胞を以下

の抗体：抗Foxp3、抗Tbetおよび抗Ki-67で染色した。細胞を透過処理緩衝液で再度洗浄し、フローサイトメトリーによって解析した。

【0108】

ヒト血中好中球および樹状細胞のフローサイトメトリー解析

SLE患者および対応する正常な対照の全血における循環白血球における細胞マーカーを評価するために、100μLの血液を以下の表面マーカーに対する抗体：CD10、CD15、CD11c、MHC-II、CD80、CCR7と共にインキュベートした（表2.2を参照されたい）。系統陰性の生存集団内で（CD3、CD19およびCD56）、CD11c⁺およびMHC-II⁺事象をゲーティングし、CD10およびCD15の発現を解析した。CD11c⁺MHC-II⁺、CD10⁺およびCD15⁺集団を、CD80およびCCR7マーカーについてさらに解析した。DCサブセットマーカーClec9a、XCR1およびCD141も評価した。溶解緩衝液（BD Pharm Lyse）を使用して赤血球を溶解させ、LSR Fortessa血球計数器（BD bioscience）中で、フローサイトメトリーによって試料を解析した。

【0109】

in vitroでのFITC-OVA、FITC-OVA/抗OVAおよび抗FcγRIIIFITC-OVA取り込みの解析。

マウスの好中球取り込み実験では、示した遺伝子型に由来する細胞を、上記で詳述したように生成したFITC-OVAまたはFITC-OVA-抗OVAモデル免疫複合体と共に培養した。示した時間に、細胞を採取し、抗Ly6Gで染色し、FACS解析に供した。

【0110】

ヒトの好中球取り込み測定では、血液を、FITC-IgGアイソタイプ対照または抗FcγRIIIB（3G8）-FITC-OVA抗体コンジュゲート（8.5から12.5μg/mL）と共に、揺動テーブル上で穏やかに攪拌しながら、37°Cで示した時間インキュベートした。次いで、試料を、氷上で10分間、塩化アンモニウム溶液（STEM CELL Technologies 番号07800）で処理し、PBSで洗浄し、示した抗体：抗CD10、抗CD15、抗CD16（REA-589）、抗CD16（3G8）および抗CD32（IV3）を用いるFACS解析に供した。

【0111】

NDDCまたはFcγRIIIB-FITC-OVAによる免疫化

WTまたはMyD88/TRIF-マウスから単離した好中球を、PBS（ビヒクル）、OVAまたはOVA-抗OVA ICと共に2時間インキュベートし、10ng/mLのGM-CSFを含むRPMI培地（10%のウシ胎仔血清およびペニシリン/ストレプトマイシン（50U/mLのペニシリンおよび50μg/mLのストレプトマイシン）を補充した、L-グルタミンおよび25mMのHEPESを含むRPMI 1640）中で培養した。3日後、非付着細胞をやさしく取り除き、残っている付着細胞をAccutaseで剥離させた。B16F10-OVA細胞の接種の7日前に、1×10⁶個の細胞を、イソフルランで麻酔したマウスに静脈内注射した。免疫化研究のために、3G8（抗FcγRIIIB）-FITC-OVA（30μg）またはFITC-OVA（12μg）を含有する100μLのPBS溶液を、5μgのGM-CSFの腹腔内注射の6時間後に、マウスにi.v.注射した。さらに4回のGM-CSFの注射を毎日与えた。3G8-OVAコンジュゲートまたはFITC-OVAの注射の10日後に、2×10⁵個のB16F10-OVA細胞を、マウスに皮下注射で負荷した。

【0112】

Ag取り込みおよび好中球-DCマーカーの検出のための血液および脾臓の解析。

γ-/-、3B γ-/-および2A3B γ-/-マウスの後眼窩に、30μgの3G8（抗FcγRIIIB）-FITC-OVAを注射した。血液試料を示した時間に採取し、ACK溶解緩衝液を使用して赤血球溶解に供し、PBSで洗浄し、以下のマーカーに対する抗体を用いるFACSによって解析した：Ly6G、CD11c、CD11b、MHC-II、CD80およびCCR7（図4A）；Ly6C、CD115、CD16（R

10

20

30

40

50

E A - 5 8 9) および C D 3 2 (図 S 3)。3 日後に脾臓を回収し、器官回収のセクションに記載したように処理した。

【0113】

in vitro および *in vivo* での O T I および O T I I 増殖アッセイ：

in vitro：オボアルブミン特異的トランスジェニック O T - I および O T - I I マウス由来の T 細胞を、陽性選択によって脾臓およびリンパ節から単離した。C D 8 + T 細胞の濃縮のために、抗マウス C D 8 a (L y - 2) にコンジュゲートしたマイクロビーズ (M i l t e n y i) を、または C D 4 + T 細胞濃縮のために、抗マウス C D 4 (L 3 T 4) にコンジュゲートしたマイクロビーズ (M i l t e n y i) を用いて、細胞を濃縮した。最終調製物は、8 5 ~ 9 0 % の C D 8 + または C D 4 + T 細胞を含有した。示した遺伝子型由来の 0.5×10^6 個の骨髓好中球に、以前に記載したように、O V A、O V A - I C またはビヒクル対照を負荷し、G M - C S F を補充した R P M I 培地 (1 0 % の F C S) 中 9 6 ウェルマイクロプレートに播種し、3 日間培養して N D D C を生成した。陽性対照として、T 細胞を添加する 2 4 時間前に、N D D C を $1 \mu / m l$ の O V A _{2 5 7} ~ 2 6 4 でパルス刺激した。

【0114】

細胞を C F S E で標識し、増殖を評価した。このために、O T - I および O T - I I 細胞を、0.1 % のウシ血清アルブミン (S i g m a) を含有する P B S (10^7 個の細胞 / m l) 中に再懸濁させ、5 μ M の C e l l T r a c e V i o l e t と共に、3 7 C で 2 0 分間インキュベートした。1 0 % の F C S で反応を停止させ、細胞を冷やした P B S で 2 回洗浄し、1 0 % の F C S、L - グルタミンおよび p e n / s t r e p を補充した R P M I 中に再懸濁させた。N D D C を、 2×10^5 個の C e l l T r a c e V i o l e t で標識した O T - I または O T - I I 細胞と共にインキュベートした。O T - I との培養の 3 日後または O T - I I との培養の 5 日後に、細胞を P B S で洗浄し、フローサイトメトリーによる解析のために染色した。

【0115】

in vivo：濃縮した O T - I および O T - I I 細胞を、*in vitro* アッセイのために上記したように、C e l l T r a c e V i o l e t 色素で標識した。細胞を P B S 中に再懸濁させ、- 1 0 日目に 3 0 μ g の F c y R I I I B - F I T C - O V A コンジュゲートの i . v . 注射を受けたレシピエントマウスに (3×10^6 個の細胞 / マウス) を i . v . 注射した。プライミング後 4 日目に、マウスを安楽死させ、脾臓由来の細胞を回収し、フローサイトメトリー解析のために染色した。

【0116】

C T L アッセイ

- 7 日目に、レシピエントマウスに 3 0 μ g の F c y R I I I B - F I T C - O V A を注射した。0 日目に、W T ナイーブマウスから脾臓を回収し、細胞の半分を、1 0 % の F C S を補充した R P M I 中で、(「パルス刺激されていない」) 1μ g / m l の O V A _{2 5 7} ~ 2 6 4 (S I I N F E K L A n a l y t i c a l B i o t e c h n o l o g y S e r v i c e s, B o s t o n) を含まない (「パルス刺激された」) 半分と、3 7 C で 1 時間インキュベートすることによって、標的脾臓細胞を生成した。細胞を洗浄し、P B S 中に再懸濁させ、パルス刺激された細胞とパルス刺激されていない細胞を、それぞれ、6 μ M の C e l l T r a c e V i o l e t (T h e r m o f i s h e r, C 3 4 5 5 7) (パルス刺激された) または 1 μ M の C e l l T r a c e V i o l e t (パルス刺激されていない) で、3 7 C で 2 0 分間標識した。細胞を洗浄し、P B S 中に再懸濁させ、 1×10^6 個のパルス刺激された細胞と 1×10^6 個のパルス刺激されていない細胞を、示したレシピエントマウスに i . v . 注射した。1 6 時間後に、レシピエントマウス由来の脾臓を回収し、フローサイトメトリーによって、パルス刺激された標的の損失について評価した。以下の等式を使用して、細胞特異的溶解⁶ の実際の値を決定した：比率 = 関連性のないパーセンテージ：エピトープ特異的パーセンテージ ([パルス刺激されていない] ピーク：[パルス刺激された] ピーク)、特異的溶解のパーセント = $[1 - (\text{移入され}$

10

20

30

40

50

ていない対照比率／実験比率)] × 100。

【0117】

B16F10-OVA腫瘍負荷、器官回収およびフローサイトメトリー解析

可溶性OVAを発現するB16F10細胞を、*in vitro*で、10%のウシ胎仔血清を補充したDMEM／高グルコース中で培養し、サブコンフルエント密度で維持した。ケタミン／キシラジンカクテル(90mg/kgのケタミン、10mg/kgのキシラジン)の腹腔内注射によりマウスに麻酔し、毛を剃り、100μLのHBSS中 2×10^5 個の腫瘍細胞を脇腹に皮下注射した。腫瘍を、触知可能ないずれか1つの群で、1~2日ごとに1回、カリパスで測定し(長径および短径)、腫瘍体積は、Dおよびdがそれぞれ、長径および短径である楕円式($1/2 \times D \times d^2$)を使用して計算した。抗体処置では、マウスに100μgの抗CD4もしくは抗CD8抗体またはアイソタイプ対照を、示した日に腹腔内注射により与えた。器官および腫瘍を外科手術により取り除き、除去の30分以内に処理した。

【0118】

簡潔には、氷上で、すべての過剰な脂肪を取り除いた。器官を、3mLのシリンジプランジャーを使用して、70μmのナイロンセルストレーナー(Fisher Brand)上で組織を剪断することによって、FACS緩衝液(2%のFCSおよび2mMのEDTAを補充したPBS)中に穏やかに分離させた。流入領域および非流入領域リンパ節ならびに腫瘍由来の細胞をPBSで洗浄し、フローサイトメトリーによる解析のために抗体で染色した。脾臓由来の細胞を、ACK溶解緩衝液(Lonza Cat 10-548E)を使用して、室温で2分間、赤血球溶解に供し、PBSで1回洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁させた。マイクロヘマトクリット毛細管チューブを使用して、イソフルランで麻酔したマウスの後眼窩叢(retroorbital plexus)から、血液をEDTAチューブに採取した(最終5mM)。ACK溶解緩衝液を使用して、試料を、室温で10分間、赤血球溶解に供し、PBSで洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁させた。フローサイトメトリー解析では、細胞を、CD4、CD8、CD44、CD62L、HLA-DR tet(H-2 Kb OVA Tetramer(OVA257-264))、CD69、CD25、PD-1、Foxp3、Ki-67およびT-betの発現について解析した。

【0119】

遅延型過敏症(DTH)応答:

OVA-ICまたはOVAを与えた好中球を、GM-CSFの存在下で培養した。3日後に、非付着細胞を廃棄し、付着細胞をAccutaseを使用して回収し、 1×10^6 個のNNDcを野生型レシピエントマウスに*i.v.*注射した。免疫化の7日後に、100μLのPBS中50μgの可溶性OVAを右後ろの足蹠に注射し、等量のPBSを左後ろの足蹠に注射して、対照としての役割を与えた。OVA注射前0日目およびOVA負荷の24時間後に、デジタルカリパスを使用して、足の膨潤を測定した。DTH応答の大きさを、OVA負荷の前後の厚みとして計算した。DTH応答の組織学的解析では、足を採取し、中性に緩衝された10%のホルマリン溶液(Sigma、HT-50-14-120mL)中で固定し、標準的な組織病理学方法を使用してH&E染色のために処理した。炎症スコアは盲検により決定した。

【0120】

抗GBMネフロトキシン腎炎

12週齢のマウスを、-3日目に、不完全フロイントアジュバント(Thermo)および生存不能な乾燥させた結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Ra(Difco、Michigan)を含む0.05mgのウサギIgG(ThermoFisher 番号31235)で、皮下に予備免疫化し、0日目に、100μLの腎毒性血清(NTS)の静脈内注射を与えた。対照動物は、-3日目にPBSの注射を、0日目にPBSの静脈内注射を受けた。スポット尿試料を示した時点で採取し、14日目に、組織学的解析およびFACS解析のためにマウスを安楽死させた。Collagenase Type II/Hyaluronidase(StemCell Technologies)を

使用して腎臓を採取し、流入領域リンパ節、非流入領域リンパ節および脾臓を、B16F10腫瘍モデルに関して、上記に記載したように回収した。Td-tomato+細胞をゲーティングし、CD11cおよびMHC-IIの発現について解析し、陽性細胞をCD80およびCD86の発現について評価した。サブセットDCマーカー解析は、CD8a、XCR1およびCD103を含んだ。

【0121】

膝窩リンパ節の生体内顕微鏡

DTHモデルについて記載したように、OVA-ICを用いて生成したおよそ 5×10^5 個のNDDCを、25 μ lのPBS中に再懸濁させ、0日目に、野生型C57BL/6マウスの右後足蹠に注射した。200 μ lのPBS中 ($10 \sim 10.5$) $\times 10^6$ 個のOT-1 β -アクトニン-GFP細胞を、NDDC注射の30分前にi.v.注射した。NDDC注射後3日目に、ケタミン (50 mg/kg) とキシラジン (10 mg/kg) の混合物を腹腔内注射して、マウスを麻酔した。麻酔したマウスの頸動脈にカニューレ処置して、Qtracker 655 Vascular色素および必要な場合はさらなる麻酔薬の静脈内送達を可能にした。右の膝窩リンパ節を顕微手術により調製し、生体内顕微鏡用のカスタムメイドの顕微鏡ステージ上に配置させた。顕微手術中、血管および求心性リンパ管を温存するよう注意を払った。曝露されたリンパ節を通常の生理食塩水中に沈め、リンパ節の隣に配置した熱電対と共にスライドガラスで覆い、37°Cに維持された局所温度をモニターした。二光子の生体内画像化を、正立顕微鏡 (Prairie Technologies) および水浸型の20 $\times$ 対物 (0.95の開口数) を用いて実施した。MaiTai Ti:サファイアレーザー (Spectra-Physics) を、二光子励起および第二次高調波発生のために、870 nmおよび900 nmまで調整した。1.5~2秒ごとに、5分間 (解析) または1 $\times$ から3 $\times$ で変化する電子ズームを用いて10分間 (ビデオ)、xy切片 (512 $\times$ 512ピクセル) の画像を得た。450/80-nm、525/50-nmおよび630/120-nmのバンドパスフィルターを通して、放射線光および第二次高調波シグナルが方向付けられ、非デスキャン検出器で検出された。複数のTIF画像としてファイルを保存して、分析のためのFiji (Schindelin et al., Nat Methods 9, 676-682 (2012)) またはビデオとしてのエクスポートのためのImaris software (Bitplane) にインポートした。

【0122】

統計

Graphpad prism 8 (LaJolla, CA)、STATA 13 (StataCorp. 2013. College Station, TX) およびJMP10ソフトウェア (SAS Institute, Inc, USA) を使用して、統計解析を実施した。この研究に含まれるすべてのデータを平均 $\pm$ SEMとして表す。群の解析では、ダネットの多重比較を用いる一元ANOVAを使用した。2つの群のみを比較する場合、ボンフェローニ補正を用いる両側スチューデントt検定を使用した。SLE患者とSLEDAIのスコアに対する差の統計的有意差を、マンホイットニー解析を使用するノンパラメトリック検定によって決定した。スピアマン検定を使用して相関性を解析した。* $P < 0.05$ および** $P < 0.005$ を有意とみなした。

【0123】

図4Dの腫瘍成長の統計解析では、7日目から14日目の経時的な体積の変化を、群およびランダム対象効果を有する混合効果回帰モデルの使用により同じ動物についての繰り返し測定を制御しながら、各動物において評価した。このモデルでは、4つの群のそれぞれにおける動物に対して、別々の切片および傾きが検討された。追加のモデルでは、時間内に二次効果を含むことから、各動物における経時的な体積の可能な非線形関係を検討した。評価では、この効果は、12.5日の平均時間を中心とした。最大尤度を使用してモデルをフィッティングし、優度比検定を使用して、傾きが群にわたって異なるか否か、および二次項を含むことによってモデルフィットが改善したかどうかを試験した。STATAバージョン13のMixedルーチンを使用して、モデルをフィッティングした。二次

項を追加するモデルは、群ごとに別々の傾きを有する、経時的な線形性を仮定するモデルよりも有意に良好ではなかった。

【0124】

[実施例1]

FcγRIIIBが標的とする抗原取り込みにより好中球が免疫原性樹状様細胞に変換される

本明細書において示すように、GM-CSFの存在下で免疫複合体(IC)と共にインキュベートした精製したマウス骨髄由来好中球(図5A)は、好中球マーカーであるLy6Gの発現を保持しながら、GM-CSF単独で培養した好中球(図1Aおよび図5B)よりも有意に高い頻度でDCに類似する表現型(CD11c⁺MHCII⁺)を呈した。ICは成熟も増強し、これは、共刺激分子(CD80、CD86)およびCCR7(それぞれ、最適なT細胞応答および二次リンパ器官へのDCの遊走に必要とされる¹⁶)の増加によって特徴付けられた(図1A)。CD8 T細胞に対して外因性抗原を交差提示することを専門とする²、いわゆるDC1サブセットの表面マーカーであるXCR1、CD103およびCD8αは、GM-CSF単独の存在下で生成したDCにおいて検出され、ICによってさらに増強された(図5C)。形質細胞様DCのマーカーであるSiglec-Aは、群のいずれにおいても観察されなかった(図5C)。マウス好中球を、全身性エリテマトーデス(SLE)(図1B、図5D)、豊富な循環ICを有する自己免疫疾患¹⁷を有する患者由来の血清中に存在するIC、および抗リボヌクレオタンパク質(RNP)血清陽性SLE患者の血清から単離されたIgGおよびRNPにより生成したICと共にインキュベートした場合に、DC様の特徴の獲得も増強された。正常な血清または抗RNP陰性の正常な個体から単離されたIgGプラスRNPに関して、分化は観察されなかった(図1B、図5E)。これらの知見と一致して、CD11c、MHC-IIおよび好中球マーカーCD10およびCD15を発現する好中球由来のDC(NDDC)は、正常なボランティアと比較してループスの患者の血液において増加した。共刺激分子CD80、CCR7およびDCサブセットマーカーであるClec9Aを発現したが、CD141を発現しなかったNDDCの頻度は、ループスの臨床スコアと相関した(図1C~D、図5F)。ループス腎炎のサロゲートである、抗糸球体基底(抗GBM)媒介性糸球体腎炎¹³(図1E)にかかった好中球レポーターマウス¹⁸では、腎組織、流入領域リンパ節および脾臓において、ナীব動物と比較して、NDDCが増加した。

【0125】

FcRγ鎖欠損マウス(γ^{-/-})由来の好中球は、SLE血清に応答して分化することができず、このプロセスにおいてFcγRを活性化する必要性を実証した(図1F)。注目すべきことに、NDDCへの分化は、好中球で選択的にヒトFcγRIIA(FcγRIIA/γ^{-/-})またはFcγRIIIB(FcγRIIIB/γ^{-/-})を発現するγ^{-/-}マウス¹³から単離した好中球で観察され(図1F)、2種のヒト活性化FcγRのいずれかが好中球のDCへの変換をサポートすることを示唆した。驚くべきことに、NDDCは、培養中少なくとも9日間生存したままであった(図1F)。ヒトFcγRIIIBを発現するγ^{-/-}マウス(FcγRIIIB/γ^{-/-})から単離した好中球の抗FcγRIIIB-OVA処置により、好中球がNDDCに変換された。γ^{-/-}マウスまたはヒトFcγRIIAを発現するγ^{-/-}マウス(FcγRIIA/γ^{-/-})由来の、同様に処置した好中球は、変換を示さなかった(図1G)。アジュバントは、DCの成熟において重要な役割を果たし²、SLE患者由来の血清は、RNPおよびDNAなどのToll様受容体(TLR)リガンドと複合体形成した自己抗体を豊富に含むが¹⁷、標準的および非標準的TLRシグナル伝達¹⁹を欠くWTおよびMyd88/TRIF^{-/-}マウス由来の好中球は、SLEのICとのインキュベーション後に匹敵するNDDC分化を示した(図5G)。

【0126】

ナীবCD8 T細胞の古典的DNの活性化は、可溶性抗原の数分の1の濃度の抗原しかIC中に必要としない^{2, 20, 21}。これは、内在化した抗原の量よりも、抗原の分

10

20

30

40

50

解性リソソームに対する明確に早期または後期のエンドソームへのトラフィックと相関する^{2, 22, 23}。IC中のOVAの好中球による取り込みは、2時間のインキュベーション後に可溶性OVAと比較して2倍増強され、これは、FcγRに依存した(図2A)。OVA-ICを与えた好中球に由来するNDDCは、交差プライミングOVA特異的CD8⁺T細胞に対する強い能力を示し、一方、可溶性OVAを与えた好中球由来のNDDCは、そうすることができなかった(図2B)。表面にMHC I発現を必要とする、β2マイクログロブリンを欠乏するマウス由来の好中球は、CD8⁺T細胞を活性化することができなかった(図6)。OVA-ICを与えた好中球に由来するNDDCもまた、ナイーブCD4⁺T細胞を強く活性化し、これらは、可溶性OVAを与えた好中球に由来するNDDCよりも有効であった(図2C)。γ^{-/-}好中球から分化したDCは、CD4およびCD8⁺T細胞のOVA-ICに依存する活性化を欠いたが、一方、OVAペプチドを直接負荷したものは、正常なCD8⁺T細胞増殖を示した。FcγRIIAまたはFcγRIIIBのいずれかを発現するγ^{-/-}好中球由来のNDDCは、両方のT細胞サブセットの活性化をサポートした(図2B~C)。T細胞の増殖は、OVA-ICを負荷されたWTおよびMyD88/TRIF^{-/-}好中球を起源とするDCにおけるものと類似したため、TLRは必要とされなかった(図2D)。

【0127】

脾臓のDCによる血液由来抗原の捕捉、および抗原を負荷されたDCの組織からリンパ節への遊走はいずれも、T細胞媒介性免疫応答の開始に重要である¹⁶。自己DCを静脈内に注射された黒色腫患者において記載されたように²⁴、OVA-ICからex vivoで生成したNDDCの静脈内注射によって、脾臓および肺における好中球の蓄積が生じた(図3A)。さらに、OVA-ICにより生成したNDDCのマウスの足蹠への局所注射によって、膝窩の流入領域LNにおける蓄積が生じ、ここで、これらは、活性な樹状突起伸長およびCD8⁺T細胞との接触の延長を示した(図3B)。よって、OVA-ICにより生成したNDDCは、これらがT細胞の機能を活性化する二次リンパ器官に蓄積する能力を示した。実際に、OVA-ICにより生成したNDDCは、抗原に対するCD4⁺Th1に駆動されるリコール応答と、その後の好中球に富む炎症応答²⁶に依拠することが報告されている遅延型過敏症(DTH)モデル²⁵において活性であった。すなわち、可溶性OVAを足蹠の皮下に受けた7日後に、OVA-ICにより生成したNDDCをi.v.で受けているマウスは、組織膨潤と免疫細胞の浸潤を生じた。注目すべきことに、これは、OVAにより生成したNDDCを与えたマウスにおいて観察された応答を超えた(図3C)。OVA-ICにより生成したNDDCは、腫瘍免疫にとって重要であるCD8⁺T細胞応答を誘引する際にも有効であった。OVAを発現するB16F10黒色腫細胞の皮下埋め込み後に²⁷、OVAにより生成したNDDCで予防的に免疫化したマウスは、OVA免疫化を受けていないマウスと比較して、わずかに低下した体積を有する大きな腫瘍を生じた(図3D)。対照的に、腫瘍成長は、OVA-ICにより生成したNDDCを与えたマウスにおいて完全に阻害された(図3D)。後者の抗腫瘍応答は、脾臓および流入領域リンパ節におけるOVA特異的CD8⁺T細胞の蓄積に関連した(図3D)。免疫化したマウスの腫瘍成長は、免疫枯渇抗体で評価したところ、CD8にのみ依存し、CD4⁺T細胞には依存しなかった(図3E)。

【0128】

古典的な、単球由来のDCにおけるエンドサイトーシス受容体を標的とする抗原にコンジュゲートした抗体は、TLRと組み合わせた場合に、マウスにおける抗原特異的T細胞応答および免疫を誘導することができる¹。本発明者らは、血中好中球においてFcγRIIIBを標的とすることにより、多数の抗原提示細胞を生成することと、抗原交差提示を促進するFcγRにより抗原を送達することとの両方のために、DC分化シグナルが好中球に特異的に送達されると考えた。FcγRIIIB抗体にコンジュゲートしたFITC-OVA、3G8(3G8-OVA)、6~8日間の予測半減期を有するマウスIgG1²⁸の単回の静脈内注射によって、血中の好中球の選択的標識化がもたらされた(図4A)。3G8-OVA注射の3.5時間以内の血液の解析によって、受容体の表面レベル

10

20

30

40

50

を評価することによって評価したところ、好中球のコンジュゲートおよびFcγRIIIBの内在化が明らかとなり、一方、FcγRIIAは表面に残ったままであった（図7A）。24時間以内に、CD11cおよびMHCI、共刺激マーカーおよびCCR7を発現したLy6G⁺細胞を血中で検出したが、3G8-OVA標識およびDC分化マーカーは、同様に処置したγ^{-/-}マウスにおいて観察されなかった（図4A）。3G8-OVAコンジュゲートはまた、脾臓においてNDDCを生じなかった（i.v.注射の72時間後に評価した）（図4A）。ヒト化トランスジェニックマウスでは、MRP8プロモーターの下流で発現したFcγRIIIBおよびFcγRIIAは、Ly6C⁺でもあるCD115⁺単球¹³の割合で検出された（図7B）。しかし、脾臓における3G8-OVA陽性CD11c⁺MHCI+細胞の98%より多くがLy6Gを発現し、これは、これらが主にNDDCであることを示唆した（図7C）。これらは、in vivoで、脾臓のNDDCが促進したOVA特異的CD8⁺T細胞の増殖（図4B）および抗原特異的標的細胞の死滅²⁹（図4C）を生じた。次に、抗腫瘍免疫を促進する3G8-OVAの能力を試験した。3G8-OVAによる予備免疫単独では、皮下に埋め込まれたB16F10-OVA黒色腫細胞の成長に効果はなかったが、流入領域リンパ節および脾臓においてOVA特異的CD8⁺T細胞を生成した。GM-CSFと共に培養した、ex vivoで生成したOVA-ICを負荷された好中球の抗腫瘍形成能（図3D）、およびGM-CSFに基づくワクチンの成功³⁰を考慮して、本発明者らは、3G8-OVAによる免疫化の日に開始して5日連続で組換えGM-CSFでマウスをi.v.処置した。本発明者らは、GM-CSFは、B16F10-OVA腫瘍を3G8-OVAコンジュゲートに対して応答させ（図4D、図7D）、これは、OVA単独で免疫化した野生型マウスまたは3G8-OVAで免疫化したγ^{-/-}マウスと比較して、OVA特異的CD8エフェクターT細胞の生成、脾臓におけるTregに対するCD8の比率の増加（図4E、図7E）および腫瘍におけるCD8⁺T細胞浸潤の増強と相関した。3G8-OVAによるこれらの知見は、このコンジュゲートで処置した末梢血ヒト好中球が、OVAおよび標的化されたFcγRIIIBを急速に内在化させたように、ヒトにおいて関連性を有する可能性がある。FcγRIIAの内在化も経時的に観察され（図4A）、以下のセクションにおいて議論したようにNDDCの最適な生成にとって重要であり得る。これは、3G8-OVA投与の3時間後のマウスのFcγRIIA内在化の欠如と異なる（図7A）。in vivoでのFcγRIIA内在化は、より長期間にわたり生じる可能性がある。培養の2日以内に、3G8-OVAを与えた好中球は、アイソタイプ対照で処置した好中球と比較して、CD11c、MHCI、共刺激分子およびCCR7の有意により高い発現を有した（図4G）。抗原交差提示能を有するヒトDCサブセットは、XCR1、CD141およびCLEC9Aを発現する³¹。XCR1は、アイソタイプ対照に対して3G8-OVAを与えた好中球において増加したが、一方、CD141の発現は高かったが、2つの群の間で同等であり、CLEC9Aのわずかな増加は統計的に有意ではなかった（図4H）。

【0129】

[実施例2]

抗FcγRIIIB抗体は、単独で、好中球を免疫原性樹状様細胞に変換する

ドライバー変異を有し、その後、ネオ抗原を発現する自然免疫細胞のがんである、骨髄性腫瘍におけるような自然免疫系の悪性腫瘍。これらの患者由来の好中球が、自己T細胞に対して抗原を提示するNDDCに変換され得るかどうかを決定するために、本発明者らは、2つの異なるタイプの骨髄性腫瘍を有する患者から単離した好中球を、抗FcγRIIIB-OVAコンジュゲートまたはアイソタイプ対照で処置した。留意すべきこととして、OVAはこの実験において不適当である；抗体単独の十分量が即座に入手可能ではなかったため、このコンジュゲートを使用した。好中球を、正常なヒトボランティア（正常）、患者1（急性骨髄性白血病を有すると診断された）または患者2（骨髄異形成症候群を有すると診断された、迅速ヘムパネルによって決定した場合、変異を駆動する）から単離し、自己末梢血単核球（PBMC）を凍結させた。単離した好中球を、GM-CSFの存在下で、培地単体、抗FcγRIIIB-OVAコンジュゲート（ワクチン）または非

10

20

30

40

50

FcγRIIIB結合抗体のアイソタイプ対照（アイソタイプ）と共にインキュベートした。2日後に、PBMCを解凍し、T細胞を単離し、自己T細胞を、4：1の比で好中球／NDDCのコグネート培養物と共にインキュベートした。共培養を三連で行った。共培養の18時間後に、活性化T細胞によるIFN生成を検出するIFNγ ELISPOTアッセイを実施した。各スポットは、サイトカインを分泌する個々の細胞を表した。図1で解説するDCマーカーの発現によって評価したところ、NDDCがこれらの患者において生成された。NDDCを同じ患者に由来する自己T細胞（存在量が少ないにもかかわらず腫瘍ネオ抗原に対するT細胞反応性を有することが予測される）と共にインキュベートした。NDDCによるT細胞への抗原提示の成功によって、T細胞活性化と、Elispotアッセイ（サイトカインを分泌する個々の細胞の頻度の定量を可能にする）において評価されたように、その後のIFNγの生成がもたらされる。本発明者らは、2種の患者において、抗FcγRIIIB-OVAにより生成されたnDCを有する試料とT細胞を有する試料におけるIFNγの有意な生成を観察した（図9C～9D）。nDCもしくはT細胞を単独またはアイソタイプ抗体対照と共にインキュベートした好中球では、IFNγは観察されなかった。さらに、抗FcγRIIIBで処置した2名の正常なヒトボランティア（図9C～9D）およびスクリーニングした2名の追加の患者由来の好中球では、応答は観察されなかった。

【0130】

参考文献

【0131】

【表7-1】

1. Lehmann CH, et al. Direct Delivery of Antigens to Dendritic Cells via Antibodies Specific for Endocytic Receptors as a Promising Strategy for Future Therapies. *Vaccines (Basel)* 4, (2016).
2. Macri C, Dumont C, Johnston AP, Mintern JD. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin Transl Immunology* 5, e66 (2016).
3. Phillips BE, Garciafigueroa Y, Trucco M, Giannoukakis N. Clinical Tolerogenic Dendritic Cells: Exploring Therapeutic Impact on Human Autoimmune Disease. *Front Immunol* 8, 1279 (2017).
4. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 9, 181-218 (2014).

【0132】

【表 7 - 2】

5. Takashima A, Yao Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J Leukoc Biol* 98, 489-496 (2015).
6. Fites JS, et al. An unappreciated role for neutrophil-DC hybrids in immunity to invasive fungal infections. *PLoS Pathog* 14, e1007073 (2018).
7. Rogers KA, Scinicariello F, Attanasio R. IgG Fc receptor III homologues in nonhuman primate species: genetic characterization and ligand interactions. *J Immunol* 177, 3848-3856 (2006). 10
8. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 34-47 (2008).
9. Gillis C, Gouel-Cheron A, Jonsson F, Bruhns P. Contribution of Human Fcγ receptors to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front Immunol* 5, 254 (2014).
10. Unkeless JC, Shen Z, Lin CW, DeBeus E. Function of human Fc γ RIIA and Fc γ RIIIB. *Semin Immunol* 7, 37-44 (1995).
11. Bournazos S, Ravetch JV. Fcγ Receptor Function and the Design of Vaccination Strategies. *Immunity* 47, 224-233 (2017). 20
12. Wen YM, Mu L, Shi Y. Immunoregulatory functions of immune complexes in vaccine and therapy. *EMBO Mol Med* 8, 1120-1133 (2016).
13. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN. Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity* 28, 833-846 (2008).
14. Chen K, et al. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* 120, 4421-4431 (2012). 30
15. Su K, et al. Expression profile of FcγRIIb on leukocytes and its dysregulation in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178, 3272-3280 (2007).
16. Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29, 325-342 (2008).
17. Tsokos GC, Lo MS, Costa Reis P, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* 12, 716-730 (2016). 40

【 0 1 3 3 】

【表 7 - 3】

18. Hasenberg A, et al. Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat Methods* 12, 445-452 (2015).
19. Yamamoto M, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643 (2003).
20. Schuurhuis DH, et al. Immune complex-loaded dendritic cells are superior to soluble immune complexes as antitumor vaccine. *J Immunol* 176, 4573-4580 (2006).
21. Regnault A, et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189, 371-380 (1999). 10
22. Palucka K, Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 39, 38-48 (2013).
23. Blander JM. Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation. *Annu Rev Immunol* 36, 717-753 (2018).
24. Mackensen A, Krause T, Blum U, Uhrmeister P, Mertelsmann R, Lindemann A. Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cancer Immunol Immunother* 48, 118-122 (1999). 20
25. Rafiq K, Bergtold A, Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest* 110, 71-79 (2002).
26. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793 (1996).
27. van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190, 355-366 (1999). 30
28. Vieira P, Rajewsky K. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 18, 313-316 (1988).
29. Burleson GR, Burleson FG, Dietert RR. Evaluation of Cell-Mediated Immune Function Using the Cytotoxic T-Lymphocyte Assay. *Methods Mol Biol* 1803, 199-208 (2018). 40

【 0 1 3 4】

【表 7 - 4】

30. Yan WL, Shen KY, Tien CY, Chen YA, Liu SJ. Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 9, 347-360 (2017).
31. Radford KJ, Tullett KM, Lahoud MH. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27, 26-32 (2014).
32. Treffers LW, Hiemstra IH, Kuijpers TW, van den Berg TK, Matlung HL. Neutrophils in cancer. *Immunol Rev* 273, 312-328 (2016).
33. Cassidy, L.F., Lyles, D.S., and Abramson, J.S. (1988). Synthesis of viral proteins in polymorphonuclear leukocytes infected with influenza A virus. *J Clin Microbiol* 26, 1267-1270. 10
34. Hufford, M.M., Richardson, G., Zhou, H., Manicassamy, B., Garcia-Sastre, A., Enelow, R.I., and Braciale, T.J. (2012). Influenza-infected neutrophils within the infected lungs act as antigen presenting cells for anti-viral CD8(+) T cells. *PLoS One* 7, e46581.
35. Larochelle, B., Flamand, L., Gourde, P., Beauchamp, D., and Gosselin, J. (1998). Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood* 92, 291-299. 20
36. Lindsley, R.C., and Ebert, B.L. (2013). The biology and clinical impact of genetic lesions in myeloid malignancies. *Blood* 122, 3741-3748.
37. Rosenblatt, J., Stone, R.M., Uhl, L., Neuberg, D., Joyce, R., Levine, J.D., Arnason, J., McMasters, M., Luptakova, K., Jain, S., et al. (2016). Individualized vaccination of AML patients in remission is associated with induction of antileukemia immunity and prolonged remissions. *Sci Transl Med* 8, 368ra171.
38. Rungelrath, V., Kobayashi, S.D., and DeLeo, F.R. (2020). Neutrophils in innate immunity and systems biology-level approaches. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 12, e1458. 30
39. Saez-Lopez, C., Ngambe-Tourere, E., Rosenzwajg, M., Petit, J.C., Nicolas, J.C., and Gozlan, J. (2005). Immediate-early antigen expression and modulation of apoptosis after in vitro infection of polymorphonuclear leukocytes by human cytomegalovirus. *Microbes Infect* 7, 1139-1149.
40. Shi, Y., Dincheva-Vogel, L., Ayemoba, C.E., Fung, J.P., Bergamaschi, C., Pavlakakis, G.N., Farzaneh, F., and Gaensler, K.M.L. (2018). IL-15/IL-15Ralpha/CD80- 40

【 0 1 3 5】

【表 7 - 5】

expressing AML cell vaccines eradicate minimal residual disease in leukemic mice.
Blood Adv 2, 3177-3192.

41. Van Acker, H.H., Versteven, M., Lichtenegger, F.S., Roex, G., Campillo-Davo, D., Lion, E., Subklewe, M., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N., and Anguille, S. (2019). Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia. J Clin Med 8.

42. Wang, J.P., Bowen, G.N., Padden, C., Cerny, A., Finberg, R.W., Newburger, P.E., and Kurt-Jones, E.A. (2008). Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. Blood 112, 2028-2034.

43. Webster, J.A., and Pratz, K.W. (2018). Acute myeloid leukemia in the elderly: therapeutic options and choice. Leuk Lymphoma 59, 274-287.

44. Zhao, Y., Lu, M., Lau, L.T., Lu, J., Gao, Z., Liu, J., Yu, A.C., Cao, Q., Ye, J., McNutt, M.A., et al. (2008). Neutrophils may be a vehicle for viral replication and dissemination in human H5N1 avian influenza. Clin Infect Dis 47, 1575-1578.

【 0 1 3 6 】

他の実施形態

本発明は、その詳細な説明と併せて記載されているが、前記説明は、例示することを意図するものであり、添付の特許請求の範囲の範囲に定義されている本発明の範囲を限定することを意図するものではないことが理解されるべきである。他の態様、利点、および修正は、以下の特許請求の範囲の範囲内にある。

以下に、本願の当初の特許請求の範囲に記載の発明を列挙する。

【発明 1】

樹状細胞（DC）の集団を生成する方法であって、
FcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBの一方または両方を発現する好中球を含む好中球の集団を準備するステップと；
培養下の前記好中球を、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）ならびに抗原および抗体を含む免疫複合体（IC）と接触させるステップであって、前記抗体が、前記抗原に結合する抗原結合性部分ならびにFcγRIIAおよび／またはFcγRIIIBに結合するFc領域を含む、ステップと；
好中球がDCに分化する条件下で、およびそれに十分な時間、GM-CSFおよびICの存在下で、培養下において好中球の前記集団を維持するステップ
とを含む、前記方法。

【発明 2】

前記抗原がタグを含み、抗体が前記抗原の前記タグ部分に結合する、発明 1 に記載の方法。

【発明 3】

前記抗原が、腫瘍抗原である、発明 1 または 2 に記載の方法。

【発明 4】

がんを有する対象を処置する方法であって、発明 3 に記載の方法によって生成される前記細胞の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

【発明 5】

がんを処置する方法において使用するための、発明 3 に記載の方法によって生成される細胞。

〔発明 6〕

前記抗原が、病原体に由来する、発明 1 または 2 に記載の方法。

〔発明 7〕

病原体に感染した対象を処置する方法であって、発明 6 に記載の方法によって生成される前記細胞の有効量を前記対象に投与するステップであって、前記抗原が、前記対象が感染した前記病原体に由来する、ステップを含む、前記方法。

〔発明 8〕

病原体による感染症を処置する方法において使用するための、発明 6 に記載の方法によって生成される細胞であって、前記抗原が、前記対象が感染した前記病原体に由来する、前記細胞。

〔発明 9〕

抗原、および FcγRIII に結合する抗原結合性ドメインを含む抗体を含むコンジュゲートであって、必要に応じて、融合タンパク質または化学的コンジュゲートである、前記コンジュゲート。

〔発明 10〕

前記抗原が、腫瘍抗原または病原体に由来する抗原である、発明 9 に記載のコンジュゲート。

〔発明 11〕

樹状細胞（DC）の集団を生成する *in vitro* 方法であって、FcγRIIA および／または FcγRIIIB の一方または両方を発現する好中球を含む好中球の集団を準備するステップと；

培養下の好中球の前記集団を、発明 9 または 10 に記載のコンジュゲートおよび顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）と接触させるステップと；

好中球が DC に分化する条件下で、およびそれに十分な時間、前記コンジュゲートおよび GM-CSF の存在下で、培養下において好中球の前記集団を維持するステップとを含む、前記方法。

〔発明 12〕

前記抗原が、腫瘍抗原である、発明 11 に記載の方法。

〔発明 13〕

がんを有する対象を処置する方法であって、発明 12 に記載の方法によって生成される DC の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

〔発明 14〕

がんを処置する方法において使用するための、発明 12 に記載の方法によって生成される樹状細胞の集団。

〔発明 15〕

前記抗原が、病原体に由来する、発明 11 に記載の方法。

〔発明 16〕

病原体に感染した対象を処置する方法であって、発明 15 に記載の方法によって生成される前記 DC の有効量を前記対象に投与するステップであって、前記抗原が、前記対象が感染した前記病原体に由来する、ステップを含む、前記方法。

〔発明 17〕

病原体による感染症を処置する方法において使用するための、発明 15 に記載の方法によって生成される樹状細胞の集団であって、前記抗原が、前記対象が感染した前記病原体に由来する、前記集団。

〔発明 18〕

対象を処置する方法であって、発明 9 または 10 に記載のコンジュゲートの有効量および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を前記対象に投与するステップを含む、前記方法。

〔発明 19〕

前記対象が、がんを有し、前記抗原が、腫瘍抗原である、発明 18 に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔発明 20〕

前記対象が、病原体による感染症を有し、前記抗原が、病原体に由来する、発明 18 に記載の方法。

〔発明 21〕

樹状細胞（DC）の集団を生成する方法であって、

FcγRIIA および／または FcγRIIIB の一方または両方を発現する好中球を含む好中球の集団を準備するステップと；

培養下の前記好中球を、抗原に結合する抗原結合性部分ならびに FcγRIIA および／または FcγRIIIB に結合する Fc 領域を含む抗体と接触させるステップと；

好中球が DC に分化する条件下で、およびそれに十分な時間、培養下において好中球の前記集団を維持するステップ

とを含む、前記方法。

〔発明 22〕

好中球の前記集団が、GM-CSF および／または ILC の存在下で維持される、発明 21 に記載の方法。

〔発明 23〕

発明 21 に記載の方法によって生成される樹状細胞の集団。

〔発明 24〕

対象、好ましくは好中球の前記集団を得た対象を処置する方法において使用するための、発明 21 に記載の方法によって生成される樹状細胞の集団。

〔発明 25〕

前記対象が、骨髄性腫瘍または感染症を有する、発明 24 に記載の使用のための樹状細胞の集団。

〔発明 26〕

前記感染症が、細菌、真菌、またはウイルス感染症である、発明 24 に記載の使用のための樹状細胞の集団。

〔発明 27〕

FcγRIIA および／または FcγRIIIB の一方または両方を発現する好中球を含む好中球の前記集団が対象から得られ、分化した樹状細胞を好中球の前記集団を得た前記対象に投与するステップをさらに含む、発明 21 に記載の方法。

〔発明 28〕

前記対象が、骨髄性腫瘍または感染症を有する、発明 27 に記載の方法。

〔発明 29〕

骨髄性腫瘍を有する対象を処置する方法であって、FcγRIII に結合する抗原結合性ドメインを含む抗体の有効量を前記対象に投与するステップを含む、前記方法。

〔発明 30〕

前記対象が、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、または骨髄増殖性腫瘍（MPN）からなる群から選択される骨髄性腫瘍を有する、発明 29 に記載の方法。

〔発明 31〕

感染症を有する対象を処置する方法であって、FcγRIII に結合する抗原結合性ドメインを含む抗体の有効量を前記対象に投与するステップを含む、前記方法。

〔発明 32〕

前記感染症が、細菌、真菌、またはウイルス感染症である、発明 31 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A - B】

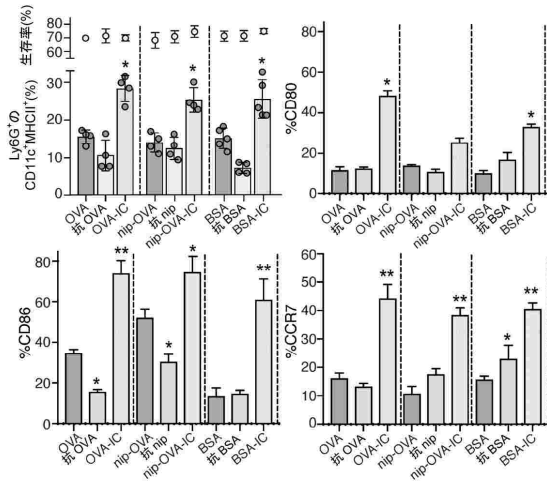


図 1A

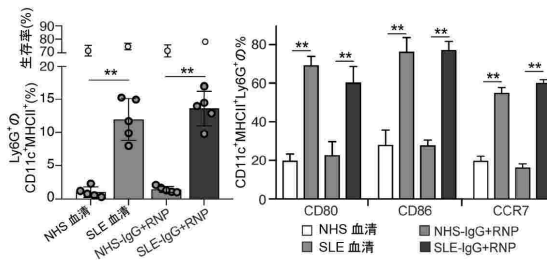


図 1B

【図 1 D】

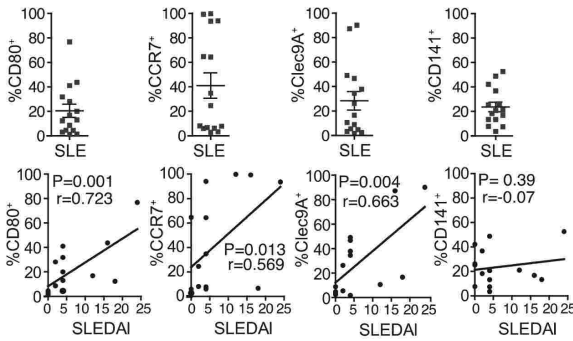


図 1D

【図 1 C】

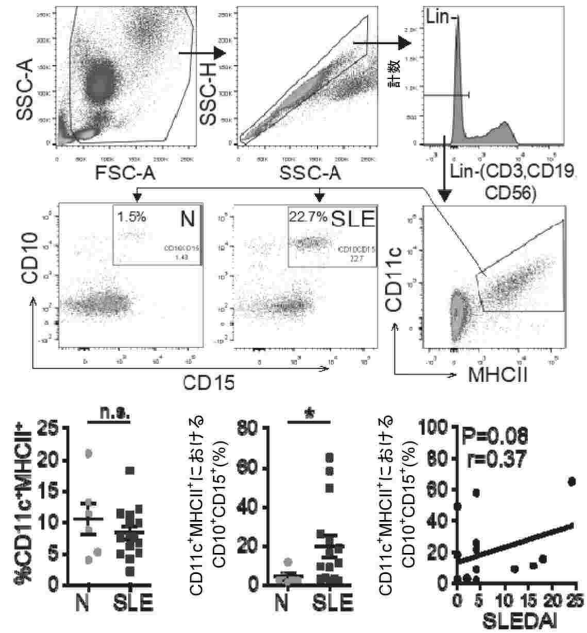


図 1C

【図 1 E】

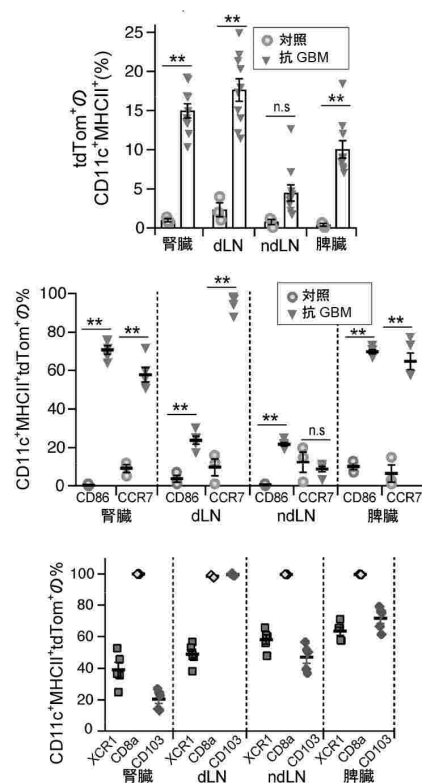


図 1E

10

20

30

40

50

【図 1 F - G】

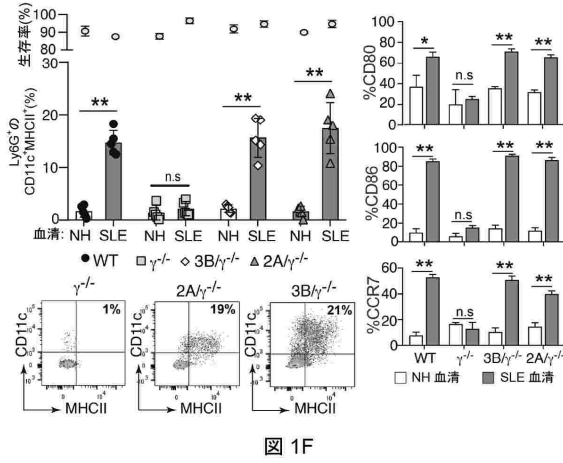


図 1F

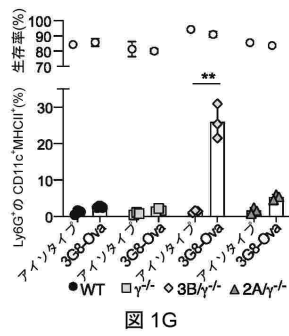


図 1G

【図 2 A】

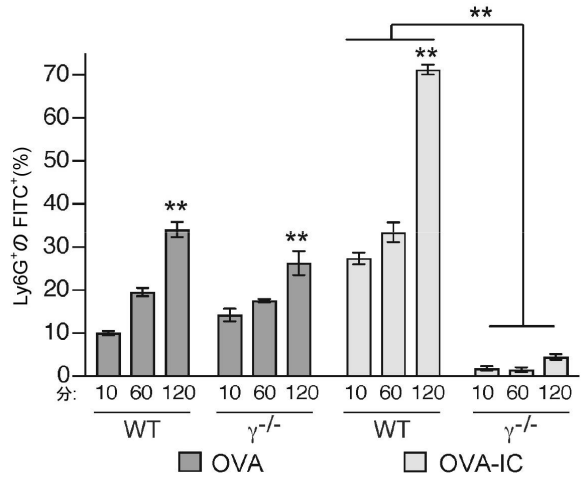


図 2A

【図 2 B】

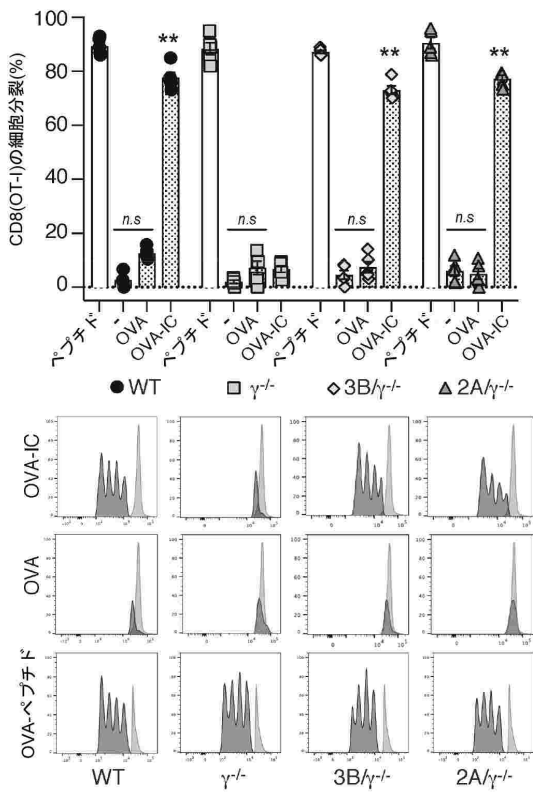


図 2B

【図 2 C】

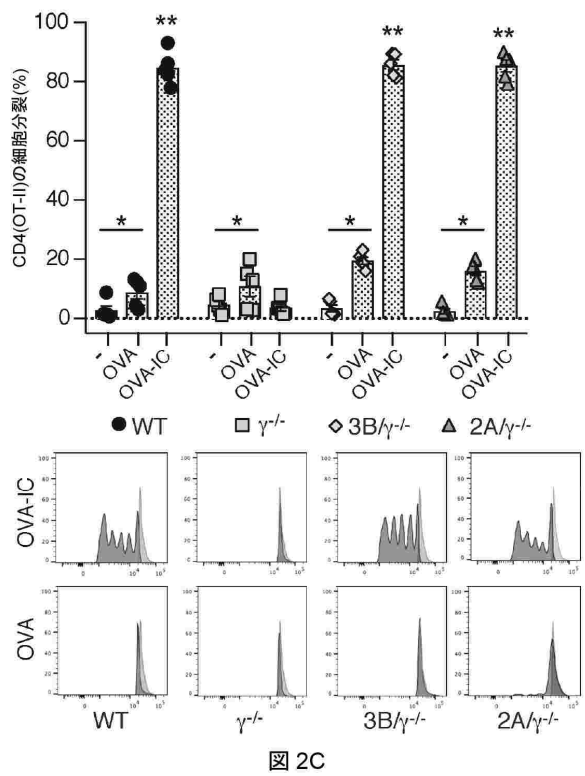


図 2C

10

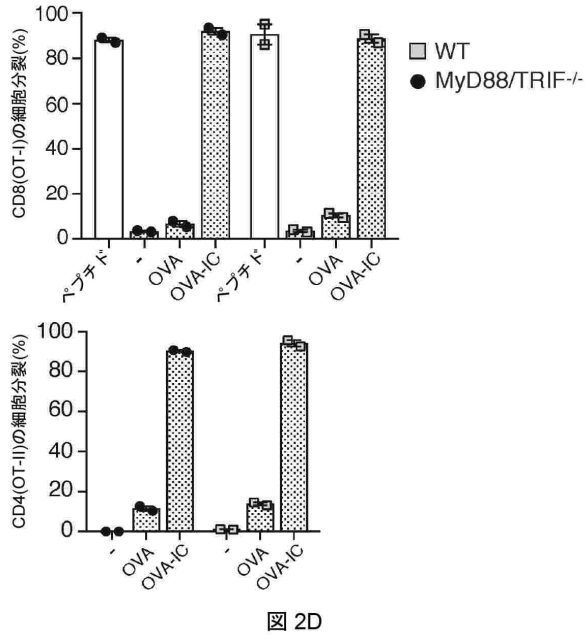
20

30

40

50

【図 2 D】



【図 3 A - B】

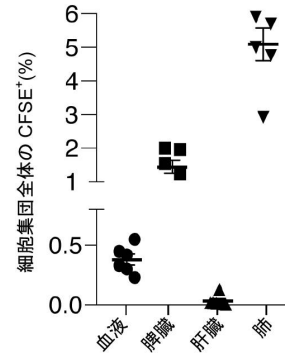


図 3A

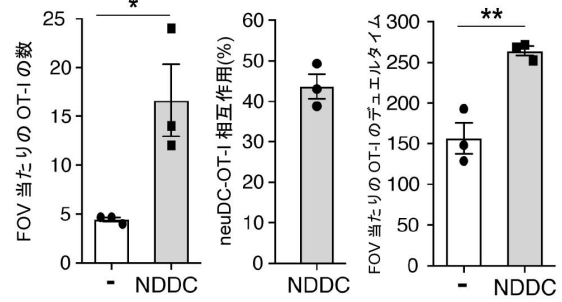
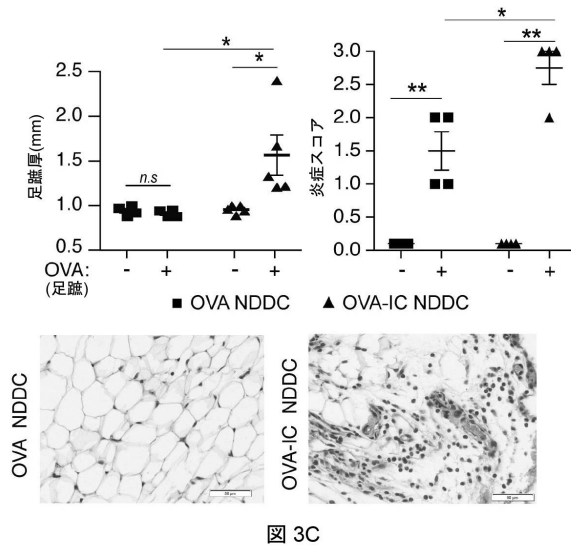
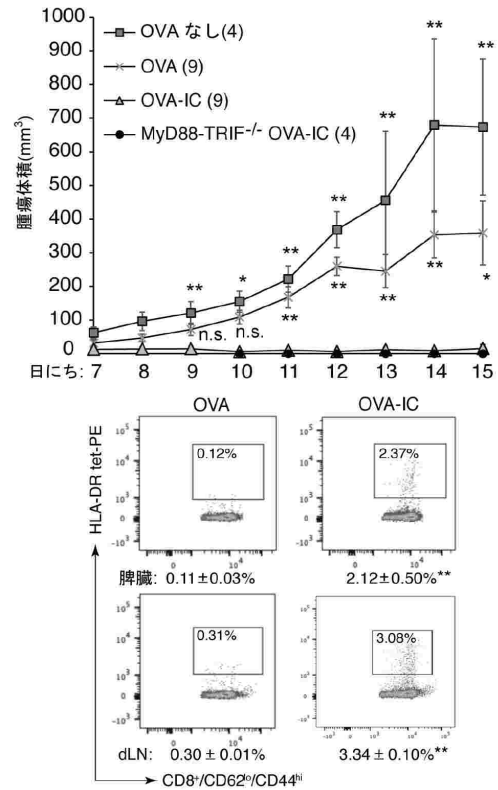


図 3B

【図 3 C】



【図 3 D】



10

20

30

40

50

【図 3 E】

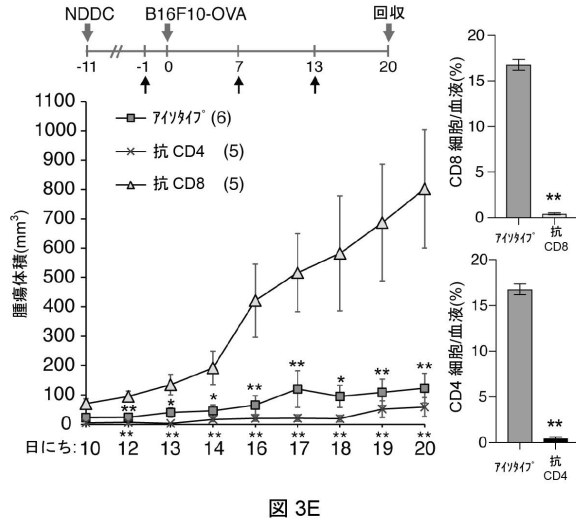


図 3E

【図 4 A】

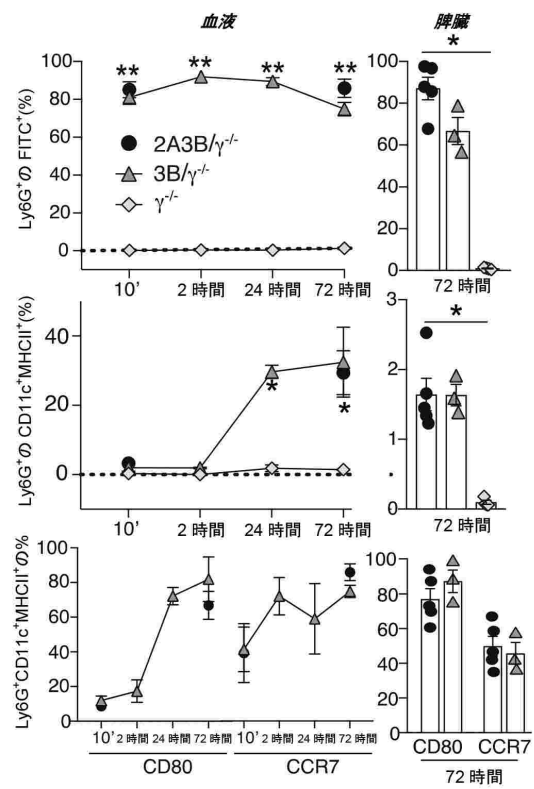


図 4A

【図 4 A - 2】

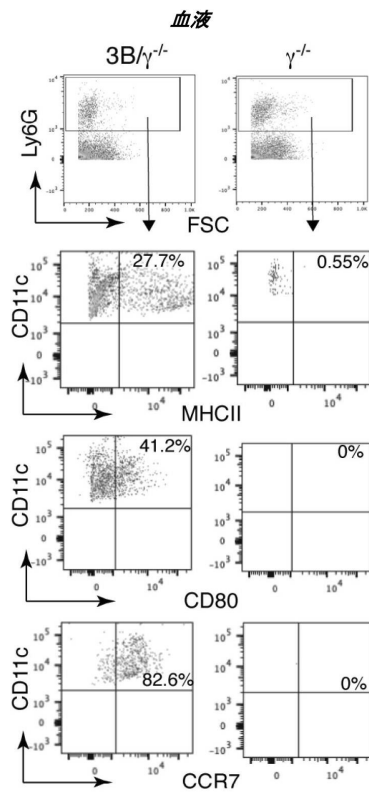


図 4A 続き

【図 4 B - C】

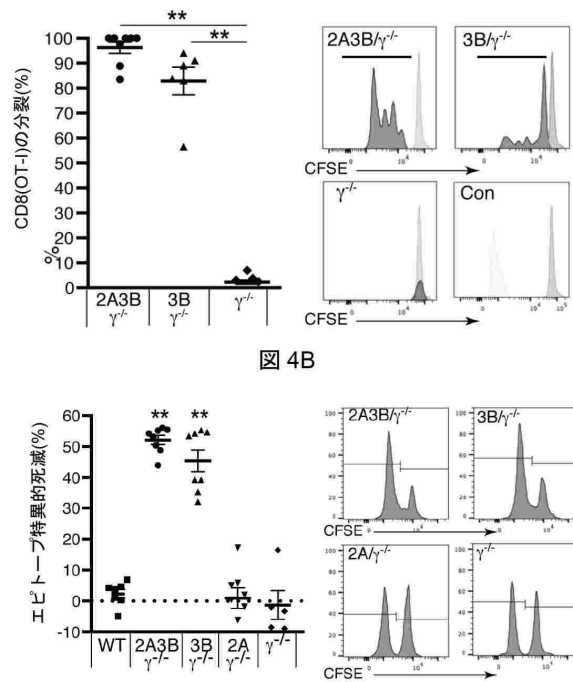


図 4B

図 4C

10

20

30

40

50

【図 4 D】

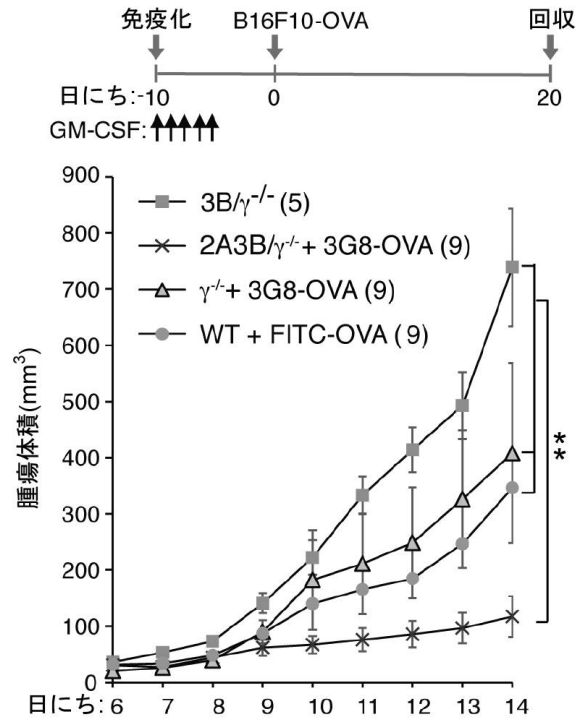


図 4D

【図 4 E - F】

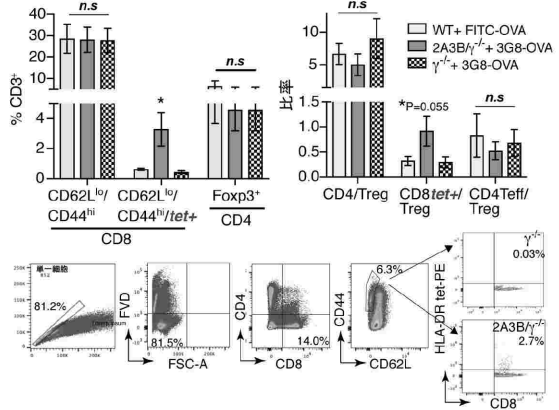


図 4E

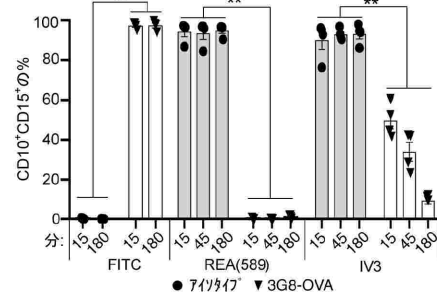


図 4F

【図 4 G】

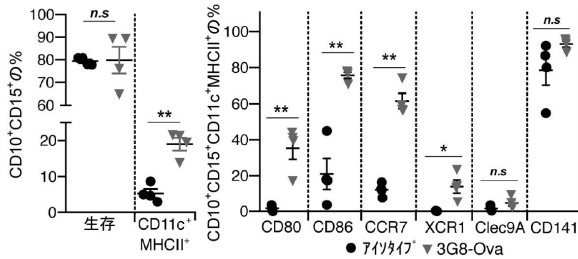


図 4G

【図 5 A】

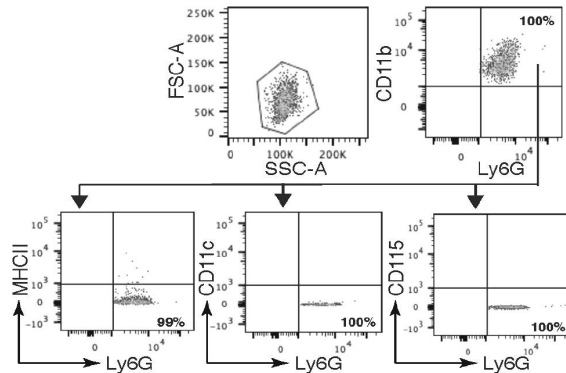


図 5A

10

20

30

40

50

【図 5 B - C】

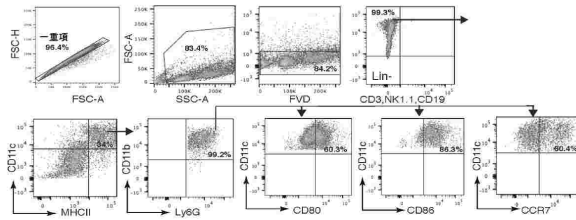


図 5B

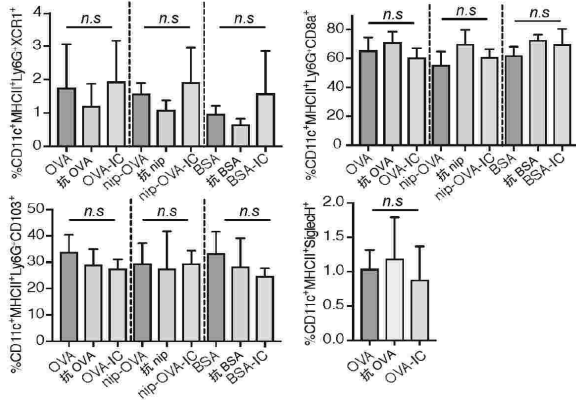


図 5C

【図 5 D - E】

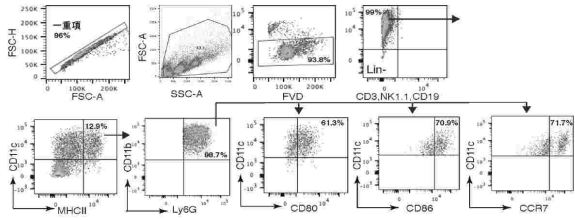


図 5D

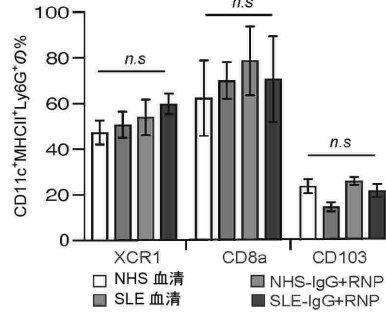


図 5E

【図 5 F】

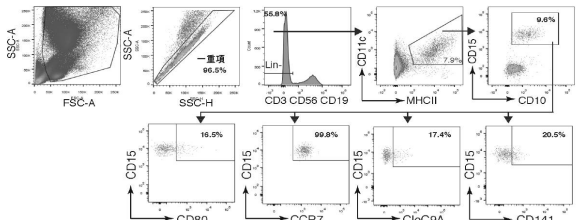


図 5F

【図 5 G】

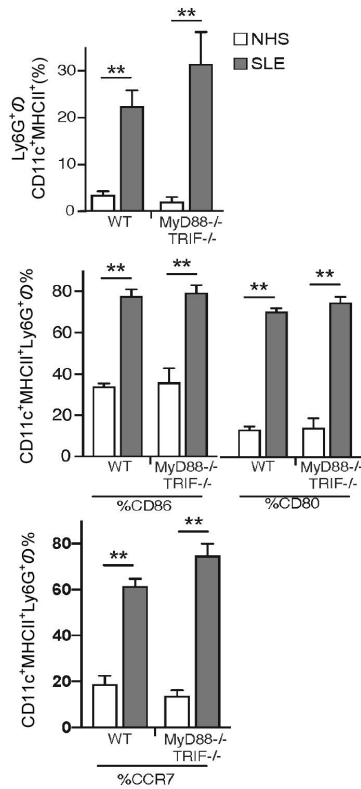


図 5G

10

20

30

40

50

【図 6】

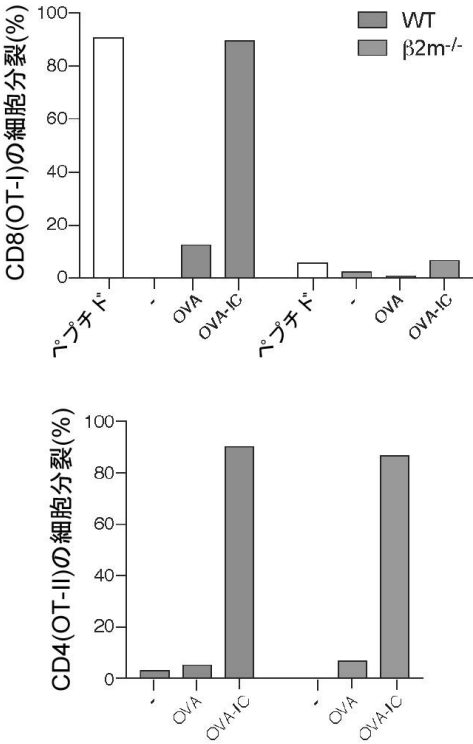


図 6

【図 7 A】

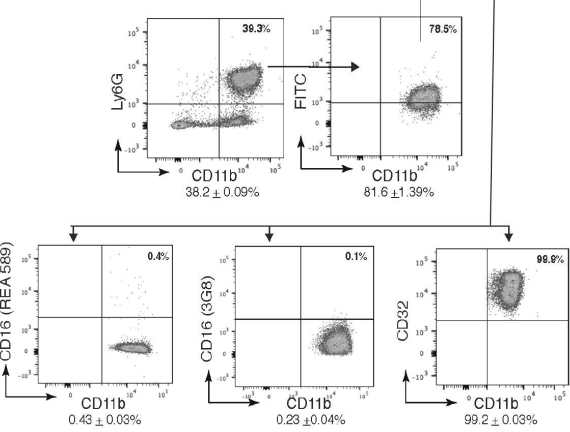


図 7A

【図 7 B】

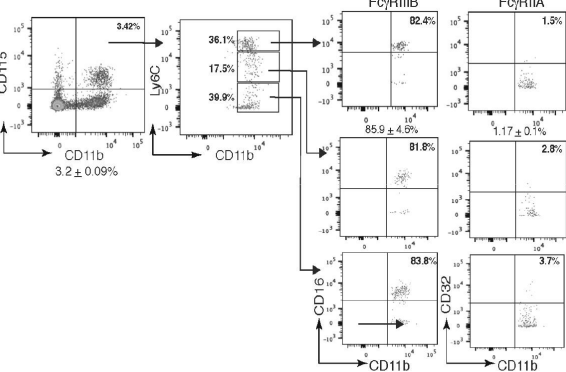


図 7B

【図 7 C - D】

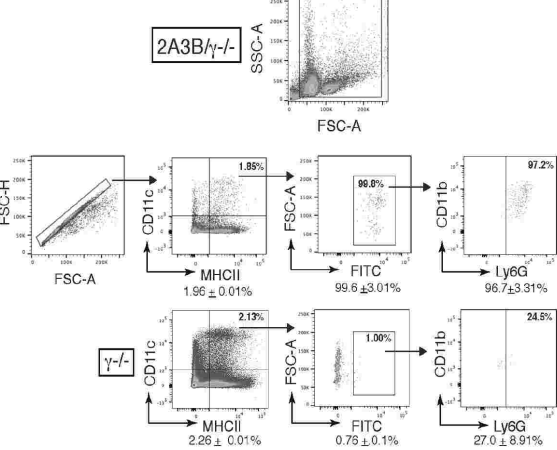


図 7C

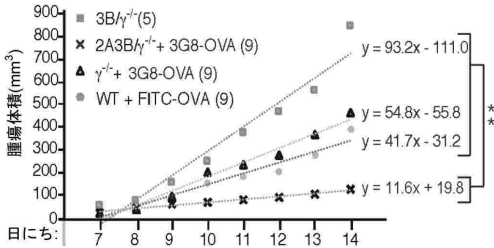


図 7D

【図 7 E】

CD8					
	FVD	CD3/CD8	CD62L ^{hi} /CD44 ^{hi}	CD62L ^{hi} /CD44 ^{hi} /Tet ^{hi}	CD62L ^{hi} /CD44 ^{hi} /PD1 ⁺
FITC-OVA	75.74±2.26	13.83±0.45	26.62±6.72	0.61±0.07	0.62±0.15
2A3B ^{hi} γ ⁺ + 3G8-OVA	81.78±1.08	12.65±0.80	26.14±5.88	3.26±1.11**	1.23±0.31
γ ⁺ + 3G8-OVA	77.06±1.81	12.91±0.54	27.82±5.61	0.42±0.10	0.79±0.20

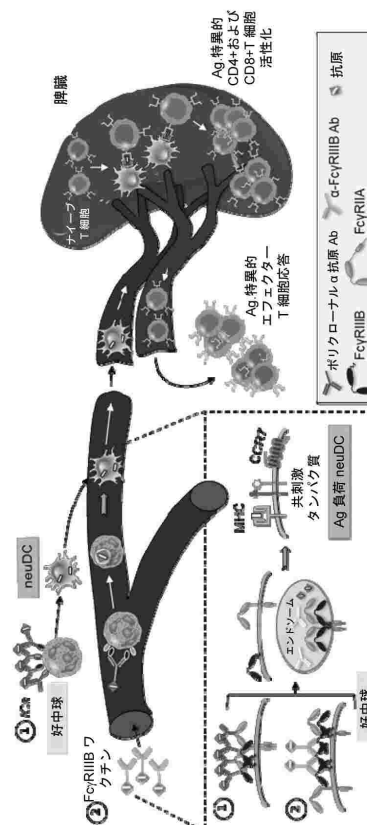
CD4							
	FVD	CD3/CD4	CD4/CD25	CD4/CD69	CD4/foxp3 ⁺	CD4/Ki67 ⁺	CD4/Tbet ⁺
FITC-OVA	80.94±4.33	17.26±1.08	0.48±0.11	0.26±0.06	6.31±4.64	13.39±1.87	5.97±0.69
2A3B ^{hi} γ ⁺ + 3G8-OVA	85.31±2.34	19.66±0.42	1.30±0.19	0.34±0.1	8.19±2.93	18.56±1.4	5.10±0.49
γ ⁺ + 3G8-OVA	81.52±3.73	18.20±1.28	1.11±0.17	0.33±0.09	4.56±1.38	16.71±1.57	4.17±1.07

比

	CD8 ⁺ /Treg ⁺	CD8Tet ⁺ /Treg ⁺	CD4 Tef ⁺ /Treg ⁺
FITC-OVA	6.68±1.63	0.32±0.09	0.83±0.43
2A3B ^{hi} γ ⁺ + 3G8-OVA	5.02±1.68	0.92±0.30	0.52±0.18
γ ⁺ + 3G8-OVA	9.01±3.06	0.30±0.11	0.68±0.27

図 7E

【圖 8】



8
✕

【図 9 A - B】

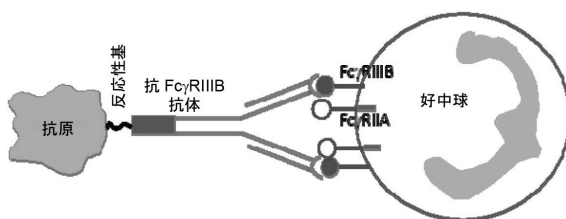


图 9A

【圖 9 C - D】

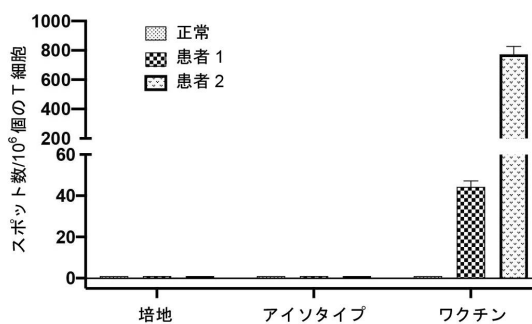


図 9C

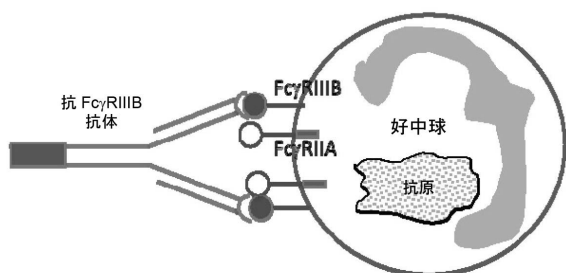


図 9B

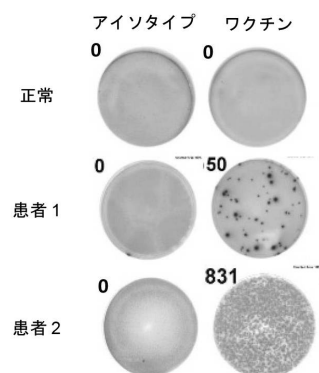


图 9D

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K	16/30

アメリカ合衆国 0 2 4 2 0 マサチューセッツ州, レキシントン, ノース ストリート 8 4

(72)発明者 マヤダス, ターニャ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 0 マサチューセッツ州, ジャマイカ プレイン, エリオット エスティー
2 5 エー

(72)発明者 マイソール, ビジャヤ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 2 マサチューセッツ州, ウェスト ロクスベリー, センター ストリート
1 7 9 9

(72)発明者 カレレ, ザビエル

アメリカ合衆国 0 2 4 6 0 マサチューセッツ州, ニュートン, ブルックデール ロード 4 7

審査官 西澤 龍彦

(56)参考文献

特表 2 0 1 3 - 5 3 5 5 0 8 (J P, A)

米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 1 4 7 9 5 (U S, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 2 5 0 3 3 6 (U S, A 1)

特開 2 0 0 4 - 1 8 9 7 2 4 (J P, A)

特開 2 0 0 1 - 0 6 1 4 6 9 (J P, A)

特開 2 0 1 7 - 2 1 2 9 0 2 (J P, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)