

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-519305

(P2021-519305A)

(43) 公表日 令和3年8月10日(2021.8.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/385 (2006.01)	A 6 1 K 39/385	4 C 0 7 6
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-551882 (P2020-551882)	(71) 出願人 399019892 ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ THE UNIVERSITY OF C H I C A G O アメリカ合衆国60637イリノイ州シカ ゴ、サウス・エリス・アベニュー5801 番
(86) (22) 出願日 平成31年3月26日 (2019. 3. 26)	(74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日 令和2年10月27日 (2020. 10. 27)	(74) 代理人 100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号 PCT/US2019/024052	(74) 代理人 100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号 W02019/191079	(74) 代理人 100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日 令和1年10月3日 (2019. 10. 3)	
(31) 優先権主張番号 62/647, 911	
(32) 優先日 平成30年3月26日 (2018. 3. 26)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓およびリンパ節の類洞内皮細胞C型レクチン (L S E C t i n) を標的とするための方法および組成物

(57) 【要約】

ある特定の態様は、抗原を肝臓およびリンパ節のC型レクチン (LSEctin) に向けるための組成物および方法を対象とする。特定の局面において、本明細書において開示される組成物は、標的とする抗原に対する寛容原性免疫を誘導し得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SISSYY (SEQ ID NO:100) のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 (CDRH) を含む、ヒト肝類洞内皮細胞C型レクチン (LSEctin) に結合する結合部分；

寛容が所望される抗原

を含む、抗原特異的寛容を誘導するための組成物であって、

該寛容が所望される抗原が、1つもしくは複数の抗原、または該1つもしくは複数の抗原の1つもしくは複数の断片を含み、

該寛容が所望される抗原が、LSEctin結合部分に共有結合されるか、またはリンカーを介してLSEctin結合部分に結合されており、

10

単独の抗原に曝露された対象は、望ましくない免疫応答によって単独の抗原に反応し、当該組成物に曝露された対象は、抗原へのその後の曝露に対する免疫応答が低下する、組成物。

【請求項 2】

LSEctin結合部分が、LSEctin特異的抗体またはLSEctin特異的抗体の断片である、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

LSEctin結合部分が、LSEctin特異的抗体の断片である、請求項1記載の組成物。

【請求項 4】

LSEctin結合部分が、SSIのアミノ酸配列を含む付加的なCDRHをさらに含む、請求項3記載の組成物。

20

【請求項 5】

CDRHが、SISSYYX₃YTX₄ (SEQ ID NO:68) のアミノ酸配列を含み、付加的なCDRHが、X₁SX₂SSI (SEQ ID NO:67) のアミノ酸配列を含む、請求項4記載の組成物。

【請求項 6】

LSEctin結合部分が、少なくとも第3のCDRHおよび軽鎖相補性決定領域 (CDRL) をさらに含む、請求項5記載の組成物。

【請求項 7】

CDRHが、SISSYYGYTY (SEQ ID NO:59) のアミノ酸配列を含み、付加的なCDRHが、LSSSSI (SEQ ID NO:55) のアミノ酸配列を含む、請求項5記載の組成物。

30

【請求項 8】

LSEctin結合部分が、SYWYPV (SEQ ID NO:51) のアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域 (CDRL) をさらに含む、請求項7記載の組成物。

【請求項 9】

LSEctin結合部分が、NDDWYIWDWYYTRWYGL (SEQ ID NO:63) のアミノ酸配列を有する少なくとも第3のCDRHをさらに含む、請求項8記載の組成物。

40

【請求項 10】

LSEctin結合部分が、1つまたは複数の付加的なCDRLをさらに含む、請求項9記載の組成物。

【請求項 11】

CDRHが、SISSYYSYTS (SEQ ID NO:12) のアミノ酸配列を含み、付加的なCDRHが、VSYSSI (SEQ ID NO:9) のアミノ酸配列を含む、請求項5記載の組成物。

【請求項 12】

LSEctin結合部分が、YLAYQSPL (SEQ ID NO:4) のアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域 (CDRL) をさらに含む、請求項11記載の組成物。

【請求項 13】

50

LSEctin結合部分が、
YEEWAYYSSEMAF (SEQ ID NO:18)

のアミノ酸配列を有する少なくとも第3のCDRHをさらに含む、請求項12記載の組成物。

【請求項 1 4】

LSEctin結合部分が、1つまたは複数の付加的なCDRLをさらに含む、請求項13記載の組成物。

【請求項 1 5】

LSEctin結合部分が親和性成熟している、請求項1記載の組成物。

【請求項 1 6】

抗原が、多発性硬化症、セリアック病、および/またはI型糖尿病のうちの1つまたは複数に関連している、請求項1記載の組成物。 10

【請求項 1 7】

抗原が、SEQ ID NO:26の一部を含むポリペプチドを含む、請求項1～16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 1 8】

抗原が、SEQ ID NO:27の一部を含むポリペプチドを含む、請求項1～16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 1 9】

抗原が、SEQ ID NO:28の一部を含むポリペプチドを含む、請求項1～16のいずれか一項記載の化合物。 20

【請求項 2 0】

抗原が、SEQ ID NO:26の一部およびSEQ ID NO:27の一部を含むポリペプチドを含む、請求項1～16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 2 1】

抗原が、SEQ ID NO:69を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:70、またはそれと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項20記載の化合物。

【請求項 2 2】

抗原が、SEQ ID NO:71を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:75、またはそれと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項20記載の化合物。 30

【請求項 2 3】

抗原が、SEQ ID NO:72を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:76、またはそれと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項20記載の化合物。

【請求項 2 4】

抗原が、SEQ ID NO:73を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:35、またはそれと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項20記載の化合物。

【請求項 2 5】

抗原が、SEQ ID NO:26の一部、SEQ ID NO:27の一部、およびSEQ ID NO:28の一部を含むポリペプチドを含む、請求項1～16のいずれか一項記載の化合物。 40

【請求項 2 6】

抗原が、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、およびSEQ ID NO:72のうちの1つもしくは複数を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:35、69、70、71、もしくは72のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項25記載の化合物。

【請求項 2 7】

抗原が、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、およびSEQ ID NO:35のうちの1つもしくは複数を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:73、74、75、76、 50

もしくは35のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項25記載の化合物。

【請求項28】

抗原が、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、およびSEQ ID NO. 72のうちの一つもしくは複数を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:35、75、76、71、73、74、もしくは72のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項29】

抗原が、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、およびSEQ ID NO:35のアミノ酸配列のうちの一つまたは複数を含むポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

10

【請求項30】

抗原が、SEQ ID NO:29のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項31】

抗原が、SEQ ID NO:30のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項32】

抗原が、SEQ ID NO:31のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

20

【請求項33】

抗原が、SEQ ID NO:32のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項34】

抗原が、SEQ ID NO:33のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項35】

抗原が、SEQ ID NO:34のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項36】

抗原が、SEQ ID NO:35のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

30

【請求項37】

抗原が、SEQ ID NO:42もしくはSEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:42もしくは43のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項38】

抗原が、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、もしくはSEQ ID NO:79のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:77、78、もしくは79のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

40

【請求項39】

抗原が、SEQ ID NO:23の一部を含むポリペプチドを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項40】

抗原が、SEQ ID NO:23の一部およびSEQ ID NO:80の一部を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項39記載の化合物。

【請求項41】

抗原が、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95、およびSEQ ID NO:96からなる群より選択される一つもしくは複数のポリペプチド、またはSEQ ID NO:91、92、93、94、95、もしくは96のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有

50

するポリペプチドを含む、請求項39記載の化合物。

【請求項 4 2】

抗原が、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、およびSEQ ID NO:90からなる群より選択される1つもしくは複数のポリペプチド、またはSEQ ID NO:82、83、84、85、86、87、88、89、もしくは90のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項39記載の化合物。

【請求項 4 3】

請求項1~42のいずれか一項記載の化合物を対象に投与する段階を含む、対象において特定の抗原に対する寛容を誘導する方法。

10

【請求項 4 4】

請求項17~36のいずれか一項記載の化合物を対象に投与する段階を含む、対象の多発性硬化症を処置する方法。

【請求項 4 5】

請求項37~38のいずれか一項記載の化合物を対象に投与する段階を含む、対象のセリアック病を処置する方法。

【請求項 4 6】

請求項39~42のいずれか一項記載の化合物を対象に投与する段階を含む、対象の1型糖尿病を処置する方法。

【請求項 4 7】

対象において特定の抗原に対する寛容を誘導するための、請求項1~42のいずれか一項記載の化合物の使用。

20

【請求項 4 8】

対象において特定の抗原に対する寛容を誘導するための医薬を調製するための、請求項1~42のいずれか一項記載の化合物の使用。

【請求項 4 9】

SISSYY (SEQ ID NO:100) のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 (CDRH) を含む、ヒト肝類洞内皮細胞C型レクチン (LSEctin) に結合する結合部分であって、該LSEctin結合部分が、LSEctin特異的抗体またはLSEctin特異的抗体の断片である、結合部分と；

30

寛容が所望される抗原と

を含み、

該寛容が所望される抗原が、1つもしくは複数の抗原、または該1つもしくは複数の抗原の1つもしくは複数の断片を含み、

該寛容が所望される抗原が、LSEctin結合部分に共有結合されるか、またはリンカーを介してLSEctin結合部分に結合され、

単独の抗原に曝露された対象は、望ましくない免疫応答によって単独の抗原に反応し、当該組成物に曝露された対象は、抗原へのその後の曝露に対する免疫応答が低下する、組成物

を対象に投与する段階を含む、対象において特定の抗原に対する寛容を誘導するための方法。

40

【請求項 5 0】

LSEctin結合部分が、LSEctin特異的抗体の断片である、請求項49記載の方法。

【請求項 5 1】

LSEctin結合部分が、SSIのアミノ酸配列を含む付加的なCDRHをさらに含む、請求項49記載の方法。

【請求項 5 2】

CDRHが、SISSYYX₃YTX₄ (SEQ ID NO:68) のアミノ酸配列を含み、

付加的なCDRHが、X₁SX₂SSI (SEQ ID NO:67) のアミノ酸配列を含み、かつ

LSEctin結合部分が、少なくとも第3のCDRHおよび軽鎖相補性決定領域 (CDRL) をさらに含む、

50

請求項51記載の方法。

【請求項 5 3】

CDRHが、SISSYYGYTY (SEQ ID NO:59) のアミノ酸配列を含み、
付加的なCDRHが、LSSSSI (SEQ ID NO:55) のアミノ酸配列を含み、かつ
LSEctin結合部分が、SYWYPV (SEQ ID NO:51) のアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定
領域 (CDRL)、および
NDDWYIWDWYYTRWYGL (SEQ ID NO:63)

のアミノ酸配列を有する少なくとも第3のCDRHをさらに含む、
請求項52記載の方法。

【請求項 5 4】

CDRHが、SISSYYSYTS (SEQ ID NO:12) のアミノ酸配列を含み、
付加的なCDRHが、VSYSSI (SEQ ID NO:9) のアミノ酸配列を含み、かつ
LSEctin結合部分が、YLAYQSPL (SEQ ID NO:4) のアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定
領域 (CDRL)、および

YEEWAYYSSEMAF (SEQ ID NO:18)

のアミノ酸配列を有する少なくとも第3のCDRHをさらに含む、
請求項51記載の方法。

【請求項 5 5】

抗原が、SEQ ID NO:26の一部およびSEQ ID NO:27の一部を含むポリペプチドを含む、請
求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 6】

抗原が、SEQ ID NO:69を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも90%の配列同一性
を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:70、またはそれと少なくとも90%の配列同一性
を有するポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 7】

抗原が、SEQ ID NO:71を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも90%の配列同一性
を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:75、またはそれと少なくとも90%の配列同一性
を有するポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 8】

抗原が、SEQ ID NO:72を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも90%の配列同一性
を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:76、またはそれと少なくとも90%の配列同一性
を有するポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 9】

抗原が、SEQ ID NO:73を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも90%の配列同一性
を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:35、またはそれと少なくとも90%の配列同一性
を有するポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 0】

抗原が、SEQ ID NO:26の一部、SEQ ID NO:27の一部、およびSEQ ID NO:28の一部を含む
ポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 1】

多発性硬化症を処置するための、請求項55～60のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 2】

抗原が、SEQ ID NO:42もしくはSEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含むポリペプチド、また
はSEQ ID NO:42もしくはSEQ ID NO:43のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する
ポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 3】

抗原が、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、もしくはSEQ ID NO:79のアミノ酸配列を含むポ
リペプチド、またはSEQ ID NO:77、78、もしくは79のいずれかと少なくとも90%の配列同
一性を有するポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 4】

10

20

30

40

50

セリアック病を処置するための、請求項62～63のいずれか一項記載の方法。

【請求項65】

抗原が、SEQ ID NO:23の一部を含むポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項66】

抗原が、SEQ ID NO:23の一部およびSEQ ID NO:80の一部を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項67】

抗原が、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95、およびSEQ ID NO:96からなる群より選択される1つもしくは複数のポリペプチド、またはSEQ ID NO:91、92、93、94、95、もしくは96のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項68】

抗原が、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、およびSEQ ID NO:90からなる群より選択される1つもしくは複数のポリペプチド、またはSEQ ID NO:82、83、84、85、86、87、88、89、もしくは90のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項69】

I型糖尿病を処置するための、請求項65～68のいずれか一項記載の方法。

【請求項70】

抗原に機能的に結合されているLSEctin結合部分。

【請求項71】

LSEctin特異的抗体またはそのLSEctin結合断片である、請求項70記載のLSEctin結合部分。

【請求項72】

SEQ ID NO:17のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3またはその機能的等価物を含む、請求項70または請求項71記載のLSEctin結合部分。

【請求項73】

SEQ ID NO:51 ; SEQ ID NO:52 ; SEQ ID NO:53 ; SEQ ID NO:54 ; SEQ ID NO:3 ; SEQ ID NO:4 ; SEQ ID NO:5 ; SEQ ID NO:6、もしくはSEQ ID NO:7のアミノ酸配列を有するCDRL3の軽鎖相補性決定領域 (CDR) ;

SEQ ID NO:55 ; SEQ ID NO:56 ; SEQ ID NO:57 ; SEQ ID NO:58 ; SEQ ID NO:8 ; SEQ ID NO:9、もしくはSEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有するCDRH1 ;

SEQ ID NO:59 ; SEQ ID NO:60 ; SEQ ID NO:61 ; SEQ ID NO:62 ; SEQ ID NO:11 ; SEQ ID NO:12 ; SEQ ID NO:13 ; SEQ ID NO:14 ; SEQ ID NO:15 ; もしくはSEQ ID NO:16のアミノ酸配列を有するCDRH2 ; および / または

SEQ ID NO:63 ; SEQ ID NO:64 ; SEQ ID NO:65 ; SEQ ID NO:66 ; SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、もしくはSEQ ID NO:22のアミノ酸配列を有するCDRH3 ;

またはそれらの機能的等価物を含む、請求項70、71、または72のいずれか一項記載のLSEctin結合部分。

【請求項74】

抗体が、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有する軽鎖、およびSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有する重鎖を有する、請求項71記載のLSEctin結合部分。

【請求項75】

非抗体タンパク質足場を含む、請求項70記載のLSEctin結合部分。

【請求項76】

抗原に結合されている、請求項70～75のいずれか一項記載のLSEctin結合部分。

【請求項77】

10

20

30

40

50

抗原が、LSEctin結合部分に共有結合されている、請求項76記載のLSEctin結合部分。

【請求項78】

LSEctin結合部分を抗原に接続するリンカーをさらに含む、請求項76記載のLSEctin結合部分。

【請求項79】

抗原が自己抗原または同種抗原である、請求項76～78のいずれか一項記載のLSEctin結合部分。

【請求項80】

LSEctinがヒトLSEctinである、請求項70～79のいずれか一項記載のLSEctin結合部分。

【請求項81】

- (a) LSEctin特異的抗体またはそのLSEctin結合断片；
- (b) 任意のリンカー；および
- (c) 免疫抑制標的

を含む、ポリペプチド複合体。

【請求項82】

免疫抑制標的が抗原である、請求項81記載の組成物。

【請求項83】

抗原が、外来の移植片抗原、同種抗原、自己免疫抗原、食物抗原、動物抗原、植物抗原、環境抗原、治療剤、合成自己抗原、またはそれらの寛容原性部分である、請求項82記載の組成物。

【請求項84】

抗原が、小胞、細胞断片、または細胞内に含まれる、請求項82または83記載の組成物。

【請求項85】

任意のリンカーが、スクシンイミジルリンカー、マレイミドリンカー、クリック化学リンカー、またはジスルフィドリンカーである、請求項81～84のいずれか一項記載の組成物。

【請求項86】

標的に対する免疫寛容を誘導する方法であって、抗原標的に対する免疫応答の抑制を必要とする対象に、請求項70～85のいずれか一項記載の組成物を投与する段階を含む、方法。

【請求項87】

標的が抗原である、請求項86記載の方法。

【請求項88】

抗原が、外来の移植片抗原、同種抗原、自己免疫抗原、食物抗原、動物抗原、植物抗原、環境抗原、治療剤、合成自己抗原、またはそれらの寛容原性部分である、請求項87記載の方法。

【請求項89】

抗原が、小胞、細胞断片、または細胞内に含まれる、請求項86～88のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年3月26日に出願された米国仮特許出願第62/647,911号の優先権の恩典を主張し、これは全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表の参照

37 CFR 1.821～1.825によって要求される配列表は、本出願と共に電子的に提出されている。配列表は参照により本明細書に組み入れられる。

【0003】

10

20

30

40

50

A. 分野

本明細書において開示されるいくつかの態様は、一般に医学および免疫学の分野に関する。より具体的には、いくつかの態様は、肝類洞内皮細胞（LSEC）を介して免疫寛容を調節するために、リンパ節および/または肝臓の類洞内皮細胞C型レクチン（LSECtin）を標的とすることに関する。

【背景技術】

【0004】

2. 関連技術の説明

肝臓の主な機能は、解毒、代謝、ならびにアルブミンおよび胆汁などの重要物質の生成である。肝類洞内皮細胞（LSEC）は、片側の血液細胞とその反対側の肝細胞および肝星細胞との間の界面に位置する高度に特殊化した内皮細胞である。その主な機能は一般的に理解されているにもかかわらず、肝臓の機能は、免疫におけるその役割が正しく評価されていない。肝臓は、肝炎およびマラリアの場合のように、生産的な免疫応答を開始する必要がある血液媒介病原体にさらされる。肝臓には、組織常在性マクロファージ、クッパー細胞の最大の集団、ならびにナチュラルキラー細胞およびナチュラルキラーT細胞の最大の濃度が存在する（Jenne and Kubes, Nat. Immunol. 14:996-1006, 2013（非特許文献1））。肝臓の解剖学的構造は、免疫相互作用に適している。血液は肝類洞を通過する際に著しく遅くなり、内皮は、有窓性であって、ディッセ腔に存在する内皮下細胞を循環細胞にさらしている。全体としてこれにより、循環リンパ球と、肝細胞、樹状細胞、クッパー細胞、および肝類洞内皮細胞（LSEC）を含む類洞内の細胞との間の密接な相互作用が可能になる。

10

20

【0005】

免疫応答は、潜在的病原微生物に対する防御に必要である。しかしながら、望ましくない免疫活性化は、自身の組織の損傷または破壊につながる有害な過程を引き起こし得る。望ましくない免疫活性化は、例えば、抗体および/またはTリンパ球が、身体の組織を損ねるほど自己抗原と反応する、自己免疫疾患において起こる。これは、ある特定の環境事項に対する過剰な免疫応答によって特徴づけられ、組織破壊につながる炎症反応を引き起こし得るアレルギー反応、および宿主に存在するアロ反応性T細胞によって媒介される移植臓器の拒絶反応にも該当する。

【0006】

免疫寛容とは、免疫応答が通常起こるであろう抗原に対する特異的な免疫応答性の後天的欠如である。典型的に、寛容を誘導するためには、寛容性抗原への曝露が必要であり、その結果、ある特定のリンパ球の死または機能的な不活性化が生じる。この過程は一般に、自己抗原に対する寛容または自己寛容を説明する。免疫抑制剤は、望ましくない免疫応答の予防または低減、例えば、自己免疫疾患患者または同種移植患者の処置において有用である。しかしながら、免疫抑制剤はまた、全身性の免疫抑制、毒性、および日和見感染による死亡さえも引き起こし得る。

30

【0007】

免疫寛容、特に抗原特異的免疫寛容を誘導するためのさらなる組成物および方法が必要である。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Jenne and Kubes, Nat. Immunol. 14:996-1006, 2013

【発明の概要】

【0009】

概要

本明細書に記載される態様は、免疫系を調節する目的で肝臓（例えば、LSEC）を標的とすることにより、免疫寛容の誘導における満たされていない必要性に取り組むものである。免疫応答の誘発における肝臓の重要な役割にもかかわらず、肝臓の寛容原性の性質は研

50

究中である。肝臓の寛容原の役割についての最初の報告は、移植におけるものであった。移植された肝臓が、免疫抑制の非存在下で、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の障壁を越えて許容されることが見出された (Calne et al., 1969)。その後、門脈への同種細胞の注入が、同種抗原に対する寛容をもたらすことが見出された (Qian et al., The Journal of Immunology, 1985; Fujiwara et al., The Journal of Immunology, 1986; Yamamoto et al., Immunobiology, 1997)。他の研究により、門脈に注入された抗原は寛容を誘導するが、全身循環に注入された抗原は寛容を誘導しないことが見出された (Cantor and Dumont, Nature 215:744-45, 1967)。このように、ある特定の状況下では免疫系は生産的な免疫応答を開始し、他の状況下では免疫系を寛容化するようである。

【 0 0 1 0 】

LSECは免疫と寛容の二分に關与する。LSECは、エンドサイトーシスにおいて極めて効率的であることが示されている (Magnusson and Berg, Biochem. J. 257:651-56, 1989)。この細胞は、MHCクラスIIおよび共刺激分子を含む、T細胞活性化に必要な成分を発現する (Lohse et al., Gastroenterology 110:1175-81, 1996)。LSECは、抗原をプロセッシングしてCD4+ T細胞に提示することができるが、抗原をCD8 T細胞に交差提示することもでき、この能力は通常であれば樹状細胞およびマクロファージのサブセットでのみ記載されているものである (Knolle et al., Gastroenterology 116:1428-40, 1999; Limmer et al., Nat. Med. 6:1348-54, 2000)。LSECは、生産的な免疫応答を開始することを可能にするToll様受容体 (TLR) を発現する。種々の病原体関連分子パターンによる刺激を受けると、LSECは、インターフェロンベータ、インターロイキン6、およびインターロイキン12などの免疫原性サイトカインを産生することができ、CD8+ T細胞を活性化し、かつ肝臓におけるB型肝炎ウイルスの複製を制御することができる (Wu et al. Immunology 129:363-74, 2010; Martin-Armas et al. J. Hepatol. 44:939-46, 2006; Wu et al. Hepatology 46:1769-78, 2007; Liu et al. J. Immunol. 191:6178-90, 2013)。LSECはまた、マンノース受容体、FCRIIb、およびLSECtinなどの種々のエンドサイトーシス受容体を発現する (Magnusson and Berg, Biochem. J. 257:651-56, 1989; Mousavi et al. Hepatology 46:871-84, 2007; Liu et al. J. Biol. Chem. 279:18748-58, 2004)。前者の2つは、エンドソーム区画への輸送を媒介し、抗原提示をもたらすことが示されており、エンドサイトーシスを媒介するその役割を考えると、LSECtinも抗原提示において同様の機能を有すると仮定するのが妥当である (Mousavi et al. Hepatology 46:871-84, 2007; Liu et al. J. Biol. Chem. 279:18748-58, 2004)。逆に、過剰な危険シグナルが存在しない状況下では、LSECは、抗原を提示および交差提示して、CD4+制御性T細胞およびCD8+ T細胞欠失を効率的に誘導することが示されている (Limmer et al. Nat. Med. 6:1348-54, 2000; Kruse et al. Hepatology 50:1904-13, 2009)。LSECが実際に、インビボで樹状細胞が免疫を誘導するのを阻止し得ることがさらに示されている (Schildberg et al. Eur. J. Immunol. 38:957-67, 2008)。

【 0 0 1 1 】

本明細書に開示されているように、上記の問題に対する解決策は、例えば、LSECtinを標的とするための本明細書に記載される様々な組成物および方法によって提供される。LSECは、肝臓においてLSECtinを発現する唯一の細胞であると考えられている (Liu et al. J. Biol. Chem. 279:18748-58, 2004)。LSECtinは、マンノースおよびN-アセチルグルコサミンと結合し得るスカベンジャー受容体であり、抗原の迅速な内部移行を誘発する。抗原は、全身投与されると迅速に肝臓に送達されるため、いくつかの態様では、LSECtinに向けられた抗原は、肝臓を裏打ちする多くのLSECによって独占的に貪食され得、この抗原は循環T細胞に効率的に提示される。本明細書に記載される態様の前は、抗原提示のこの経路が、生産的な免疫をもたらすのか、または寛容原性免疫をもたらすのかは不明であった。抗原特異的な寛容を誘導するための新たな方法、組成物、およびそれらの使用をもたらす、寛容原性免疫を誘導するためのLSECtinへの抗原の標的指向が、本明細書に記載される。

【 0 0 1 2 】

いくつかの態様において、抗原特異的寛容を誘導するための組成物であって、肝類洞内皮細胞C型レクチン（LSEctin）結合部分を構成する、LSEctinに結合する結合部分と、寛容が所望される抗原とを含む組成物が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、LSEctin結合部分はヒトLSEctinに特異的である。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、1つまたは複数の付加的な種と交差反応する。例えば、1つの態様において、LSEctin結合部分は、霊長類（カニクイザル）およびヒトLSEctinの両方に結合する。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、SISSYY（SEQ ID NO:100）のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域（CDRH）を含む。いくつかの態様では、寛容が所望される抗原は全長抗原を含み、いくつかの態様では、抗原は、1つもしくは複数の抗原、または1つもしくは複数の抗原の1つもしくは複数の断片を含む。いくつかの態様において、寛容が所望される抗原は、LSEctin結合部分に共有結合されるか、またはリンカーを介してLSEctin結合部分に結合される。いくつかの態様においては、対象が単独の抗原に曝露されると、対象は、望ましくない免疫応答によって単独の抗原に反応する。しかしながら、本明細書において開示されるように、対象が本明細書において開示される組成物に曝露されると、対象は、抗原へのその後の曝露に対する免疫応答が低下する。

10

20

30

40

50

【0013】

対象において特定の抗原に対する寛容を誘導するための方法であって、LSEctinに結合する結合部分と、寛容が所望される抗原とを含む組成物を、対象に投与する段階を含む方法もまた、本明細書において提供される。本明細書において論じられるように、いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、SISSYY（SEQ ID NO:100）のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域（CDRH）を含む。いくつかの態様において、LSEctin結合部分はヒトLSEctinに特異的である。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、1つまたは複数の付加的な種と交差反応する。例えば、1つの態様において、LSEctin結合部分は、霊長類（カニクイザル）およびヒトLSEctinの両方に結合する。いくつかの態様では、寛容が所望される抗原は全長抗原を含み、いくつかの態様では、抗原は、1つもしくは複数の抗原、または1つもしくは複数の抗原の1つもしくは複数の断片を含む。いくつかの態様において、寛容が所望される抗原は、LSEctin結合部分に共有結合されるか、またはリンカーを介してLSEctin結合部分に結合される。いくつかの態様においては、対象が単独の抗原に曝露されると、対象は、望ましくない免疫応答によって単独の抗原に反応する。しかしながら、本明細書に開示される方法および使用によると、本明細書において開示される組成物を対象に投与すると、抗原に対して抗原特異的寛容が生じ、結果として、対象は、抗原へのその後の曝露に対する免疫応答が低下する。

【0014】

いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、LSEctin特異的抗体またはLSEctin特異的抗体の断片である。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、LSEctin特異的抗体の断片、例えばscFvまたはFabである。CDRHに加えて、いくつかの態様では、LSEctin結合部分は、SSIのアミノ酸配列を含む付加的なCDRHをさらに含む。いくつかの態様において、CDRHはSISSYYX₃YTX₄（SEQ ID NO:68）のアミノ酸配列を含み、付加的なCDRHはX₁SX₂SSI（SEQ ID NO:67）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様においては、SEQ ID NO:67または68のものと少なくとも約80%の配列同一性を有するCDRHが使用される。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、少なくとも第3のCDRHおよび軽鎖相補性決定領域（CDRL）をさらに含む。いくつかの態様において、CDRHはSISSYYGYTY（SEQ ID NO:59）のアミノ酸配列を含み、付加的なCDRHはLSSSSI（SEQ ID NO:55）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、SYWYPV（SEQ ID NO:51）のアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域（CDRL）、またはSEQ ID NO:51と少なくとも約80%の配列同一性を有するCDRLをさらに含む。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、NDDWYIWDWYYTRWYGL（SEQ ID NO:63）

のアミノ酸配列を有する少なくとも第3のCDRH、またはSEQ ID NO:63と少なくとも約80%の配列同一性を有する第3のCDRHをさらに含む。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、1つまたは複数の付加的なCDRLをさらに含む。

【 0 0 1 5 】

いくつかの態様において、CDRHはSISSYYSYTS (SEQ ID NO:12) のアミノ酸配列を含み、付加的なCDRHはVSYSSI (SEQ ID NO:9) のアミノ酸配列を含み、またはSEQ ID NO:12もしくは9と少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチド。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、YLAYQSPL (SEQ ID NO:4) のアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域 (CDRL)、またはSEQ ID NO:4と少なくとも約80%の配列同一性を有するCDRLをさらに含む。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、

YEEWAYYSSEMAF (SEQ ID NO:18)

のアミノ酸配列を有する少なくとも第3のCDRH、またはSEQ ID NO:18と少なくとも約80%の配列同一性を有する第3のCDRHをさらに含む。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、1つまたは複数の付加的なCDRLをさらに含む。

10

【 0 0 1 6 】

いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、親和性成熟しているか、または親和性成熟作戦に供される。いくつかの態様において、CDRHおよび/またはCDRL配列はヒト化される。

【 0 0 1 7 】

態様に応じて、寛容が所望される抗原は変動し得る。例えば、いくつかの態様において、抗原 (または断片、もしくは断片の組み合わせ) は、多発性硬化症、セリアック病、および/または1型糖尿病のうちの1つまたは複数に関連している。

【 0 0 1 8 】

いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:26の一部を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:27の一部を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:28の一部を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:26の一部、およびSEQ ID NO:27の一部、および/またはSEQ ID NO:28の一部を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:69を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:70、またはそれと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:71を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:75、またはそれと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:72を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:76、またはそれと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:73を含むポリペプチド、またはそれと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチド、およびSEQ ID NO:35、またはそれと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:26の一部、SEQ ID NO:27の一部、およびSEQ ID NO:28の一部を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、およびSEQ ID NO:72のうちの1つもしくは複数を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:35、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、もしくはSEQ ID NO:72のいずれかと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、およびSEQ ID NO:35のうちの1つもしくは複数を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、もしくはSEQ ID NO:35のいずれかと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、およびSEQ ID NO:72のうちの1つもしくは複数を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:35、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、もしくはSEQ ID NO:72のいずれかと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SE

20

30

40

50

Q ID NO:34、およびSEQ ID NO:35のアミノ酸配列のうちの1つまたは複数を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:29のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:30のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:31のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:32のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:33のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:34のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:35のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:42もしくはSEQ ID NO:43のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:42もしくはSEQ ID NO:43のいずれかと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、もしくはSEQ ID NO:79のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、もしくはSEQ ID NO:79のいずれかと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:23の一部を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:23の一部およびSEQ ID NO:80の一部を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95、およびSEQ ID NO:96からなる群より選択される1つもしくは複数のポリペプチド、またはSEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95、もしくはSEQ ID NO:96のいずれかと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗原は、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、およびSEQ ID NO:90からなる群より選択される1つもしくは複数のポリペプチド、またはSEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、もしくはSEQ ID NO:90のいずれかと少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【0019】

いくつかの態様において、抗原は、高分子量グルテニン；低分子量グルテニン；アルファ-、ガンマ-、およびオメガ-グリアジン；ホルデイン；セカリン；アベニン；抗原のいずれかの一部、ならびに抗原のいずれかの模倣物のうちの1つまたは複数を含む。

【0020】

いくつかの態様において、抗原は、グリアジン、グリアジンの一部、および抗原のいずれかの模倣物のうちの1つまたは複数を含む。

【0021】

いくつかの態様において、抗原は、インスリン、プロインスリン、プレインスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ65 (GAD-65)、GAD-67、インスリノーマ関連タンパク質2 (IA-2) およびインスリノーマ関連タンパク質213 (IA-213)、ICA69、ICA12 (SOX-13)、カルボキシペプチダーゼH、Imogen 38、GLIMA 38、クロモグラニン-A、HSP-60、カボキシペプチダーゼE、ペリフェリン、2型グルコース輸送体、肝細胞癌-腸-膵臓/膵臓関連タンパク質、S100、グリア線維酸性タンパク質、再生遺伝子II、膵臓十二指腸ホメオボックス1、筋強直性ジストロフィーキナーゼ、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質、SST Gタンパク質共役受容体1~5、ならびに抗原のいずれかの一部、および抗原のいずれかの模倣物のうちの1つまたは複数を含む。

【0022】

いくつかの態様において、抗原は、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、およびプロテオリピドタンパク質、抗原のいずれかの一部、ならびに抗原のいずれかの模倣物のうちの1つまたは複数を含む。

【0023】

いくつかの態様において、抗原は、アブシキシマブ、アダリムマブ、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ、アルデスルキン (Aldeslukin)、アルグルコシダーゼア

ルファ、第VIII因子、第IX因子、インフリキシマブ、L-アスパラギナーゼ、ラロニダーゼ、ナタリズマブ、オクトレオチド、フェニルアラニンアンモニアラーゼ（PAL）、またはラスプリカーゼ（ウリカーゼ）、抗原のいずれかの一部、および抗原のいずれかの模倣物のうちの1つまたは複数を含む。

【0024】

いくつかの態様において、抗原は、MHCクラスIおよびMHCクラスIIハプロタイプタンパク質の1つまたは複数のサブユニット、ならびに少数の血液型抗原、RhCE、Kell、Kidd、Duffy、およびSsを含む。

【0025】

いくつかの態様において、抗原は、インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、抗原のいずれかの寛容原性部分、または抗原のいずれか1つの模倣物のうちの1つまたは複数を含む。

10

【0026】

本明細書において開示される寛容原性化合物を対象に投与する段階を含む、対象において特定の抗原に対する寛容を誘導する方法もまた、本明細書において提供される。多発性硬化症に関連する抗原を、対象の多発性硬化症を処置するための組成物および方法において使用することができる。セリアック病に関連する抗原を、対象のセリアック病を処置するための組成物および方法において使用することができる。食物アレルギーに関連する抗原を、対象の食物アレルギーを処置するための組成物および方法において使用することができる。1型糖尿病に関連する抗原を、対象の1型糖尿病を処置するための組成物および方法において使用することができる。

20

【0027】

対象において特定の抗原に対する寛容を誘導するための、本明細書において開示される化合物の使用もまた、本明細書において提供される。対象において特定の抗原に対する寛容を誘導するための医薬を調製するための、本明細書において開示される化合物の使用もまた、本明細書において提供される。

【0028】

ある特定の態様は、LSEctinと特異的に結合するLSEctin結合部分を対象とする。ある特定の局面において、LSEctin結合部分は、LSEctinに特異的に結合する抗体、LSEctin結合断片（例えば、Fab）、または抗体の一部（例えば、CDR）である。いくつかの態様において、LSEctin結合部分は、抗原をLSECに送達する目的で、抗原に機能的に結合される。態様に応じて、1つの抗原（もしくは複数の抗原）、抗原の断片（例えば、抗原の免疫原性部分）、および/または抗原のミモトープを、精製形態、またはエキソソーム、細胞断片、もしくは細胞などの細胞由来の形態のいずれかで、LSEctin結合部分（例えば、LSEctin結合抗体またはそのLSEctin結合断片）に機能的に連結して、LSEC標的を指向する複合体を形成することができる。LSEC標的を指向する複合体は、LSEC標的を指向する複合体中に含まれかつLSECに送達される抗原に対して、免疫寛容を誘導するために使用することができる。

30

【0029】

特定の態様において、抗体または抗体断片などのLSEctin結合部分（LBM）は、抗原Xにコンジュゲートされて、式 [A-B-X] を有するLBM複合体を形成し、式中、AはLSEctin結合部分であり；Bは任意のリンカーであり；およびXは、外来の移植片抗原もしくは同種抗原もしくは自己免疫抗原、または任意のそのような抗原の断片である。いくつかの態様において、抗原は、移植レシピエントまたは自己免疫患者などの対象がそれに対して望ましくない免疫応答を生じる抗原（または断片）であってよい。いくつかの態様において、抗原は、移植レシピエントまたは自己免疫患者がそれに対して望ましくない免疫応答を生じる同種抗原を含む外来の細胞外小胞、細胞断片、または細胞であってよい。なおさらなる態様において、抗原は、患者がそれに対して望ましくない免疫応答を生じる外来の食物、動物、植物、もしくは環境抗原（またはその断片）であってよい。ある特定の局面において、抗原は、患者がそれに対して望ましくない免疫応答を生じる外来の治療剤（またはその

40

50

断片)であってよい。さらなる側面において、抗原は、患者がそれに対して望ましくない免疫応答を生じる合成自己抗原(またはその断片)であってよい。いくつかの態様において、抗原は、より大きな抗原の寛容原性(例えば、免疫原性)部分であってよい。ある特定の態様において、抗原または抗原部分は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、もしくは500アミノ酸長(もしくはその中で導出可能な任意の範囲)であるか、少なくともそのようなアミノ酸長(もしくはその中で導出可能な任意の範囲)であるか、または多くともそのようなアミノ酸長(もしくはその中で導出可能な任意の範囲)である。いくつかの態様において、抗体または抗体断片などのLSEctin結合部分(LBM)は、複数の抗原または抗原断片(例えば、X1、X2、X3、Xn)にコンジュゲートされて、式[A-B-X1-B-X2-B-X3-B-Xn]を有するLBM複合体を形成し、式中、AはLSEctin結合部分であり;Bは任意のリンカーであり;ならびにX1、X2、X3、およびXnは、本明細書において開示される抗原である。態様に応じて、X1、X2、X3等は、同じ抗原であってもよいし、または異なる抗原であってもよい。加えて、X1、X2、X3、等は、関心対象の抗原の異なる部分、例えば、関心対象のより大きな抗原の第1、第2、および第3の免疫原性領域(いくつかの態様では重複する)に由来する断片であってよい。

【0030】

本明細書で用いられる場合、「抗原結合分子(ABM)」は、抗原のエピトープまたは一部への特異的結合をもたらす抗体可変領域を含む分子、特に抗体などのタンパク質に関連している。抗体可変領域は、例えば、完全な抗体、抗体断片、および抗体または抗体断片の組換え誘導体または類似体中に存在し得る。抗体の「抗原結合断片」(または「結合部分」という用語は、本明細書で用いられる場合、抗原と特異的に結合する能力を保持す

る、抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体可変領域を含む抗原結合断片には、「Fv」、「Fab」、および「F(ab')₂」領域、「単ドメイン抗体(sdAb)」、「ナノボディ」、「一本鎖Fv(scFv)」断片、「タンデムscFv」(V_HA-V_LA-V_HB-V_LB)、「ダイアボディ」、「トリアボディ」または「トリボディ」、「一本鎖ダイアボディ(scDb)」、ならびに「二重特異性T細胞誘導(BiTE)」が含まれるが、これらに限定されない。抗原結合分子はまた、ラクダ抗体などの非ヒト起源の抗体であってもよい。ある特定の態様において、抗原結合分子は完全な抗体ではなく、全長よりも小さい。ある特定の態様において、抗原結合分子はヒト化抗原結合分子である。

【0031】

ある特定の態様において、LSEctin結合部分は、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、もしくは500アミノ酸長(もしくはその中で導出可能な任意の範囲)であるか、少なくともそのようなアミノ酸長(もしくはその中で導出可能な任意の範囲)であるか、または多くともそのようなアミノ酸長(もしくはその中で導出可能な任意の範囲)である。

【0032】

いくつかの態様において、リンカーは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100個のアミノ酸(もしくはその中で導出可能な任意の範囲)であるか、少なくともそのようなアミノ酸(もしくはその中で導出可能な任意の範囲)であるか、または多くともそのようなアミノ酸(もしくはその

中で導出可能な任意の範囲)である。特定の態様において、リンカーは、合成リンカーであり得る。

【0033】

他の態様において、ポリペプチド、例えばLSEctin標的を指向する複合体のすべてまたは一部をコードする核酸が存在する。さらなる態様において、該核酸は、プラスミドまたはベクターまたは発現構築物中に存在する。付加的な態様において、該核酸は組換え宿主細胞中に存在する。

【0034】

本発明の他の態様は、本出願の全体を通して論じられる。1つの局面に関して論じられたいずれの態様も、同様に他の局面に当てはまり、その逆もまた同様である。本明細書に記載される各態様は、すべての局面に適用可能な態様であると理解される。本明細書において論じられるいずれの態様も、いずれの方法または組成物に関しても実行することができ、その逆もまた同様であることが企図される。さらに、組成物およびキットを使用して、本明細書において開示される方法を達成することができる。

10

【0035】

数値に関連して使用される場合の「約」という用語は、典型的には例えば表示の数値よりも5~10%小さい下限を有し、かつ例えば表示の数値よりも5~10%大きい上限を有する範囲内の数値を包含することを意味する。

【0036】

「含む(including)」、「含有する」、または「特徴づけられる」と同義である「含む(comprising)」という用語は、包括的または非限定的であり、付加的な列挙されていない要素も方法段階も除外しない。「~からなる」という語句は、明記されていないいかなる要素、段階、または成分も除外する。「本質的に~からなる」という語句は、記載される主題の範囲を、明記されている材料または段階、ならびにその基本的かつ新規な特徴に著しく影響を及ぼさないものに限定する。

20

【0037】

「化学修飾」は、ポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸の天然に存在する化学構造における変化を指す。そのような修飾は、側鎖または末端に対して行い、例えばアミノ末端またはカルボキシル末端を変更することができる。いくつかの態様において、修飾は、ポリペプチドを他の材料に連結させるかまたは治療剤に付着させるために簡便に使用され得る化学基を作るのに有用である。

30

【0038】

「保存的变化」は、一般に、活性を変化させずにアミノ酸配列に対して行うことができる。これらの変化は、「保存的置換」または変異と称され；すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の群に属するアミノ酸を、別のアミノ酸に対して置換することができる。アミノ酸配列に対する置換物は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択することができる。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、およびチロシンが含まれる。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。正荷電(塩基性)アミノ酸には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが含まれる。負荷電(酸性)アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。そのような置換は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または等電点によって決定される見かけの分子量に実質的に影響を及ぼさないと予測される。保存的置換には、配列の光学異性体を他の光学異性体に対して置換すること、具体的には配列の1つまたは複数の残基についてdアミノ酸をlアミノ酸に対して置換することもまた含まれる。さらに、配列中のアミノ酸のすべてが、d異性体からl異性体への置換を受けてもよい。例示的な保存的置換には、正電荷を維持するArgに対するLysおよびその逆；負電荷を維持するAspに対するGluおよびその逆；遊離-OHを維持するためのThrに対するSer；ならびに遊離-NH₂を維持するAsnに対するGlnが含まれるが、これらに限定されない。化学誘導体化が必要となる場合には、保存的置換のさらに別のタイ

40

50

ブは、所望の化学反応性を有するアミノ酸が化学的コンジュゲーション反応のための反応部位を付与するために導入される場合を構成する。そのようなアミノ酸には、Cys（スルフィドリル基を挿入する）、Lys（第一級アミンを挿入する）、AspおよびGlu（カルボン酸基を挿入する）、またはケトン、アジド、アルキン、アルケン、およびテトラジン側鎖を含む特殊な非標準アミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。遊離-NH₂または-SHを有するアミノ酸の保存的置換または付加は、Fabの抗原または小胞への化学的コンジュゲーションのために特に有利であり得る。さらに、ポリペプチド配列または対応する核酸配列の点変異、欠失、および挿入は、場合によっては、ポリペプチドまたは核酸断片の機能を失うことなく作製され得る。置換は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50個、またはそれ以上の残基（列挙された数の間の任意の数の置換を含む）を含み得る。ある特定の態様において使用可能な変種は、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列において、例えば500個のアミノ酸またはヌクレオチド当たり、100個まで（例えば、列挙された数の間の任意の数を含め、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個まで）の総数の変化（例えば、交換、挿入、欠失、N末端切断、および/またはC末端切断）を示してもよい。いくつかの態様において、変化の数は、ポリペプチドの所望の特徴（例えば、機能または抗原性の性質）を維持しながら、100よりも多い。加えて、いくつかの態様において、変種は、参照（例えば、未改変または天然の配列）とある程度の機能的同等性を示すポリペプチド配列または対応する核酸配列を含む。いくつかの態様において、変種は、未改変または天然の参照配列と約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%の機能的同等性（および、終点を含め、列挙された程度の間の任意の程度の機能的同等性）を示す。本明細書に記載されるアミノ酸残基は、標準ポリペプチド命名法に沿って、一文字アミノ酸表記または三文字略称のいずれかを用いる。アミノ酸残基配列はすべて、本明細書において、アミノ末端からカルボキシ末端への従来の方角で左右配向を有する式によって表される。

10

20

30

40

50

【0039】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、そのような処置を必要とする哺乳動物に投与された場合に、本明細書において規定される処置を達成するのに十分である本開示の組成物の量を指す。この量は、処置される対象および疾患状態、対象の体重および年齢、疾患状態の重症度、選択された本開示の特定の組成物、従うべき投与計画、投与のタイミング、投与の様式、および同様のものに応じて変動し、それらのすべては当業者により容易に決定され得る。

【0040】

様々な置換成分に関して提供される「数値」および「範囲」は、列挙された範囲内のすべての整数を包含するように意図される。例えば、約1~100を含む混合物であって、典型的に $n \pm$ 約10%（または、1~約25のより小さな整数については、 ± 3 ）として特定される整数を包含する混合物を表す整数として n を規定する場合、 n は、約1~100の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、25、30、34、35、37、40、41、45、50、54、55、59、60、65、70、75、80、82、83、85、88、90、95、99、100、105、もしくは110、または列挙されたものの間のいずれか）であり得ることが理解されるべきである。「約」および「 $\pm 10\%$ 」または「 ± 3 」という併用の用語は、どこで使用されても同等の範囲への特定の支持を開示および提供すると理解されるべきである。

【0041】

「任意の」または「任意に」という用語は、その後に記載される事象または状況が起こってもまたは起こらなくてもよいこと、ならびにその記載が、該事象または状況が起こる場合およびそれが起こらない場合を含むことを意味する。

【0042】

特定の標的と特異的に結合するペプチド、タンパク質、または断片は、その標的の「リガンド」と称される。

【0043】

「ポリペプチドは」、翻訳後修飾（例えば、リン酸化もしくはグリコシル化）、ならびに/または付加的なポリペプチドとの複合体形成、ならびに/または核酸および/もしくは炭水化物、もしくは他の分子との多サブユニット複合体への合成にかかわらず、アミノ酸残基の鎖を指す用語である。したがって、プロテオグリカンも本明細書ではポリペプチドと称される。長いポリペプチド（約50個を超えるアミノ酸を有する）は、「タンパク質」と称される。短いポリペプチド（約50個よりも少ないアミノ酸を有する）は、「ペプチド」と称される。サイズ、アミノ酸組成、および三次元構造に応じて、ある特定のポリペプチドは、「抗原結合分子」、「抗体」、「抗体断片」、または「リガンド」と称され得る。ポリペプチドは、多くの方法によって生成することができ、その多くは当技術分野で周知である。例えば、ポリペプチドは、抽出によって（例えば、単離された細胞から）、ポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって、または化学合成によって得ることができる。ポリペプチドは、例えば、組換え技術、およびコードされるポリペプチドの発現のために（例えば、形質転換またはトランスフェクションによって）宿主細胞に導入された、ポリペプチドをコードする発現ベクターによって生成することができる。

10

【0044】

本明細書で用いられる場合、「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」には、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、ならびに同様のものが含まれる。いくつかの態様において、これらの媒質および薬剤は、薬学的に活性のある物質と組み合わせて使用することができる。任意の従来媒質または薬剤が活性成分と適合しない場合を除き、治療組成物におけるその使用が企図される。補足的な活性成分を、組成物中に組み込むこともできる。

20

【0045】

ポリペプチドに関して本明細書で用いられる「精製された」という用語は、化学的または生物学的に合成され、したがって実質的に他のポリペプチドが混入していないか、または天然で付随している他の大部分の細胞成分（例えば、他の細胞タンパク質、核酸、もしくは脂質膜などの細胞成分）から分離または単離されたポリペプチドを指す。精製ポリペプチドの一例は、乾燥重量で少なくとも70%が、天然で会合しているタンパク質および天然有機分子を含まないものである。したがって、精製ポリペプチドの調製物は、例えば、乾燥重量で少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも99%がポリペプチドであり得る。ポリペプチドはまた、精製または標識（例えば、親和性マトリックス上への捕捉、顕微鏡下での可視化）を容易にするタグ配列（例えば、ポリヒスチジンタグ、mycタグ、FLAG（登録商標）タグ、SNAP（登録商標）タグ、または他の親和性タグ）を含むように操作することもできる。したがって、ポリペプチドを含む精製組成物は、特に指示のない限り、精製ポリペプチドを指す。「単離された」という用語は、本開示のポリペプチドまたは核酸がそれらの天然環境中に存在しないことを示す。したがって、本開示の単離された産物は、培養上清中に含有され、部分的に濃縮され、異種供給源から産生され、ベクター中にクローニングされ、または媒体と共に製剤化、等され得る。

30

【0046】

「配列同一性」という用語は、ポリペプチド配列の比較に関して用いられる。この表現は特に、例えばそれぞれの参照ポリペプチドもしくはそれぞれの参照ポリヌクレオチドと少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%といった、配列同一性の割合を指す。特に、当該ポリペプチドと参照ポリペプチドは、20、30、40、45、50、60、70、80、90、100個、もしくはそれ以上のアミノ酸の連続したひと続きにわたって、または参照ポリペプチドの全長にわたって、表示の配列同一性を示す。

40

【0047】

この用語が生物学の分野で一般に使用される場合の「特異的結合」は、非標的と比較し

50

て相対的に高い親和性で標的に結合する分子を指し、一般に、静電相互作用、ファンデルワールス相互作用、水素結合、および同様のものなどの複数の非共有結合性相互作用を伴う。特異的結合相互作用は、抗体-抗原結合、酵素-基質結合、およびある特定のタンパク質-受容体相互作用を特徴づける；そのような分子は、時々その特異的標的以外の組織と結合する場合があるが、そのような非標的結合が取りに足りない限りにおいて、高親和性の結合対は、依然として特異的結合の定義の範囲に入り得る。

【0048】

「処置」または「処置する」という用語は、以下を含む、哺乳動物における疾患または障害の任意の処置を意味する：疾患もしくは障害を予防するもしくは防ぐこと、すなわち、臨床症状が発症しないようにすること；疾患もしくは障害を阻害すること、すなわち、臨床症状の発症を停止するもしくは抑制すること；ならびに/または疾患もしくは障害を緩和すること、すなわち、臨床症状の退行を引き起こすこと。

10

【0049】

「望ましくない免疫応答」という用語は、所与の状況において望ましくない、対象の免疫系による反応を指す。そのような反応が疾患または障害の予防、軽減、または治癒をもたらさず、代わりに障害または疾患を引き起こす、増強する、または悪化させる場合、免疫系の反応は望ましくない。典型的には、免疫系の反応が不適切な標的に対して向けられる場合、それは疾患を引き起こす、増強する、または悪化させる。非限定的な例として、望ましくない免疫応答には、移植片拒絶反応、治療剤に対する免疫応答、自己免疫疾患、およびアレルギーまたは過敏症が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0050】

「変種」という用語は、その長さ、配列、または構造における1つまたは複数の変化により、その由来元のタンパク質と比較して異なるタンパク質として理解されるべきである。タンパク質変種の由来元のポリペプチドは、親ポリペプチド、または該ポリペプチドを遺伝的にコードするポリヌクレオチドとしても公知である。「変種」という用語は、親分子の「断片」または「誘導体」を含む。典型的には、「断片」は、長さまたはサイズが親分子よりも小さく、「誘導体」は、親分子と比較してその配列または構造において1つまたは複数の違いを示す。これらに限定されないが、翻訳後修飾タンパク質（例えば、グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、パルミトイル化、またはタンパク質分解切断タンパク質）、およびメチル化DNAのような修飾核酸などの修飾分子もまた包含される。これに限定されないがRNA-DNAハイブリッドなどの異なる分子の混合物もまた、「変種」という用語により包含される。天然に存在するおよび人工的に構築された変種は、本明細書で用いられる「変種」という用語により包含されると理解されるべきである。さらに、いくつかの態様において使用可能な変種はまた、変種が親分子の少なくとも1つの生物学的活性を示す、すなわち機能的に活性があるという条件で、親分子の相同体、オルソログ、もしくはパラログ、または人工的に構築された変種に由来してもよい。変種は、その由来元の親ポリペプチドとのある特定の配列同一性の程度により特徴づけられ得る。より正確には、本開示の文脈におけるタンパク質変種は、その親ポリペプチドと少なくとも80%の配列同一性を示し得る。いくつかの態様において、タンパク質変種の配列同一性は、20、30、40、45、50、60、70、80、90、100個、またはそれ以上のアミノ酸の連続したひと続きにわたる。上述のように、いくつかの態様において、変種は、未改変または天然の参照配列と約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%の機能的同等性（および、列挙された程度の間の任意の程度の機能的同等性）を示す。

30

40

【0051】

「機能的に連結される」という用語は、標的部位において結合する前に、2つの成分が組み合わされて活性複合体を形成する状況を指す。例えば、ビオチン-ストレプトアビジン複合体のうちの片方にコンジュゲートされた分子と、ビオチン-ストレプトアビジン複合体のもう片方にコンジュゲートされた抗原は、ビオチン分子とストレプトアビジン分子の複合体形成により機能的に連結される。機能的に連結されるという用語はまた、2つの分子を共にコンジュゲートさせる共有結合または化学結合を指すことも意図される。

50

【0052】

特許請求の範囲および/または本明細書において「含む」という用語と共に用いられる場合の「1つの(a)」または「1つの(an)」という単語の使用は、「1つ」を意味し得るが、それはまた、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは2つ以上」の意味と一致する。

【0053】

本出願の全体を通じて、「約」という用語は、値が、その値を決定するために用いられた装置または方法に関する誤差の標準偏差を含むことを示すために用いられる。

【0054】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物のみを指すように明記されている場合、または代替物が相互に排他的である場合を除いて、「および/または」を意味するために用いられるが、本開示は代替物のみならびに「および/または」を指す定義を支持する。

10

【0055】

本明細書および特許請求の範囲において用いられる場合、「含む(comprising)」(ならびに「含む(comprise)」および「含む(comprises)」などの、含む(comprising)の任意の形態)、「有する(having)」(ならびに「有する(have)」および「有する(has)」などの、有する(having)の任意の形態)、「含む(including)」(ならびに「含む(contains)」および「含む(include)」などの、含む(including)の任意の形態)、または「含有する(containing)」(ならびに「含有する(contains)」および「含有する(contain)」などの、含有する(containing)の任意の形態)という単語は、包括的または非制限的であり、付加的な列挙されていない要素も方法段階も除外しない。

20

【0056】

本明細書において開示される態様のその他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本開示の精神および範囲の範囲内の様々な変更および修正が、この詳細な説明から当業者に明らかとなると考えられるため、詳細な説明および具体例は、具体的な態様を示しながら、例示として与えられているに過ぎないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0057】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、開示される態様のある特定の非限定的な局面をさらに実証するために含めるものである。そのような態様は、本明細書において提示された明細書態様の詳細な説明と併せてこれらの図面の1つまたは複数を参照することにより、よりよく理解することができる。

30

【図1】ファージディスプレイに用いられたKingFisherプレートのレイアウト。最初の行は、ストレプトアビジンビーズ(Dynabeads)と、第2、第3、第4、および第5ラウンドのディスプレイに対応する300 nM、150 nM、75 nM、または20 nMピオチン化LSECtin変種を含んでいた。次のウェル行は、潜在的なSNAP結合体を除去するために、ファージおよび2 μMピオチン化SNAPタンパク質を含有した。次の行は、ストレプトアビジンビーズ上のピオチン部位を飽和させるための1 μMピオチン含有した。次の4つの行は、洗浄するための1 μM SNAP含有した。最後の行は、ファージを溶出させるためにトロンピンを含有した。すべての段階でTBS + 10 mM CaCl₂を含んでいた。

40

【図2】ファージディスプレイからのFabヒット。LSECtinの3つの変種のそれぞれに対するディスプレイからのおよそ96個の単一ファージを配列決定した後、収束する多くの配列が同定された。選択された配列のCDRL3、CDRH1、CDRH2、およびCDRH3を、スクリーニングにおいて同じ配列が何回出現したかと共に、図2に提供する。SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、またはSEQ ID NO:7のアミノ酸配列を有するCDRL3; SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、またはSEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有するCDRH1; SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、またはSEQ ID NO:16のアミノ酸配列を有するCDRH2; およびSEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18(省略表記法で「YEE」と

50

も称される)、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、またはSEQ ID NO:22のアミノ酸配列を有するCDRH3。SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、またはSEQ ID NO:54のアミノ酸配列を有するCDRL3; SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、またはSEQ ID NO:58のアミノ酸配列を有するCDRH1; SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、またはSEQ ID NO:62のアミノ酸配列を有するCDRH2; およびSEQ ID NO:63 (省略表記で「A1A1」とも称される)、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、またはSEQ ID NO:66のアミノ酸配列を有するCDRH3。

【図3】ストレプトアビジンポリスチレンビーズ上に固定化されたLSECtinへのFab結合に関するフローサイトメトリーデータ。SNAP-LSECtinをビオチン化し、アビジンポリスチレンビーズに結合させた。Fabを添加し、抗F(ab')₂二次抗体で検出した。点線は無関係の抗体であり、実線はFabを含むYEE (SEQ ID NO:18)である。

10

【図4A】Fab配列。抗LSECtin Fabの非限定的な態様の完全な配列。(A)は、YEEと称されるFab由来の選択されたCDR配列を示す。

【図4B】Fab配列。抗LSECtin Fabの非限定的な態様の完全な配列。(B)は、A1A1と称されるFab由来の選択されたCDR配列を示す。

【図5】初代マウスLSECに対するFab結合のフローサイトメトリー。(A)肝細胞を上記のように単離し、LSECを特異的に同定するのに十分なマーカーであるCD31およびスタビリン2で染色した。(B)FabはLSECに結合したが、単離された他の細胞集団には結合しなかった。

【図6】ELISA。LSECtinへのFab結合に関する酵素結合免疫吸着アッセイ

20

【図7】肝臓切片への抗LSECtin Fab結合の免疫蛍光検査。(A)スタビリン2およびA1A1で染色し、60×倍率で画像化したマウス切片。(B)A1A1で染色し、20×倍率で画像化したマウス切片。(C)A1A1で染色し、60×倍率で画像化したサル切片。

【図8】抗LSECtin Fabの取り込み解析。(A)Fabを重鎖上のmCherryと共に組換えにより発現させた。Fab-mCherryをLSECに4で20分間添加し、洗浄して過剰のFabを除去した。LSECを37でインキュベートしてエンドサイトーシスを可能にし、続いて抗Fab抗体で染色した。(B)LSECをA1A1-mCherryまたは無関係のFab-mCherryと共に37で2時間インキュベートし、mCherryの蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。

【図9】インビボにおける抗LSECtin Fabの生体内分布。25 μgのFab-800をインビボで注射し、(A)24時間にわたりヌードマウスにおいて蛍光を測定した (IVIS, Perkin Elmer)。(B)LSECによる特異的な取り込みを測定するために、Fabを蛍光色素DY-649 (Dyomics)にコンジュゲートさせた。2.5 μgのFab-649をマウスに注射し、注射の30分後にマウスを屠殺した。LSECを実施例7と同様に単離し、Fabの平均蛍光強度についてフローサイトメトリーにより解析した。

30

【図10】Fabとペイロードとの間のカテプシン切断可能リンカー。図は、(A)Fab-CtsL1-mCherryはカテプシンLによりpH 6で効率的に切断されるが、pH 7.5では切断されないこと、(B)リンカーなしのFab-mCherryはpH 6で切断されないことを示す。

【図11】モデル抗原に対するインビボ寛容研究の結果。図中のデータは、インビボにおける抗原への寛容を実証する。(A)リンパ節におけるCD45.1+ OTI細胞またはOTII細胞の割合。(B)SIINFEKL (SEQ ID NO:115)またはISQによる再刺激後のインターフェロンガンマの産生。

40

【発明を実施するための形態】

【0058】

説明

本開示は、肝臓を標的とする、ある特定の治療用組成物(およびそのような組成物を使用する方法)を提供し、例えば、いくつかの態様では、主に肝臓のLSEC上に見出されるタンパク質であるLSEC C型レクチン(LSECtin)を標的とする(Liu et al., J. Biol. Chem. 279:18748-58, 2004)。LSECへのこれらの組成物の標的指向は、いくつかの態様によると、高親和性結合部分、例えば、LSECtinに特異的かつ高親和性で結合する抗体(ヒトもしくは非ヒトまたはその類似体、例えばラクダなどにかかわらない)、高親和性断片抗体

50

(Fab)、または関連するIgG、または関連する一本鎖可変断片(scFv)によって達成される。いくつかの態様において、Fab(および/または関連する形態)は、抗原(または抗原の1つの免疫原性断片または複数の断片)との融合物として化学的にコンジュゲートさせるかまたは組換えにより発現させることができる。いくつかの態様において、抗原は、内因性(自己抗原)または外因性(外来抗原)であってよく、これには、移植レシピエントがそれに対して望ましくない免疫応答(例えば、移植片拒絶反応)を生じる外来の移植片抗原、移植レシピエントがそれに対して望ましくない免疫応答(例えば、移植片拒絶反応)を生じる抗原を含む細胞外小胞、細胞断片、もしくは細胞、患者がそれに対して望ましくない免疫応答(例えば、アレルギーもしくは過敏症)を生じる外来の食物、動物、植物、もしくは環境抗原、患者がそれに対して望ましくない免疫応答(例えば、過敏症および/もしくは治療活性の低下)を生じる治療剤、患者がそれに対して望ましくない免疫応答(自己免疫疾患)を生じる自己抗原、またはそれらの一部(例えば、断片もしくはエピトープ)が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、これらの組成物は、抗原に対する寛容を誘導するのに有用である。上記で論じられたように、全長抗原を使用する必要はなく、むしろ、いくつかの態様では、抗原の1つの免疫原性断片または複数の断片が使用される。当業者は、より大きな抗原の1つの所与の断片または複数の断片が免疫原性である(例えば、本明細書において開示される態様に従った組成物と共に投与された場合に寛容を誘導することができる)かどうかを、過度の実験を行うことなく、容易に判定することができる。

10

20

【0059】

付加的な態様において、LSEC標的を指向するポリペプチドは、(上述のように)移植片拒絶反応、治療剤に対する免疫応答、自己免疫疾患、および/またはアレルギーに原因として関与する循環タンパク質またはペプチドまたは抗体と(例えば、特異的に)結合する抗体、抗体断片、またはリガンドにコンジュゲートさせることができる。いくつかの態様において、これらの組成物は、循環タンパク質、ペプチド、または抗体をクリアランスする、および/またはそれらに対する寛容を誘導するのに有用である。したがって、本明細書において開示されるいくつかの態様に沿って、本開示の組成物は、望ましくない免疫応答、例えば、移植片拒絶反応、治療剤に対する免疫応答、自己免疫疾患、および/またはアレルギーを処置するために使用することができる。

30

【0060】

1. LSECtin結合分子

本明細書で用いられる「LSECtin結合分子」は、LSECtinのエピトープまたは一部への特異的結合をもたらす抗体領域(例えば、可変領域)を含む分子、特に抗体などのタンパク質に関連している。抗体可変領域は、例えば、完全な抗体、抗体断片、および抗体もしくは抗体断片の組換え誘導体、またはそれらの類似体中に存在し得る。本明細書で用いられる抗体の「LSECtin結合断片」(または「結合部分」という用語は、LSECtinと特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体可変領域を含むLSECtin結合断片には、「Fv」、「Fab」、および「F(ab')₂」領域、「単一ドメイン抗体(sdAb)」、「ナノボディ」、「一本鎖Fv(scFv)」断片、「タンデムscFv」(V_HA-V_LA-V_HB-V_LB)、「ダイアボディ」、「トリアボディ」または「トリボディ」、「一本鎖ダイアボディ(scDb)」、ならびに「二重特異性T細胞誘導(BiTE)」、同様に、抗体可変領域を支持しそれらの結合特異性を維持し得る他のタンパク質足場(すなわち、類似体)が(非限定的に)含まれる。LSECtin結合分子はまた、ラクダ抗体などの非ヒト起源の抗体であってもよい。これらには、ヒト、非ヒト(マウスなど)、および非天然の(すなわち、操作された)タンパク質、抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ラクダ抗体、および非抗体結合足場、例えば相補性決定領域を含むタンパク質フレームワークなど、例えば、フィブロネクチン、ノッチン、アンチカリン、アフイボディ、4ヘリックスバンドルタンパク質、アンキリン反復タンパク質(例えば、DARPin)、テトラネクチン、アドネクチン、アドメインタンパク質、リポカリン、免疫タンパク質ImmE7、シトクロムb562、アミロイドタンパク質前駆体阻害剤、セロビオヒドロラーゼCel7A由来のセルロース結合ドメイン、炭水

40

50

化物結合モジュールCBM4-2；RNA；DNAアプタマー；および分子的にインプリントされたナノ粒子などが含まれる。

【0061】

ある特定の局面において、LSEctin結合部分は抗体である。特定の局面において、該抗体は、SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:113の軽鎖アミノ酸配列を有する軽鎖、および/またはSEQ ID NO:2もしくはSEQ ID NO:114の重鎖アミノ酸配列を有し得る。LSEctin結合部分の非限定的な一例は、1つまたは複数のCDRを有する抗体である。特定の態様において、抗体またはLSEctin結合部分は、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、もしくはSEQ ID NO:54のアミノ酸配列を有するCDRL3；SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、もしくはSEQ ID NO:58のアミノ酸配列を有するCDRH1；SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、もしくはSEQ ID NO:62のアミノ酸配列を有するCDRH2；および/またはSEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、もしくはSEQ ID NO:66のアミノ酸配列を有するCDRH3より選択される、1、2、3、4、5、または6個のCDRを含み得る。特定の態様において、抗体またはLSEctin結合部分は、SEQ ID NO:49のアミノ酸配列を有するCDRL1；SEQ ID NO:50のアミノ酸配列を有するCDRL2；SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、もしくはSEQ ID NO:7のアミノ酸配列を有するCDRL3；SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、もしくはSEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有するCDRH1；SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、もしくはSEQ ID NO:16のアミノ酸配列を有するCDRH2；および/またはSEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、もしくはSEQ ID NO:22のアミノ酸配列を有するCDRH3より選択される、1、2、3、4、5、または6個のCDRを含み得る。ある特定の態様においては、上記のCDR配列の組み合わせが使用され得る。

【0062】

II. 抗原

「抗原」は、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体クラスIおよびII、CD1d、B細胞受容体、もしくは抗体などの適応免疫応答の受容体の標的として機能するか、またはさもないければ有害な免疫応答を誘導するもしくは増大させる任意の物質である。抗原は、体内に由来し得る（「自己（self）」、「自己（auto）」、または「内因性」）。抗原は、例えば、吸入、摂取、注射、または移植によって入り、時には体内で生化学的に修飾されて、体外に由来し得る（「非自己」、「外来」もしくは「外因性」、または「同種」）。外来抗原には、食物抗原、動物抗原、植物抗原、環境抗原、治療剤、および同種移植片中に存在する抗原が含まれるが、これらに限定されない。コンジュゲートはまた、ドナーのB細胞、樹状細胞、単球、もしくは他の抗原提示細胞、または血清血漿に由来する細胞外小胞のように、1つまたは複数の抗原の取り合わせであってもよい。特定の態様において、抗原は、それがアレルギー、欠失、または調節であるかにかかわらず、寛容原性免疫応答が所望されるものである。

【0063】

抗原決定基としても公知である「エピトープ」は、抗体、B細胞、主要組織適合遺伝子複合体分子、CD1d分子、T細胞、またはNKT細胞などの適応免疫系によって認識される、高分子、例えばタンパク質のセグメントである。エピトープは、抗体またはその抗原結合断片に結合し得る高分子のそのような部分またはセグメントである。この文脈において、「結合」という用語は、特に特異的結合に関する。いくつかの態様によると、「エピトープ」という用語は、免疫系によって認識されるタンパク質またはポリペプチドのセグメントを指す。

【0064】

いくつかの態様において、LSEctin結合部分または特異的抗体もしくはその断片に結合される抗原は、タンパク質またはペプチドであってよく、例えば、抗原は、完全なもしくは部分的な治療剤、全長の移植片タンパク質もしくはそのペプチド、全長の自己抗原もしくはそのペプチド、全長のアレルゲンもしくはそのペプチド、および/または核酸、もしくは抗原の模倣物であってよい。抗原は、あるMHCハプロタイプから別のMHCハプロタイプ

へなど、主要なまたは軽微な抗原ミスマッチを越えて移行される、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球、もしくは他の細胞型に由来する、または血清血漿に由来する細胞外小胞を含み得る。さらに付加的な態様において、抗原は、例えば、エキソソームもしくは細胞外小胞などの細胞断片、または移植片抗原もしくは自己免疫抗原を含む全細胞中に收容されるか、組み込まれるか、またはそれらによってその他の方法で運ばれる。

【0065】

ある特定の局面において、抗原は、以下のような1つまたは複数の(a)、(b)、(c)、および(d)（それらの組み合わせを含む）を含むが、これらに限定されない：(a) タンパク質、ペプチド、脂質、糖類、抗体、ならびに抗体断片、および抗体および抗体断片との融合タンパク質を含む抗体様分子である治療剤。これらには、ヒト、非ヒト（マウスなど）、および非天然の（すなわち、操作された）タンパク質、抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ラクダ抗体、および非抗体結合足場、例えば相補性決定領域を含むタンパク質フレームワークなど、例えば、フィブロネクチン、ノッチン、アンチカリン、アフィボディン、4ヘリックスバンドルタンパク質、アンキリン反復タンパク質（例えば、DARPin）、テトラネクチン、アドネクチン、アドメインタンパク質、リポカリン、免疫タンパク質ImmE7、シトクロムb562、アミロイドタンパク質前駆体阻害剤、セロビオヒドロラーゼCel7A由来のセルロース結合ドメイン、炭水化物結合モジュールCBM4-2；RNA；DNAアプタマー；および分子的にインプリントされたナノ粒子などが含まれるが、これらに限定されない。

(b) 特定の移植抗原を含むエキソソームまたは細胞外小胞などのヒトまたは非ヒト細胞断片を含む、移植レシピエントがそれに対して望ましくない免疫応答を生じるヒト同種移植片移植抗原。(c) 望ましくない自己免疫応答を引き起こす自己抗原。それらは内因性であるが、本発明の組成物を使用して寛容を誘導するためには、それらは典型的には外因的に合成され得る（起源の供給源から精製され濃縮されるのとは対照的に）。あるいは、二官能性リンカーが、インサイチューで内因性自己抗原と会合し得る。(d) 患者がそれに対して望ましくない免疫応答を経験する食物、動物、植物、および環境抗原などの外来抗原。当業者は、治療用タンパク質もまた、その外因的起源のために外来抗原と見なされ得るが、本開示の説明を明確にする目的で、そのような治療剤は別個の群として記載されることを認識するであろう。同様に、植物または動物抗原は食されて、食物抗原と見なすことができ、また環境抗原は植物に由来する場合がある。しかしながら、それらはすべて外来抗原である。簡潔にするために、当業者は、特に詳細な説明および実施例の観点から、本開示の組成物において用いられ得る抗原を認識することができるという理由で、そのような潜在的に重複する群のすべてを記載し、区別し、および定義する試みは行われず、また特定の群内の特定の抗原を列挙または記載することは、そのメンバーが潜在的に別の群のメンバーであると見なされることを排除するものではない。

【0066】

いくつかの態様において、抗原は、完全なタンパク質、完全なタンパク質の一部、ペプチド、または同様のもの（例えば、模倣物もしくは抗原断片）であってよく、リンカー部分への付着のために誘導体化され得（本明細書において論じられるように）、変種であってよく、および/または保存的置換を含み得る。上述のように、全長抗原を使用する必要はなく、むしろ、いくつかの態様では、抗原の1つの免疫原性断片または複数の断片が使用される。いくつかの態様においては、免疫原性断片の複数コピーが使用され、例えば、組成物の抗原部分はX1-X1-X1-X1（いくつかの態様では、X1部分の間に任意のリンカーが含まれ得る）を含む。いくつかの態様においては、抗原の複数の断片、例えば、X1、X2、X3が使用され、いくつかの態様では断片は任意に抗原の異なる領域であり、他の態様では領域は少なくとも部分的に重複してよい。なおさらなる態様においては、複数の抗原からの複数の断片が使用され、例えば、組成物の抗原部分はX1、Y1、Z1を含む。

【0067】

いくつかの態様において、治療用タンパク質、ペプチド、抗体、または抗体様分子である抗原を用いるのであれば、特定の抗原は、非限定的に以下のリストより選択され得る（Leader et al., Nat Rev Drug Discov 7:21-39, 2008、参照により本明細書に組み入れら

10

20

30

40

50

れる) : アバタセプト、アブシキシマブ、アダリムマブ、アデノシンデアミナーゼ、アド-トラスツズマブエムタンシン、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ、アルデスルキン、アルグルセラゼ、アルグルコシダーゼアルファ、 α -1-プロテイナーゼ阻害剤、アナキンラ、アニストレプラーゼ(アニソイル化プラスミノゲンストレプトキナーゼ活性化因子複合体)、アンチトロンビンIII、抗胸腺細胞グロブリン、アテプラーゼ(Ateplase)、ベバシズマブ、ビパリルジン、ボツリヌス毒素A型、ボツリヌス毒素B型、C1エステラーゼ阻害剤、カナキヌマブ、カルボキシペプチダーゼG2(グルカルピダーゼおよびVoraxaze)、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、コラゲナーゼ、ガラガラヘビ科免疫Fab、ダルベポエチン- α 、デノスマブ、ジゴキシン免疫Fab、ドルナーゼアルファ、エクリズマブ、エタネルセプト、第VIIa因子、第VIII因子、第IX因子、第XI因子、第XIII因子、フィブリノーゲン、フィルグラスチム、ガルスルファーゼ、ゴリムマブ、酢酸ヒストレリン、ヒアルロニダーゼ、イデュルスルファーゼ、イミグルセラゼ、インフリキシマブ、インスリン[組換えヒトインスリン(「rHuインスリン」)およびウシインスリンを含む]、インターフェロン- $2a$ 、インターフェロン- $2b$ 、インターフェロン- $1a$ 、インターフェロン- $1b$ 、インターフェロン- $1b$ 、イピリムマブ、L-アルギナーゼ、L-アスパラギナーゼ、L-メチオナーゼ、ラクターゼ、ラロニダーゼ、レピルジン/ヒルジン、メカセルミン、メカセルミンリンファパート、メトキシナタリズマブ、オクトレオチド、オフアツムマブ、オブレルベキン、腓アミラーゼ、腓リパーゼ、パパイン、Peg-アスパラギナーゼ、Peg-ドキシソルピシンHCl、PEG-エポエチン- α 、ペグフィルグラスチム、Peg-インターフェロン- $2a$ 、Peg-インターフェロン- $2b$ 、ペグロチカーゼ、ペグピソマント、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)、プロテインC、ラスブリカーゼ(ウリカーゼ)、サクロシダーゼ、サケカルシトニン、サルグラモスチム、ストレプトキナーゼ、テネクテプラーゼ、テリパラチド、トシリズマブ(アトリズマブ)、トラスツズマブ、1型アルファ-インターフェロン、ウステキヌマブ、vW因子。治療用タンパク質は、天然供給源から得られ得る(例えば、濃縮および精製され得る)か、または例えば組換えにより合成され得、これには、典型的にはIgGモノクローナルまたは断片または融合物である抗体治療剤が含まれる。

10

20

30

40

50

【0068】

特定の局面において、治療用タンパク質、ペプチド、抗体、または抗体様分子は、アブシキシマブ、アダリムマブ、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ、アルデスルキン、アルグルコシダーゼアルファ、第VIII因子、第IX因子、インフリキシマブ、インスリン(rHuインスリンを含む)、L-アスパラギナーゼ、ラロニダーゼ、ナタリズマブ、オクトレオチド、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)、またはラスブリカーゼ(ウリカーゼ)、および一般にそれらの様々な形式のIgGモノクローナル抗体である。

【0069】

別の特定の群は、止血剤(第VIII因子および第IX因子)、インスリン(rHuインスリンを含む)、ならびに非ヒト治療剤ウリカーゼ、PAL、およびアスパラギナーゼを含む。

【0070】

血液学および移植における望ましくない免疫応答には、自己免疫性再生不良性貧血、移植片拒絶反応(一般に)、および移植片対宿主病(骨髄移植拒絶反応)が含まれる。抗原がヒト同種移植片移植抗原である態様において、特定の配列は：様々なMHCクラスIおよびMHCクラスIIハプロタイプタンパク質のサブユニット(例えば、組織の交差適合試験において同定されるドナー/レシピエントの違い)、ならびにRhCE、Kell、Kidd、Duffy、およびSsを含む少数の血液型抗原上の単一アミノ酸多型より選択され得る。そのような組成物は、所与のドナー/レシピエント対に対して個々に調製され得る。抗原がヒト同種移植片移植抗原である態様において、特定の配列は、精製された分子実体に存在してもよく、または全細胞もしくは細胞断片、および例えば、あるMHCハプロタイプから別のMHCハプロタイプへなど、主要なもしくは軽微なミスマッチを越えて移行される、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球、もしくは他の細胞型に由来する、もしくは血清もしくは血漿に由来する細胞外小胞に含まれてもよい。

【 0 0 7 1 】

抗原が自己抗原またはその誘導体である態様において、特定の抗原（およびそれらが関連する自己免疫疾患）は、以下より選択され得るが、それらに限定されない。

【 0 0 7 2 】

1型糖尿病において、いくつかの抗原が同定されており、これには、インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ-65（GAD-65またはグルタミン酸デカルボキシラーゼ2）、GAD-67、グルコース-6ホスファターゼ2（IGRPまたは膵島特異的グルコース6ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質）、インスリンノーマ関連タンパク質2（IA-2）、およびインスリンノーマ関連タンパク質2（IA-2）が含まれるが、これらに限定されない；他の抗原には、ICA69、ICA12（SOX-13）、カルボキシペプチダーゼH、Imogen 38、GLIMA 38、クロモグラニン-A、HSP-60、カルボキシペプチダーゼE、ペリフェリン、2型グルコース輸送体、肝細胞癌-腸-膵臓/膵臓関連タンパク質、S100、グリア線維酸性タンパク質、再生遺伝子II、膵臓十二指腸ホメオボックス1、筋強直性ジストロフィーキナーゼ、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質、およびSST Gタンパク質共役受容体1~5が含まれる。インスリンが自己抗原および治療用タンパク質抗原の両方として特徴づけられ得る抗原の一例であることに留意すべきである。例えば、rHuインスリンおよびウシインスリンは治療用タンパク質抗原（望ましくない免疫攻撃の対象である）であり、一方で内因性ヒトインスリンは自己抗原（望ましくない免疫攻撃の対象である）である。内因性ヒトインスリンは、薬学的組成物において用いるために利用できないため、組換え型が本開示の選択された組成物において用いられる。

10

20

【 0 0 7 3 】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むヒトインスリンは、以下の配列

(UNIPROT P01308):

MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTR
 REAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN
 (SEQ ID NO:23)

30

を有する。

【 0 0 7 4 】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むGAD-65は、以下の配列 (UNIPROT Q05329):

MASPGSGFWSFGSEDGSGDSENPGTARAWCQVAQKFTGGIGNKLCALLYGDAEKP
 AESGGSQPPRAAARKAACACDQKPCSCSKVDVNYAFLHATDLLPACDGERPTLAFL
 QDVMNILLQYVVKSFDRSTKVIDFHYPNELLQEYNWELADQPQNLEEILMHCQTTL
 KYAIKTGHPRYFNQLSTGLDMVGLAADWLTSTANTNMFTYEIAPVFLLEYVTLKK
 MREIIGWPGSGDGIFSPGGAISNMYAMMIARFKMFPEVKEKGMMAALPRLIAFTSEH
 SHFSLKKGAAALGIGTDSVILIKCDERGMIPSDLERRILEAKQKGFVPFLVSATAGTT
 VYGAFDPLLAVADICKKYKIWMHVDAAWGGGLLSRKHKWKLSGVERANSVTW
 NPHKMMGVPLQCSALLVREEGLMQNCNQMHASYLFQQDKHYDLSYDTGDKALQC
 GRHVDVFKLWLMWRAKGTTGFEAHVDKCLELAEYLYNIIKNREGYEMVFDGKQPQH
 TNVCFWYIPPSLRTLEDNEERMSRLSKVAPVIKARMMMEYGTTMVSYQPLGDKVNFF
 RMVISNPAATHQDIDFLIEEIERLGQDL (SEQ ID NO:24)

40

50

を有する。

【 0 0 7 5 】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むIGRPは、以下の配列 (UNIPROT QN9QR9):

MDFLHRNGVLIHQHLQKDYRAYYTFLNFMSNVGDPRNIFFIYFPLCFQFNQTVGTKMI
 WVAVIGDWLNLIFKWILFGHRPYWWVQETQIYPNHSSPCLEQFP TTCETGPGSPSGH
 AMGASCVWYVMVTAALSHTVCGMDKFSITLHRLTWSFLWSVFWLIQISVCISRVFIA
 THFPHQVILGVIGGMLVAEAFEHTPGIQTASLGTYLKTNLFLFLFAVGFYLLLRVLNI
 DLLWSVPIAKKWCANPDWIHIDTPFAGLVRNLGVLFGLGFAINSEMFLLSRGGNN
 YTLRFLLCALTSILTILQLYHFLQIPTHEEHLFYVLSFCKSASIPLTVVAFIPYSVHMLM
 KQSGKKSQ (SEQ ID NO:25)

10

を有する。

【 0 0 7 6 】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むIA-2は、以下の配列 (NCBI 参照配列: XP_016860098.1):

MRRPRRPGGLGGSGGLRLLLCLLLLSSRPGGCSAVSAHGCLFDRRLCSHLEVCIQDG
 LFGQCQVGVGQARPLLQVTSPVLQRLQGVLRQLMSQGLSWHDDLQYVISQEMERI
 PRLRPPEPRPRDRSGLAPKRPGPAGELLQDIPTGSAPAAQHRLPQPPVGKGGAGASS
 SLSPLQAELLPPLEHLLLPPQPPHPSLSYEPALLQPYLFHQFGSRDGSRVSEGSPGMV
 SVGPLPKAEAPALFSRTASKGIFGDHPGHSYGDLPGPSAQLFQDSGLLYLAQELPAP
 SRARVPRLPEQSSSRAEDSPEGYEKEGLGDRGEKPASPAVQPADAALQRLAAVLA
 GYGVELRQLTPEQLSTLLTLLQLLPKGAGRNPGGVVNVGADIKKTMEGPVEGRDTA
 ELPARTSPMPGHPTASPTSSEVQQVSPVSSEPPKAARPPVTPVLEKKSPLGQSQPTV
 AGQPSARPAEEYGYIVTDQKPLSLAAGVKLLEILAEHVHMSSGSFINISVVGPAITF
 RIRHNEQNLSLADVTQQAGLVKSELEAQTGLQILQTGVGQREEAAVLPQTAHSTSP
 MRSVLLTLVALAGVAGLLVALAVALCVRQHARQQDKERLAALGPEGAHGDTTFEY
 QDLCRQHMAKSLFNRAEGPPEPSRVSSVSSQFSDAAQASPSHSSTPSWCEEPAQA
 NMDISTGHMILAYMEDHLRNRDLAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGEGNIKKNRH
 PDFLPYDHARIKLVESPSRSDYINASPIIHDPRMPAYIATQGPLSHTIADFWQMV
 WESGCTVIVMLTPLVEDGVKQCDRYWPDEGASLYHVYEVNLVSEHIWCEDFLVRSF
 YLKNVQTQETRILTQFHFLSWPAEGTPASTRPLLDFFRRKVNKC YRGRSCPIIVHCSDG
 AGRTGTYILIDMVLNRMAKGVKEIDIAATLEHVRDQRPGLVRSKDQFEFALTAVAAE
 VNAILKALPQ (SEQ ID NO:80)

20

30

40

を有する。

【 0 0 7 7 】

橋本甲状腺炎およびグレース病を含む甲状腺の自己免疫疾患において、抗原には、サイログロブリン (TG)、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、およびサイトロピン受容体 (TSHR) が含まれるが、これらに限定されない; 他の抗原には、ナトリウムヨウ素共輸送体 (NIS) およびメガリンが含まれる。甲状腺関連の眼疾患および皮膚症においては、TSH

50

Rを含む甲状腺自己抗原に加えて、抗原はインスリン様増殖因子1受容体である。副甲状腺機能低下症において、主要な抗原はカルシウム感受性受容体である。

【0078】

アジソン病において、抗原には、21-ヒドロキシラーゼ、17 β -ヒドロキシラーゼ、およびP450側鎖切断酵素（P450_{scc}）が含まれるが、これらに限定されない；他の抗原には、ACTH受容体、P450_{c21}、およびP450_{c17}が含まれる。

【0079】

早期卵巣機能不全において、抗原にはFSH受容体および α -エノラーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【0080】

自己免疫性下垂体炎または下垂体自己免疫疾患において、主要な抗原には下垂体特異的タンパク質因子（PGSF）1aおよび2が含まれるが、これらに限定されない；別の抗原は2型ヨードチロニン脱ヨード酵素である。

【0081】

多発性硬化症において、抗原には、ミエリン塩基性タンパク質（「MBP」）、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（「MOG」）、およびミエリンプロテオリピドタンパク質（「PLP」）が含まれるが、これらに限定されない。

【0082】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むMBPは、以下の配列 (UNIPROT P02686):

MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKKRNLGELSRTTSEDNEVFGADANQNNG
TSSQDTAVTDSKRTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFSRDAPGREDNTFKDRPSE
SDELQTIQEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDT
GILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGSLPQKSHGRTQDENPVVHFFKN
IVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKGFKGVDAAQG
TLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO:26)

を有する。

【0083】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むMOGは、以下の配列 (UNIPROT Q16653):

MASLSRPSLPSCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRISPGK
NATGMEVGVWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIR
NVRFSDEGGFTCFFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYVWVSPGVLVLLAVLPVLLLQITVG
LIFLCLQYRLRGKLRAEIENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWL
HRRLAGQFLEELRNPF (SEQ ID NO:27)

を有する。

【0084】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むPLPは、以下の配列

10

20

30

40

(UNIPROT P60201):

MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKKNYQD
 YEYLINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSA
 TVTGGQKGRGSRGQHQAHSRLRVCHCLGKWLGHDPKDFVGITYALTVVWLLVFACS
 AVPVYIYFNTWTTTCQSIAPSKTSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPVKVCGSNLLSIC
 KTAEFQMTFHLFIAAFVGAAATLVSLTFMIAATYNFAVLKLMGRGTFK (SEQ ID
 NO:28)

10

を有する。

【 0 0 8 5 】

多発性硬化症を処置するためのいくつかの態様において有用なペプチド/エピトープには、以下の配列のうちのいくつかまたはすべてが個々にまたは組み合わせて（以下のうちの1つもしくは複数の多重反復を含む）含まれる：

MBP13-32:

KYLATASTMDHARHGFLPRH (SEQ ID NO:29); MBP83-99: ENPWHFFKNIVTPRTP
 (SEQ ID NO:30); MBP111-129: LSRFSWGAEGQRPGFGYGG (SEQ ID NO:31); MBP146-
 170: AQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO:32); MOG1-20:

20

GQFRVIGPRHPIRALVGDEV (SEQ ID NO:33); MOG35-55:
 MEVGWYRPPFSRWHLRNGK (SEQ ID NO:34); PLP139-154:
 HCLGKWLGHDPKDFVGI (SEQ ID NO:35), MOG1-62:

GQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRISPGKNATGMEVGWYRPPFSRVVHLRNGKDQ
 DGDQA (SEQ ID NO:69), MBP76-136:

SHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPGFGYGGGRAS
 DYKSCG (SEQ ID NO:70); MBP1-50:

30

GCASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRG (SEQ
 ID NO:71); MBP131-170:

ASDYKSAHKGFKGVDAQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARRCG (SEQ ID NO:72);
 MBP102-136: SQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPGFGYGGGRASDYKSCG (SEQ ID

NO:74); MOG1-27: GQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRIS (SEQ ID NO:75); および MOG18-
 62: DEVELPCRISPGKNATGMEVGWYRPPFSRVVHLRNGKDQDGDQA (SEQ ID
 NO:76)

40

。
 【 0 0 8 6 】

関節リウマチにおいて、抗原には、コラーゲンII、免疫グロブリン結合タンパク質、免疫グロブリンGの断片結晶化可能領域、二本鎖DNA、ならびにフィブリン/フィブリノーゲン、ピメンチン、コラーゲンIおよびII、および -エノラーゼを含む、関節リウマチ病態に関係づけられるタンパク質の天然形態およびシトルリン化形態が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 7 】

自己免疫性胃炎において、抗原の非限定的な例はH⁺、K⁺-ATPアーゼである。

50

【 0 0 8 8 】

悪性貧血（angemis）において、抗原の非限定的な例は内因子である。

【 0 0 8 9 】

セリアック病において、抗原には、組織トランスグルタミナーゼ、ならびにグルテンまたはグルテン様タンパク質、例えば、アルファ-、ガンマ-、およびオメガ-グリアジン、グルテニン、ホルデイン、セカリン、およびアベニンなどの天然形態および脱アミド化形態が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、例えば、セリアック病の主要な抗原はアルファグリアジンである一方で、アルファグリアジンは、組織グルタミナーゼがアルファグリアジンのグルタミンをグルタミン酸に変換することによる脱アミドを通じて、体内でより免疫原性になることを認識するであろう。したがって、アルファグリアジンは元来は外来の食物抗原である一方で、ひとたび体内で改変されてより免疫原性になると、それは自己抗原として特徴づけられ得る。セリアック病を処置するためのいくつかの態様において有用なペプチド/エピトープには、以下の配列のうちのいくつかまたはすべてが個々にまたは組み合わせて（以下のうちの1つもしくはは複数の多重反復を含む）含まれる：D

10

Q-2関連天然グリアジン：
LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO:42)

；DQ-2関連脱アミド化グリアジン：

LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO:43)

；DQ-8関連アルファ-グリアジン：

QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (SEQ ID NO:44)

20

、DQ-8関連オメガ-グリアジン：

QPFQPPEQPFPW (SEQ ID NO:45)

、グリアジンの免疫原性断片：

PQPELPY (SEQ ID NO:77)

、グリアジンの脱アミド化断片：

LQLQPFQPQLPYQPPE (SEQ ID NO:78)

、およびグリアジンの付加的な断片：

LQLQPFQPQLPYQPQ (SEQ ID NO:79)

。

【 0 0 9 0 】

白斑において、抗原の非限定的な例は、チロシナーゼ、ならびにチロシナーゼ関連タンパク質1および2である。

30

【 0 0 9 1 】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むMART1、T細胞により認識されるメラノーマ抗原1、メラニンAは、以下の配列 (UNIPROT Q16655):

MPREDAHFYGYPKKGHGHSYTTAEEAAGIGILTVILGVLLLLIGCWYCRRRNGYRAL

MDKSLHVGVTQCALTRRCPEGFDHRDSKVSLEKNCPEVVPNAPPAYEKL SAEQSP

PPYSP (SEQ ID NO:36)

40

を有する。

【 0 0 9 2 】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むチロシナーゼは、以下の配列

(UNIPROT P14679):

MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSCQ
 NILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFWGPNCT
 ERLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTPMFNDINI
 YDLFVWMHYVVSMDALLGGSEIWRDIDFAHEAPAFLPWHRLFLLRWEQEIQKLTGD
 ENFTIPYWDWRDAEKCDICTDEYMGGQHPTNPNULLSPASFFSSWQIVCSRLEEYN
 SHQSLCNGTPEGPLRRNPGNHDKSRTPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRN
 TLEGFASPLTGIADASQSSMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAFFVDSIFEQ
 WLRRHRPLQEYYPEANAPIGHNRESYMPFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQDSD
 PDSFQDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAVLTALLAGLVSLLCRHKRKQLPEEKQ
 PLLMEKEDYHSLYQSHL (SEQ ID NO:37)

を有する。

【 0 0 9 3 】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むメラノサイトタンパク質PM
 EL、gp100は、以下の配列
 (UNIPROT P40967):

MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGATKVP RNQDWLGVSQR LRTKAWNRQLYPEWTE
 AQR LDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPGSQKVL PDGQVIWVNNTIIN
 GSQVWGGQPVYPQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGG
 PVSGLSIGTGRAMLGHTTMEVTVYHRRGSR SYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQR
 LALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTY
 LEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPGTTDGH RPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTTPG
 QAPTAEPSGTT SVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTP
 EATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSL
 GPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTL DIVQGIESAEILQAVPSGEGDAFEL
 TVSCQGGPLKEACMEISSPGCQPPAQR LCPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVS
 LADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIVGILLV LMAVVLASLIYRRRLMKQDFSV
 PQLPHSSSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLL SGQQV (SEQ ID NO:38)

を有する。

【 0 0 9 4 】

重症筋無力症において、抗原の非限定的な例はアセチルコリン受容体である。

【 0 0 9 5 】

尋常性天疱瘡およびバリエント型において、抗原の非限定的な例は、デスモグレイン3
 、1、および4である；他の抗原には、ペンファキシン、デスモコリン、プラコグロビン、
 ペルプラキン (perplakin)、デスモプラキン、およびアセチルコリン受容体が含まれる
 。

【 0 0 9 6 】

水疱性類天疱瘡において、抗原の非限定的な例にはBP180およびBP230が含まれる；他の
 抗原にはプレクチンおよびラミニン5が含まれる。

【 0 0 9 7 】

ジューリング疱疹状皮膚炎において、抗原の非限定的な例には筋内膜および組織トラン

10

20

30

40

50

スグルタミナーゼが含まれる。

【0098】

後天性表皮水疱症において、抗原の非限定的な例はコラーゲンVIIである。

【0099】

全身性硬化症において、抗原の非限定的な例には、マトリックスメタロプロテイナーゼ1および3、コラーゲン特異的分子シャペロン熱ショックタンパク質47、フィブリリン1、ならびにPDGF受容体が含まれるが、これらに限定されない；他の抗原には、Sc1-70、U1 RNP、Th/To、Ku、Jo1、NAG2、セントロメアタンパク質、トポイソメラーゼI、核小体タンパク質、RNAポリメラーゼI、II、およびIII、PM-Slc、フィブリラリン、ならびにB23が含まれる。

10

【0100】

混合性結合組織病において、抗原の非限定的な例はU1snRNPである。

【0101】

シェーグレン症候群において、抗原の非限定的な例は核抗原SS-AおよびSS-Bである；他の抗原には、フォドリン、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼおよびトポイソメラーゼ、ムスカリン受容体、ならびにFc-受容体IIIbが含まれる。

【0102】

全身性エリテマトーデスにおいて、抗原の非限定的な例には、「スミス抗原」、SS-A、高移動度群ボックス1(HMGB1)、ヌクレオソーム、ヒストンタンパク質、および二本鎖DNAを含む核タンパク質(疾患過程においてこれらに対して自己抗体が作製される)が含まれる。

20

【0103】

グッドパスチャー症候群において、抗原の非限定的な例には、コラーゲンIVを含む糸球体基底膜タンパク質が含まれる。

【0104】

リウマチ性心疾患において、抗原の非限定的な例は心筋ミオシンである。

【0105】

自己免疫性多腺性内分泌症候群1型において、抗原の非限定的な例には、芳香族L-アミノ酸デカルボキシラーゼ、ヒスチジンデカルボキシラーゼ、システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ、トリプトファンヒドロキシラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、肝臓P450シトクロムP4501A2および2A6、SOX-9、SOX-10、カルシウム感知受容体タンパク質、ならびに1型インターフェロンのインターフェロンアルファ、ベータ、およびオメガが含まれる。

30

【0106】

視神経脊髄炎において、抗原の非限定的な例はAQP4である。

【0107】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むアクアポリン4は、以下の配列

(UNIPROT P55087):

```
MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGST
INWGGTEKPLPVDMLISLCFGLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAK
SVFYIAAQCLGAIIGAGILYLTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFT
IFASCDKRTDVTGSIALAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHW
IYWVGPIIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTGKSYMEVEDNRSQV
ETDDLILKPGVVHVIDVDRGEEKKGDQSGEVLSSV (SEQ ID NO:39)
```

40

を有する。

【0108】

50

ぶどう膜炎において、抗原の非限定的な例には、網膜S-抗原または「S-アレスチン」および光受容体間レチノイド結合タンパク（IRBP）またはレチノール結合タンパク質3が含まれる。

【0109】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むS-アレスチンは、以下の配列
(UNIPROT P10523):

MAASGKTSKSEPNHVIFKKISRDKSVTIYLGNRDYIDHVSQVQPVDGVVLDVDPDLVK
GKKVYVTLTCAFRYGQEDIDVIGLTFRRDLYFSRVQVYPPVGAASTPTKLQESLLKK
LGSNTYPFLLTFPDYLPCSVMLQPAPQDSGKSCGVDFEVKAFATDSTDAEEDKIPKKS
SVRLLRKQVQHAPLEMGPQPRAEAAWQFFMSDKPLHLAVSLNKEIYFHGEPIPVTVT
VTNNTKTKVKKIKAFVEQVANVLYSSDYVVKPVAMEEAQEKVPPNSTLTKTLTLL
PLLANNRERRGIALDGKIKHEDTNLASSTIIKEGIDRTVLGILVSYQIKVKLTVSGFLGE
LTSSEVATEVPFRLMHPQPEDPAKESYQDANLVFEEFARHNLKDAGEAEEGKRDKN
DVDE (SEQ ID NO:40)

10

を有する。

20

【0110】

いくつかの態様において有用な外因的に得られる形態を含むIRBPは、以下の配列

(UNIPROT P10745):

MMREWVLLMSVLLCGLAGPHTLFPQPSLVLDMAKVLLDNYCFPENLLGMQEAIIQQA
 KSHEILSISDPQTLASVLTAGVQSSLNDPRLVISYEPSTPEPPPQVPALTSLEEELAW
 LQRGLRHEVLEGNVGYLRVDSVPGQEVLSMMGEFLVAHVWGNLMGTSALVLDLR
 HCTGGQVSGIPYIISYLHPGNTILHVDTIYNRPSNTTTEIWTLTPQVLGERYGADKDVV
 VLTSSQTRGVAEDIAHILKQMRRAIVVGERTGGGALDLRKLKLRIGESDFFFTVPVSRSL
 GPLGGGSQTWEGSGVLPCVGTAEQALEKALAILTLRSALPGVVHCLQEVLDKDYIT
 LVDRVPTLLQHLASMDFSTVVSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRLLVRAIGPTETPSWP
 APDAAAEDSPGVAPELPEDEAIRQALVDSVFQVSVLPGNVGYLRFDSFADASVLGVL
 APYVLRQVWEPLQDTEHLIMDLRHNPGGPSSAVPLLLSYFQGPEAGPVHLFTTYDRR
 TNITQEHFSTMELPGPRYSTQRGVYLLTSHRTATAAEFAFLMQSLGWATLVEGITA
 GNLLHTRTVPLLDTPEGSLALTPVVLTFIDNHGEAWLGGGVVPAIVLAEEALDKAQ
 EVLEFHQSLGALVEGTGHLLEAHYARPEVVGQTSALLRAKLAQGAYRTAVDLES
 SQTADLQEVSGDHRLLVFHSPGELVVEEAPPPPAVPSPEELTYLIEALFKTEVLP
 LGYLRFDAMAELETVKAVGPQLVRLVWQQLVDTAALVIDLRYNPGSYSTAIPLLCS
 YFFEAEPHQHLYSVFDRATSKVTEVWTLTPQVAGQRYGSHKDLYILMSHTSGSAAEA
 FAHTMQDLQRATVIGEPTAGGALSVGIYQVGSPLYASMPTQMAMSATTGKAWDL
 AGVEPDITVPMSEALSIAQDIVALRAKVPTVLQTAGKLVADNYASAELGAKMATKL
 SGLQSRYSRVTSEVALAEILGADLQMLSGDPLKAAHIPENAKDRIPGIVPMQIPSPE
 VFEELIKFSFHTNVLEDNIGYLRFDMFQDGGELLTQVSRLLEHIVKIMHTDAMIIDM
 RFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSRPDDSVSELWTHAQVVGERYGSKKSMV
 ILTSSVTAGTAEFETYIMKRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDDTNLYLTIPTARSV
 GASDGSSWEGVGVTPHVVPAAEALARAKEMLQHNQLRVKRSPGLQDHL (SEQ ID
 NO:41)

10

20

30

40

50

を有する。

【 0 1 1 1 】

抗原が、食物抗原などの、それに対して望ましくない免疫応答が生じ得る外来抗原である態様において、特定の抗原には、ピーナッツ抗原：コンアラキン（Ara h 1）、アレルゲンII（Ara h 2）、ラッカセイ凝集素、コングルチン（Ara h 6）；コンアラキンは、例えばUNIPROT Q6PSU6として同定された配列を有する；リンゴ抗原：31 kda主要アレルゲン / 疾患耐性タンパク質相同体（Mal d 2）、脂質輸送タンパク質前駆体（Mal d 3）、主要アレルゲンMal d 1.03D（Mal d 1）；乳抗原： -ラクトアルブミン（ALA）、ラクトランスフェリン；キウイ由来：アクチニジン（Act c 1、Act d 1）、フィトシスタチン、タウマチン様タンパク質（Act d 2）、キウエリン（Act d 5）；卵白抗原：オボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、およびリゾチーム；卵黄抗原：リベチン、アポビチリン（apovitillin）、およびボスベチン（vosvetin）；カラシナ抗原：2Sアルブミン（Sin a 1）、11Sグロブリン（Sin a 2）、脂質輸送タンパク質（Sin a 3）、プロフィリン（Sin a 4）；セロリ抗原：プロフィリン（Api g 4）、高分子量糖タンパク質（Api g 5）；エビ抗原：Pen a 1アレルゲン（Pen a 1）、アレルゲンPen m 2（Pen m 2）、トロポミオシン速筋型アイソフォーム；コムギまたは他の穀物抗原：グリアジン、高分子量

グルテニン、低分子量グルテニン、アルファ-、ガンマ-、およびオメガ-グリアジン、ホルデイン、セカリン、および/またはアベニン；イチゴ抗原：主要イチゴアレルギーFra a 1-E (Fra a 1)；ならびにバナナ抗原：プロフィリン (Mus xp 1) が含まれるが、これらに限定ない。

【 0 1 1 2 】

セリアック病を処置するためのいくつかの態様において有用なペプチド/エピトープには、以下の配列のうちのいくつかまたはすべてが個々にまたは組み合わせて含まれる：

DQ-2関連、アルファ-グリアジン「33-mer」天然：

LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO:42)

；

DQ-2関連、アルファ-グリアジン「33-mer」脱アミド化：

LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO:43)

；

DQ-8関連、アルファ-グリアジン：

QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (SEQ ID NO:44)

；

DQ-8関連、オメガ-グリアジン (コムギ、U5UA46)：

QPFQPPEQPF (SEQ ID NO:45)

。

【 0 1 1 3 】

抗原が、動物、植物、および環境抗原などの、それに対して望ましくない免疫応答が生じる外来抗原である態様において、特定の抗原には、例えば、以下由来の下記のタンパク質またはペプチドを含む、ネコ、マウス、イヌ、ウマ、ハチ、ホコリ、樹木、およびアキノキリンソウが含まれ得るが、これらに限定されない：(a) 雑草 (ブタクサアレルギー Amb a 1、2、3、5、および6、ならびに Amb t 5；アカザ Che a 2 および5；ならびに他の雑草アレルギー Par j 1、2、および3、ならびに Par o 1 を含む)；(b) 草 (主要アレルギー Cyn d 1、7、および12；Dac g 1、2、および5；Hol l 1.01203；Lol p 1、2、3、5、および11；Mer a 1；Pha a 1；Poa p 1 および5を含む)；(c) ブタクサ、ならびに他の雑草 (ナガバギシギシ、シロザ、アカザ、オオバコ、ヒメスイバ、およびヤマヨモギを含む)、草 (ギョウギシバ、セイバンモロコシ、ケンタッキーグラス、カモガヤ、ハルガヤ、およびオオアワガエリを含む)、および樹木 (キササゲ、ニレ、ヒッコリー、オリーブ、ペカン、アメリカスズカケノキ、およびクルミを含む) 由来の花粉；(d) ホコリ (ヤケヒョウヒダニ (Dermatophagoides pteronyssinus) 種由来の、例えば、Der p 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、14、15、18、20、21、および23など；コナヒョウヒダニ (Dermatophagoides farina) 種由来の、例えば Der f 1、2、3、6、7、10、11、13、14、15、16、18、22、および24など；ネッタイタマニクダニ (Blomia tropicalis) 種由来の、例えば Blo t 1、2、3、4、5、6、10、11、12、13、19、および21などの主要アレルギー；またシワチリダニ (Euroglyphus maynei) 由来のアレルギー Eur m 2、ケナガコダニ (Tyrophagus putrescentiae) 由来の Tyr p 13、ならびにゴキブリ由来のアレルギー Bla g 1、2、および4；Per a 1、3、および7を含む)；(e) ペット (ネコ、イヌ、げっ歯類、および家畜を含む；主要ネコアレルギーには、Fel d 1~8、ネコIgA、Bla g 2、およびネコアルブミンが含まれる；主要イヌアレルギーには、Can f 1~6 およびイヌアルブミンが含まれる)；(f) ハチの針、主要アレルギー Api m 1~12 を含む；ならびに (g) 真菌、アスペルギルス属およびペニシリウム属の種、ならびにアルテルナリア・アルテルナータ (Alternaria alternate)、ダビディエラ・タシアナ (Davidiella tassiana)、および紅色白癬菌 (Trichophyton rubrum) 種由来のアレルギーを含む。

【 0 1 1 4 】

いくつかの態様において、式 [A-B-X] に関して、Xは、循環タンパク質またはペプチドまたは抗体と特異的に結合する抗体、抗体断片、またはリガンドであり、この循環タンパク質またはペプチドまたは抗体は、移植片拒絶反応、治療剤に対する免疫応答、自己免疫

10

20

30

40

50

疾患、および/もしくはアレルギー（または他の望ましくない免疫応答）を引き起こす。

【0115】

いくつかの態様において、式 [A-B-X] に関して、Xは、内因性の循環タンパク質またはペプチドまたは抗体と結合する。

【0116】

いくつかの態様において、式 [A-B-X] に関して、Xは、フルオロフォア、例えば、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 700、AmCyan、アロフィコシアニン（APC）、APC/Alexa Fluor 750、APC/Cy5.5、APC/Cy7、BD Horizon V450、BD Horizon V500、BD Horizon BB515、BD Horizon BU V395、BD Horizon BUV4956、BD Horizon BUV737、Brilliant Violet 421、Brilliant Violet 510、Brilliant Violet 570、Brilliant Violet 605、Brilliant Violet 650、Brilliant Violet 711、Brilliant Violet 785、Cascade Blue、Cascade Yellow、CFP、CFSE、Cy3、Cy5、DAPI、DRAQ5、DRAQ7、DsRed-Express、dTomato、eBFP、eCFP、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 605NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、FITC、Flash Phalloidin RED 594、Flash Phalloidin NIR 647、GFP、Helix NP NIR、Hoechst 33258、mCherry、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、mPlum、NADH、Pacific Blue、Pacific Orange、フィコエリトリン（PE）、PE-CF594、PE/Cy5、PE/Cy5.5、PE/Cy7、PE/Dazzle 594、PE/テキサスレッド-X、PerCP、PerCP/Cy5.5、PerCP=eFluor 710、ヨウ化プロピジウム、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、リボフラビン、Tag-it Violet、TO-PRO-3、YFP、Zombie Aqua、Zombie Green、Zombie NIR、Zombie Red、Zombie UV、Zombie Violet、Zombie Yellow、ZsGreenなどである。

10

20

30

【0117】

いくつかの態様において、式 [A-B-X] に関して、Xは細胞外小胞である。細胞外小胞を単離するために、抗原提示細胞（単球、B細胞、または樹状細胞）を、例えば磁気ビーズ単離法を用いて、マウスから単離することができる。細胞を、RPMI（4%エキソソーム不含ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン）中で、細胞100万個/mLの密度で3日間培養する。3日後、上清を単離し、300×g、4分で5分間遠心分離して細胞をペレット化する。上清を単離し、2000×g、4分で5分間遠心分離する。上清を単離し、10,000×g、4分で30分間遠心分離する。上清を採取し、100,000×gで70分間遠心分離して細胞外小胞をペレット化する。ペレットをPBSで洗浄し、再度100,000×gで70分間遠心分離する。ペレットをPBSに再懸濁し、濃度をピシンコニンアッセイ（BCA）を用いて測定する。ペレットを一定分量に分割し、-20℃で保存することができる。あるいは、エキソソームは、細胞株培養物から単離してもよいし、または全血から単離された血清から直接単離してもよい。

30

40

50

【0118】

いくつかの態様によると、患者を検査して、それに対して望ましくない免疫応答が生じた抗原を同定することができ、タンパク質、ペプチド、または同様のものをその抗原に基づいて開発し、本開示の態様による組成物中にXとして組み込むことができる。

【0119】

III. リンカー

アミノ酸配列またはペプチド模倣物配列などのリンカーを、LSECtin結合部分と抗原との間に挿入することができる。リンカーは、可動性高次構造、規則的な二次構造を形成不能であること、または両ドメインを促進し得るもしくはそれと相互作用し得る疎水性もしくは荷電性特性を含む、1つまたは複数の特徴を有し得る。可動性タンパク質領域に典型的に見出されるアミノ酸の例には、Gly、Asn、およびSerが含まれ得る。他のほぼ中性に近いアミノ酸、例えばThrおよびAlaなどもまた、リンカー配列に用いることができる。リンカー配列の長さは、融合タンパク質の機能または活性に有意に影響を及ぼすことなく変動し得る（例えば、米国特許第6,087,329号を参照されたい）。特定の局面において、LBMと抗原は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個～25個のアミノ酸残基を有するペプチド配列によって結合

される。リンカーの例には、化学部分およびコンジュゲート剤、例えば、スルホ-スクシンイミジル誘導体（スルホ-SMCC、スルホ-SMPB）、スベリン酸ジスクシンイミジル（DSS）、グルタル酸ジスクシンイミジル（DSG）、および酒石酸ジスクシンイミジル（DST）などもまた含まれ得る。リンカーには、直鎖状炭素鎖、例えば C_N （式中、 $N=1\sim 100$ 個の炭素原子、例えば、 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 ）などもさらに含まれる。いくつかの態様において、リンカーは、ジペプチドリンカー、例えば、バリン-シトルリン（val-cit）、フェニルアラニン-リジン（phe-lys）リンカー、またはマレイミドカプロニック-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル（vc）リンカーなどであってよい。いくつかの態様において、リンカーは、スルホスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボン酸（smcc）である。スルホ-SMCCコンジュゲーションは、スルフヒドリル（チオール、-SH）と反応する一方で、そのスルホ-NHSエステルが第一級アミン（リジンおよびタンパク質またはペプチドのN末端において見出される）に対して反応性であるマレイミド基を介して起こる。さらに、リンカーはマレイミドカプロイル（mc）であってよい。

10

【0120】

ある特定の態様において、リンカーは二官能性リンカーであり、これには、数ある中でも、タンパク質-細胞、タンパク質-細胞断片、タンパク質-エキソソーム、タンパク質-細胞外小胞、タンパク質-タンパク質、タンパク質-ペプチド、タンパク質-ポリマー、ポリマー-小分子、ペプチド/タンパク質-小分子の相互作用、アッセイまたは精製のための固定化、ならびに様々なペプチド-核酸および核酸-核酸のコンジュゲーションにおいて構造安定性または支援を提供するための分子コンジュゲーション反応のための試薬が含まれる。典型的には、二官能性リンカーは、第一級アミン、スルフヒドリル、酸、アルコール、および臭化物などの官能基を含む。具体的には、アミンと反応するマレイミド（スルフヒドリル反応性）およびスクシンイミジルエステル（NHS）またはイソチオシアネート（ITC）基が、本態様において使用され得る。

20

【0121】

ある特定の局面において、二官能性リンカーは、LSECtin結合部分と抗原との間のスペーサーとして使用され得る。連結基には、エステル、炭酸、カルバミン酸、イミン（ヒドラジン）、アミド、マレイミド、スクシンイミジル、ビニルスルホン、共役 $C=C$ 二重結合、エポキシ、アルデヒド、ケトン、シラン、またはシロキサン官能性などが含まれ得るが、これらに限定されない。理論に限定されることなく、いくつかの態様はまた、例えば、酵素、求核性/塩基性試薬、光照射、求電子性/酸性試薬、有機金属および金属試薬、または酸化試薬によるそれらの切断条件に従って分類される、化学生物学において用いられる切断可能なリンカーも包含する。

30

【0122】

ある特定の局面において、LSECtin結合部分は、細胞外小胞および同様のものに連結することができる。LSECtin結合部分は、細胞外小胞、細胞断片、または細胞に化学的にコンジュゲートさせることができる。LSECtin結合部分はまた、非共有結合機構を介して細胞外小胞、細胞断片、または細胞に連結してもよい（Armstrong et al., Therapeutics, ACS Nano, 2017）。

40

【0123】

二官能性分子は、一方の側ではLSECtin結合部分であり、他方の側では細胞外小胞、細胞断片、または細胞上のタンパク質または分子（例えば、テトラスパニン）に結合するように、組換え発現または化学的コンジュゲーションによって生成することができる。細胞を、膜挿入配列を有するLSECtin結合部分を発現するように遺伝子操作することができ、その結果として、ひとたび発現されると、LSECtin結合部分は膜に挿入され、細胞およびそのすべての誘導体は、膜に挿入されたLSECtin結合部分を有することになる。LSECtin結合部分は、インビトロで細胞外小胞、細胞断片、または細胞に挿入され得る疎水性膜挿入領域を有するように、組換えにより発現させることができる。細胞外小胞、細胞断片、および細胞を、エレクトロポレーションなどにより透過処理して、LSECtin結合部分が膜に

50

挿入され得るようにすることができる。

【0124】

IV. 関連する使用方法

本開示の組成物の様々な態様は、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、および免疫組織化学的検査などによるLSECtinタンパク質の検出、ならびに移植片拒絶反応、治療剤に対する免疫応答、自己免疫疾患、および食物アレルギーの処置を含むがこれらに限定されない種々の適用において使用される。

【0125】

いくつかの態様において、本開示の組成物は、抗原特異的な望ましくない免疫応答を調節する、特に下方制御するために用いられる。

10

【0126】

いくつかの態様において、本明細書において開示される組成物は、自己免疫および関連する病態、アレルギー、炎症性免疫応答、ならびにアナフィラキシーを引き起こす、患者において内因的に産生される抗体（すなわち、患者に投与された外因的抗体ではない）、ペプチド、および同様のものを含む、循環特異的な望ましくないタンパク質と結合し、それをクリアランスするのに有用である。

【0127】

いくつかの態様において、抗原は、免疫系を特異的に下方制御するための肝類洞内皮細胞（LSEC）を介する提示のため、または望ましくない循環タンパク質のクリアランスのために、肝臓に向けられる。

20

【0128】

本開示のいくつかの態様は、移植レシピエントがそれに対して望ましくない免疫応答（例えば、移植片拒絶反応）を生じる外来の移植片抗原、患者がそれに対して望ましくない免疫（例えば、アレルギーまたは過敏症）応答を生じる外来の抗原、患者がそれに対して望ましくない免疫応答（例えば、過敏症および/または治療活性の低下）を生じる治療剤、患者がそれに対して望ましくない免疫応答（自己免疫疾患）を生じる自己抗原を含むがこれらに限定されない自己抗原および外来抗原に対する望ましくない免疫応答を処置するための組成物および方法を提供する。

【0129】

本明細書において提供される方法および組成物を用いて処置され得る自己免疫疾患状態には、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）；急性間質性アレルギー性腎炎（薬物アレルギー）；急性壊死性出血性白質脳炎；アジソン病；円形脱毛症；全身性脱毛症；強直性脊椎炎；若年性関節炎；乾癬性関節炎；リウマチ性関節炎；アトピー性皮膚炎；自己免疫性再生不良性貧血；自己免疫性胃炎；自己免疫性肝炎；自己免疫性下垂体炎；自己免疫性卵巣炎；自己免疫性精巣炎；自己免疫性多腺性内分泌症候群1型；自己免疫性多腺性内分泌症候群2型；自己免疫性甲状腺炎；ベーチェット病；閉塞性細気管支炎；水疱性類天疱瘡；セリアック病；チャグ・ストラウス症候群；慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー；瘢痕性類天疱瘡；クローン病；コクサッキー心筋炎；ジューリング疱疹状皮膚炎；糖尿病（1型）；結節性紅斑；後天性表皮水疱症、巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）；巨細胞性心筋炎；グッドパスチャー症候群；グレーブス病；ギラン・バレー症候群；橋本脳炎；橋本甲状腺炎；IgG4関連硬化性疾患；ランバート・イートン症候群；混合性結合組織病；ムッハ・ハーベルマン病；多発性硬化症；重症筋無力症；視神経炎；視神経脊髄炎；尋常性天疱瘡およびバリアント型；悪性貧血；下垂体自己免疫疾患；多発性筋炎；心膜切開後症候群；早期卵巣機能不全；原発性胆汁性肝硬変；原発性硬化性胆管炎；乾癬；リウマチ性心疾患；シェーグレン症候群；全身性エリテマトーデス；全身性硬化症；潰瘍性大腸炎；未分化結合組織病（UCTD）；ぶどう膜炎；白斑；ならびにウェゲナー肉芽腫症が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0130】

本明細書において提供される方法および組成物を用いて処置され得る自己免疫疾患状態の特定の群には、急性壊死性出血性白質脳炎；アジソン病；乾癬性関節炎；リウマチ性関

50

節炎；自己免疫性再生不良性貧血；自己免疫性下垂体炎；自己免疫性胃炎；自己免疫性多腺性内分泌症候群1型；水疱性類天疱瘡；セリアック病；コクサッキー心筋炎；ジューリング疱疹状皮膚炎；糖尿病（1型）；後天性表皮水疱症；巨細胞性心筋炎；グッドパスチャー症候群；グレーブス病；橋本甲状腺炎；混合性結合組織病；多発性硬化症；重症筋無力症；視神経脊髄炎；悪性貧血；尋常性天疱瘡およびバリエーション型；下垂体自己免疫疾患；早期卵巣機能不全；リウマチ性心疾患；全身性硬化症；シェーグレン症候群；全身性エリテマトーデス；ならびに白斑が含まれるが、これらに限定されない。

【0131】

食物抗原などの、それに対して望ましくない免疫応答が生じる抗原を用いる態様において、処置は、例えば、ピーナッツ、リンゴ、乳、卵白、卵黄、カラシナ、セロリ、エビ、コムギ（および他の穀類）、イチゴ、ならびにバナナに対する応答のために提供され得る。

10

【0132】

いくつかの態様によると、患者を検査して、それに対して望ましくない免疫応答が生じた外来抗原を同定することができ、本開示の組成物をその抗原に基づいて開発することができる。

【0133】

V. 試験

ある特定の態様においては、本明細書において提供される組成物の、インビボでの肝臓および類洞内皮細胞（LSEC）への結合の特異性を確立することができる。これは、例えば、本開示の組成物においてマーカー（蛍光マーカー-Alexa Fluor 647など）を用いることによって達成され得る。組成物を適切な実験対象に投与する。対照、例えば、無関係のFabまたは媒体（生理食塩水）を、他の群の対象に投与する。組成物および対照を10分～5時間の間循環させ、その後対象の脾臓および肝臓を収集し、蛍光について測定する。蛍光が見出された特定の細胞を、その後同定することができる。あるいは、実験対象を、インビボ画像診断システムを用いてリアルタイムで画像化してもよい。本開示の組成物は、この様式で試験される場合、無関係のFabまたは媒体と比較して、肝臓の抗原提示細胞においてより高レベルの濃度を示す。

20

【0134】

単独の抗原、または無関係のFabとコンジュゲートされた抗原の投与と比較して、OVA（免疫学的試験における至適基準抗原）などの公知の抗原を組み込んだ本開示の組成物を投与し、結果として得られる抗体のレベルを測定することにより、液性免疫応答を試験することができる。いくつかの態様において、この様式で試験される場合の本開示の組成物は、いくつかの態様において、それらの投与および媒体の投与に反応して非常に低（例えば、バックグラウンド）レベルの抗体形成を示し、抗原または無関係のFabとコンジュゲートされた抗原の投与に反応して有意により高レベルの抗体形成を示す。

30

【0135】

疾患に焦点を置いた実験モデルは当業者に周知であり、これには自己免疫および寛容のNOD（または非肥満糖尿病）マウスモデルならびにヒト炎症性脱髄性疾患、多発性硬化症のためのEAE（実験的自己免疫性脳脊髄炎）モデルが含まれる。特に、完全フロイントアジュバント（CFA）で乳化したミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）またはMOG由来の免疫原性ペプチドによる免疫化は、免疫介在性脱髄、および多発性硬化症の症状を模倣する症状を引き起こす。FabをMOGまたはMOGペプチドと化学的にコンジュゲートさせるかまたはそれと共に組換えにより発現させて、EAEの予防および処置について評価することができる。

40

【0136】

移植寛容を測定するために、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）のH2-K^dハプロタイプを発現するBALB/cマウスから、上記のように細胞外小胞を単離する。Fabを、上記のように細胞外小胞にコンジュゲートさせる。Fab-EVを、完全なMHCミスマッチとして機能する、MHCのH2-K^bハプロタイプを発現するC57Bl/6Jマウスに注射する。Balb/cマウスからの尾部

50

皮膚を、以前にFab-EVを受けたC57Bl/6Jマウスの側腹部に移植する。移植片を、壊死または拒絶反応の徴候について毎日調べる。移植片は、20%超が壊死している場合、または剥がれ落ちた場合に、拒絶されたと見なされる。移植片は、移植の60日後に残存している場合に、許容されたと見なされる。

【0137】

VI. 投与

本開示の組成物は、治療的に有効な投与量、例えば、以前に記載された疾患状態のための処置を提供するのに十分な投与量で投与される。本開示の化合物の投与は、同様の有用性を果たす薬剤に関して許容された投与様式のいずれか介することができる。

【0138】

態様に応じて、一般的にはマウスにおいて、マウスにおける用量は約2.5 µg ~ 200 µg / グラム体重である。一般に、個々のヒト用量は、態様に応じて約0.01 ~ 2.0 mg / kg体重、約0.1 ~ 1.5 mg / kg体重、もしくは約0.3 ~ 1.0 mg / kg体重であるか、または終点を含め、列挙された用量の間の任意の用量である。処置は1日または数日間施行することができ、数日、1週間もしくは数週間、または1ヵ月もしくは数ヵ月の間隔で反復することができる。投与は、単一用量として（例えば、ボラスとして）、または最初のボラスおよびその後の完全用量の残存部分の、時間をかけた、例えば1~7日間にわたる連続注入として、であってよい。投与される活性化合物の量は、態様に応じて、以下のうちのいずれかまたはすべてに依存し得る：処置される対象および疾患状態、苦痛の重症度、投与の様式およびスケジュール、ならびに処方する医師の判断。投与される量が、抗原、抗体、抗体断片、またはリガンドの分子量、および態様によって変動し得るリンカーのサイズに依存し得ることもまた認識されるであろう。

【0139】

態様に応じて、本開示の組成物は、単独で、または他の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせる投与することができる。すべての典型的な投与経路が企図されるが、いくつかの態様は、注射に適した液体剤形を提供する。製剤は、従来の薬学的担体または賦形剤、および本開示の組成物または薬学的に許容されるその塩を含み得る。加えて、これらの組成物は、本開示の組成物において用いられる抗原(X)に対応する治療用タンパク質、ペプチド、抗体、または抗体様分子、ならびに葉酸代謝拮抗剤、免疫抑制剤、細胞増殖抑制剤、有糸分裂阻害剤、および代謝拮抗剤、またはそれらの組み合わせを含む、免疫調節剤として作用し得る、およびより具体的にはB細胞に対する阻害作用を有し得る他の活性剤を含むがこれらに限定されない、他の医薬、薬学的薬剤、担体、および同様のものを含み得る。

【0140】

一般に、意図される投与様式に依存して、薬学的に許容される組成物は、本開示の組成物を重量で約0.1% ~ 95%または約0.5% ~ 50%含有し、残りは適切な薬学的賦形剤、担体、等である。0.005% ~ 95%の範囲の活性成分を含み、残部が非毒性の担体から構成される剤形または組成物を調製することができる。

【0141】

液体の薬学的に投与可能な組成物は、例えば、本開示の活性組成物（例えば、凍結乾燥粉末）および任意の薬学的補助剤を、例えば、水（注射用水）、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール、グリコール、エタノール、または同様のものなどの担体中に溶解、分散などして、それにより溶液または懸濁液を形成することによって調製することができる。所望であれば、投与されるべき薬学的組成物はまた、湿潤剤、乳化剤、安定化剤、可溶化剤、pH緩衝剤、および同様のものなどの微量の無毒性補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、ソルビタンモノラウレート、酢酸トリエタノールアミン、およびオレイン酸トリエタノールアミン、等、オスモライト、アミノ酸、糖および炭水化物、タンパク質およびポリマー、塩類、界面活性剤、キレート剤および抗酸化剤、保存剤、ならびに特定のリガンドを含有し得る。そのような剤形を調製する実際の方法は、当業者に公知であるかまたは明白であろう。投与されるべき組

10

20

30

40

50

成物または製剤は、いずれにしても、処置を受ける対象の症状を処置するのに有効な量の活性化化合物の量を含む。

【実施例】

【0142】

VII. 実施例

以下の実施例および図面は、本明細書において開示される本発明の非限定的な態様を実証するために含めるものである。実施例または図面において開示される技法は非限定的な技法を表すことが、当業者によって認識されるべきであり、当業者は、本開示を考慮して、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、開示される特定の態様において多くの変更を行い、なお同様のまたは類似の結果を得ることができることを認識すべきである。

【0143】

実施例1

標的LSEctin形態の設計および発現

マウスLSEctinの全長配列をGenscriptに注文した。膜貫通ドメインおよびサイトゾルドメインを欠いたLSEctinタンパク質を生成するために、PCR増幅を実施して、アミノ酸54~294、100~294、および155~294に対応するLSEctinの3つの変種を作製した。分泌された可溶性タンパク質の発現を可能にするために、ベクターのN末端に、ラミニン-11由来の分泌シグナルを付加した。部位特異的なピオチン化を可能にするために、ラミニンサブユニットガンマ11分泌シグナル

(MPALWLGCCCLCFSLLLPAARNLAGT (SEQ ID NO:46))

に続いて、SNAPタグ (NEB) の配列を付加した。Ni-NTAカラム上でのタンパク質精製を可能にするために、ベクターのC末端に、トロンピン切断可能部位およびそれに続く (His)₆タグを含めた。配列全体をpHEK293 Ultra発現ベクター (Takara) にクローニングした。このプラスミドを、細胞100万個/mLで播種したHEK懸濁細胞にトランスフェクトした。6~8日間の培養後、上清を収集し、0.22 μMフィルターに通し、Akta pure 25 Mシステム (GE Healthcare) 上のHisTrapカラムで精製した。タンパク質を25 mM Tris-HCl、300 mM NaCl中の30 mMイミダゾールで洗浄し、25 mM Tris-HCl 300 mM NaCl中の500 mMイミダゾールで溶出した。SNAP-LSEctinを5 Lの25 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、10 mM CaCl₂に対して一晩透析した。SNAP-LSEctinの長期保存のために、10%グリセロールを添加し、タンパク質を-80 °Cで保存した。

【0144】

実施例2

ファージライブラリーの選択

使用したファージライブラリーは、University of ChicagoのAnthony Kossiakoffにより供与された。ライブラリーは、抗HER2抗体4D5に基づいたヒト化Fabからなる。6つの相補性決定領域 (CDR) のうち、軽鎖からのCDR-L1およびCDR-L2は一定であり、CDR-L3、CDR-H1、およびCDR-H2は限定的な多様性を有し、CDR-H3は完全にランダム化されている。ライブラリーの実際の多様性は 3×10^{10} であり、これは広範囲の標的を網羅し得る。

【0145】

実施例3

ファージのスクリーニング

3つのSNAP-LSEctin変種のそれぞれ1 μMを、製造業者のプロトコール (SNAP-biotin、NEB) に従ってピオチン化した。第1ラウンドでは、ファージ 5×10^{12} 個を、PBST-BSA (PBS、0.05% Tween、0.5%ウシ血清アルブミン) 中の200 μL磁気ストレプトアビジンビーズ (Promega) に並行して結合された1 μMのLSEctinの全3種の変種に対して、室温で1時間パニングするために使用した。磁気ビーズをPBST-BSAで4回洗浄した。トロンピンを用いて、ファージをビーズから溶出させた。溶出されたファージを、5 mLのXL1 BlueとM13-K07ヘルパーファージと共に37 °Cで一晩インキュベートして、ファージを増殖させた。細胞をペレット化し、ファージを含む上清を保持した。上清にPEG-NaCl (20% PEG 8k、2.5 M NaCl) を等量添加して、ファージを沈殿させた。ファージを遠心分離し、パニングの次のラウ

10

20

30

40

50

ンドのためにPBST-BSA中に懸濁した。次のパニングでは、KingFisherプレートを、図1に示されるようなプレート設定で、KingFisher装置と共に使用した。最初の行は、ストレプトアビジンビーズ (Dynabeads) と、第2、第3、第4、および第5ラウンドのディスプレイに対応する300 nM、150 nM、75 nM、または20 nMビオチン化LSEctin変種を含んでいた。次のウェル行は、潜在的なSNAP結合体を除去するために、ファージおよび2 μMビオチン化SNAPタンパク質を含有した。次の行は、ストレプトアビジンビーズ上のビオチン部位を飽和させるための1 μM ビオチンを含有した。次の4つの行は、洗浄するための1 μM SNAPを含有した。最後の行は、ファージを溶出させるためにトロンピンを含有した。すべての段階でTBS + 10 mM CaCl₂を含んでいた。溶出されたファージをXL1、ヘルパーファージ、およびアンピシリンと共に37 °Cで一晩インキュベートした。

10

【 0 1 4 6 】

実施例4

ファージの配列決定

3つのLSEctin変種のそれぞれにおいて5ラウンドのパニングを行った後、ファージを有するXL1を、アンピシリンを補充したLB-アガープレート上にプレーティングした。単一クローンを、96ディープウェルプレートにおいて、100 μg/mLアンピシリンおよびM13-K07ヘルパーファージを補充した400 μL 2XYT中で、37 °Cで一晩増殖させた。LSEctinの3つの変種におけるパニングに対応する3枚のプレートを、University of ChicagoのDNA Sequencing Core Facilityに送付した。

20

【 0 1 4 7 】

実施例5

ヒットFabの発現

配列決定された3枚のプレートのうち、すべてのクローンが収束した6つの配列が存在した (図2)。フォワードプライマー

5'-CGCAACTTATTACTGTCAGC-3' (SEQ ID NO:47)

およびリバーズ相補体

5'-AGACGGTGACCAGGGTTCC-3' (SEQ ID NO:48)

を使用して、Fabの軽鎖および重鎖配列をSuperFi PCR (Invitrogen) を用いてPCR増幅し、ゲル上で泳動した。関心対象の配列を切り出し、ゲル精製した。pSFV4プラスミドを (NdeI切断部位) を用いて切断し、InFusion Cloning Kitを用いてFab PCR断片をライゲーションするのに使用した。ライゲーションされた産物をStellarコンピテント細胞にトランスフェクトし、アンピシリンを補充したLB-アガープレート上にプレーティングした。単一クローンを配列決定して、適切なライゲーションを確認した。Fab-pSFV4プラスミドを、アンピシリンを補充した5 mLの2XYTの終夜培養物中でBL21-DE3にトランスフェクトした。大腸菌 (E. coli) を、4Lフラスコ中、100 μg/mLアンピシリンを補充した2XYTの1L体積で、0.6~0.8の光学濃度が達成されるまで生育させた。次いで、タンパク質発現を1 mMイソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシドで4時間誘導した。細胞を遠心分離により収集し、-20 °Cで保存した。翌日、細胞ペレットを、プロテアーゼ阻害剤およびベンゾナーゼを補充した30 mLのリン酸緩衝生理食塩水中に懸濁し、氷上で超音波処理した。溶解液を10,000 RPMで遠心沈殿させて破片を除去し、上清を、Anthony Kossiakoffにより提供されたプロテオミクスと共に4 °Cで一晩インキュベートした。樹脂を1000 RPMで2分間遠心沈殿させ、続いてリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。500 mM NaClを含む30カラム体積のリン酸緩衝生理食塩水で、樹脂を洗浄した。Fabを100 mMグリシン、pH 2.6で溶出させた。タンパク質解析を伴うアッセイについては、Fabを1 M Tris-HCl、pH 8で中和し、5 Lリン酸緩衝生理食塩水に対して一晩透析した。Fabのインビボ使用を伴うアッセイについては、Fabを100 mMグリシン pH 2.6で溶出した時点で、エンドトキシンを除去するためにFabを陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。簡潔に説明すると、FabをHiTrapカラム (GE Healthcare) に適用し、50mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.5で洗浄した。Fabを、50 mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.5中の600 mM NaClまでの勾配で溶出させた。画分をプールし、5 LのPBSに対して透析した。透析後、試料を10,000分子量カットオフ超遠心フィルター (Amico

30

40

50

n) で濃縮した。

【0148】

実施例6

LSECtinへのFab結合を検証するためのフローサイトメトリー

1 μ M SNAP-LSECtinを1 μ M SNAP-ビオチン (NEB) および1 mM DTTと共に室温で30分間インキュベートした。100 μ Lのビオチン化SNAP-LSECtinを、800 μ LのTris-HCl, pH 5.5中で100 μ Lのアビジンポリスチレンビーズ (Spherotech) と共に、ローテーター上で室温で1時間インキュベートした。30 μ Lのビーズ + SNAP-LSECtinを5 mLポリスチレンチューブ (Falcon) に添加し、2 mL TBS + 2% BSA + 10 mM CaCl₂で洗浄し、2000 RPMで5分間遠心沈殿させた。上清を廃棄し、Fabを5 μ g/mLの最終濃度で、室温で15分間添加した。試料を2 mL TBS + 2% BSA + 10 mM CaCl₂で洗浄し、2000 RPMで5分間遠心沈殿させた。抗ヒトF(ab)₂-Alexa Fluor 594二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) を1 μ g/mLの最終濃度で、室温で15分間添加し、洗浄した。フローサイトメトリー解析のために、試料をFortessa (BD) に供した。発現された全6つのFabのうち、YEEと称される、CDRH3「YEEWAYYSSEMAF」(SEQ ID NO:17) を有するFabが (図3; 無関係のFabが破線、YEEが実線)、LSECtinへの結合の増強を示すと考えられた。CDRが強調されたYEEの完全な配列は、図4Aに見出すことができ、A1A1については図4Bに見出すことができる。

10

【0149】

実施例7

LSECへのFab結合のインビトロ検証

LSECへのFabの結合をインビトロで確認するために、LSECを以前に記載されたようにマウス肝臓から単離した (Meyer et al., Exp. Cell Res. 349:291-301, 2016)。簡潔に説明すると、マウスを屠殺し、カテーテルを下大静脈に挿入した。肝臓を、12.5 μ mol EGTA、125単位ヘパリン、62.5 μ L 40%グルコース、625 μ mol HEPES、および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充した25 mLのカルシウム不含HBSSで灌流した。肝臓を消化するために、肝臓を次いで、GlutaMax、25 mgコラゲナーゼIV (Worthington) および2 μ g DNase I (Sigma) を補充したIMDMで加熱ランプ下で灌流した。肝臓を摘出し、細胞を直ちにペトリ皿に取り出し、70 μ M細胞濾過器に通した。細胞を68 \times gで遠心分離して、ペレット化した肝細胞を取り出した。上清を600 \times gで遠心分離して、残りの全細胞をペレット化した。細胞を10 mLのDMEM中に懸濁した。最下層として20 mLの50% Percoll、最上層として20 mLの25% Percollを置き、および最上部に10mLの細胞懸濁液を重層することにより、2段階のPercoll勾配を作製した。細胞を直ちに、ブレーキなしで1350 \times gで遠心した。2つの勾配間に生じた細胞の層を採取し、PBSで洗浄した。細胞を最初にLive/Dead生存率色素 (Invitrogen) およびFcブロック (BD) で染色した。細胞をPBS + 2% FBSで洗浄した。細胞を、CD31、スタビリンII、およびCD45について、ならびに5 μ g/mL Fabで、4 で30分間染色した。細胞をPBS + 2% FBSで洗浄し、APC結合抗Fabの1:400希釈物で4 で15分間染色した。細胞を洗浄し、2%パラホルムアルデヒドで4 で15分間固定した。細胞を洗浄し、フローサイトメトリーにより解析した (図5)。

20

30

【0150】

実施例8

モデル抗原を用いた動物モデルにおける評価

抗原特異的T細胞寛容を誘導する能力を測定するために、モデル抗原であるオボアルブミンの誘導体を、Gly₃Serリンカーにより隔てて、YEE Fabの重鎖のC末端において組換えにより発現させた。具体的には、OTI TCRによって認識されるオボアルブミンのCD8エピートープ、「SIINFEKL」(SEQ ID NO:115)、またはOTII TCRによって認識されるオボアルブミンのCD4エピートープ、

「ISQAVHAAHAEINEAGREVVG」

(省略して「ISQ」とも称される、SEQ ID NO:116) を発現させた。これらには、天然抗原切断部位に関するアミノ酸が隣接していた。500,000個のOTI細胞またはOTII細胞をC57/

40

50

BL6マウスの尾静脈に注射した。1日後または7日後に、マウスに40ピコモルの YEE-SIINFEKL(‘YEEWAYYSSEMAF’-‘SIINFEKL’(SEQ ID NO:117)

YEE-ISQ

(‘YEEWAYYSSEMAF’-‘ISQAVHAAHAEINEAGREVVG’(SEQ ID NO:118)

、遊離SIINFEKL (SEQ ID NO:115) ペプチド、遊離ISQペプチド、または生理食塩水を注射した。13日目に、マウスに、足蹠への10 µgのオボアルブミンと50 ngのリポ多糖、または生理食塩水(未処置対照)のいずれかを負荷した。18日目にマウスを屠殺し、リンパ節および脾臓を、図6A~Bに見られるように、OTI細胞およびOTII細胞の数、抗原による再刺激時にエフェクター分子(例えば、インターフェロンガンマ)を合成する能力、ならびに枯

10

渇または寛容のマーカーについて解析した。

【0151】

実施例9

Fabの自己免疫抗原に対する融合

自己免疫抗原に対する寛容を誘導するために、抗LSEctin Fabを、該自己免疫抗原もしくはその誘導体と共に組換えにより発現させるか、またはそれと化学的にコンジュゲートさせることができる。多発性硬化症の主要な免疫標的であるミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質の免疫優性エピトープに対する寛容を誘導するために、MOG₃₀₋₆₀を、Fabと共に、例えばFabの重鎖のC末端において組換えにより発現させることができるが、同様にLSEctinへの結合を破壊しないFab中の他の位置において発現させることもできる。発現された抗原は、免疫原性エピトープが天然で起こる通りにプロセッシングされ提示されるように、オボアルブミンの免疫優性エピトープについて上記で行われたように、タンパク質中に天然切断部位を含むことになる。これは任意の自己免疫抗原に対して行うことができる。

20

【0152】

実施例10

Fabの細胞外小胞への結合

細胞外小胞上の抗原に対する寛容を誘導するために、例えば主要組織適合遺伝子に対する寛容を誘導するために、抗LSEctin Fabを細胞外小胞にコンジュゲートさせることができる。これは、化学的コンジュゲーションによって、または上記のような種々の他の方法によって行うことができる。コンジュゲーション戦略の一例は、Fabを、遊離チオールを有するシステインを含むように組換えにより発現させ得ることである。スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸(スルホ-SMCC)は、一方ではそのマレイミドをFab上の遊離チオールと反応させ、他方ではNHS-エステルを細胞外小胞上の遊離アミンと反応させるために使用することができる。

30

【0153】

実施例11

LSEctinへのFAB結合に関する酵素結合免疫吸着アッセイ

Nunc MaxiSorpプレートを、炭酸水素ナトリウム緩衝液中の10 µg/mL LSEctinで、4℃で一晩コーティングした。ELISAプレート洗浄機を用いて、プレートをPBSTで3回洗浄した。プレートをPBS + 2% BSA中で、室温で2時間ブロッキングした。ELISAプレート洗浄機を用いて、プレートを3回洗浄した。Fabを、PBS + 2% BSA中の30 pM ~ 125 nMの濃度で、室温で2時間添加した。ELISAプレート洗浄機を用いて、プレートをPBSTで5回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗F(ab)₂ IgG (Jackson ImmunoResearch)をPBS + 2% BSAで1:5000希釈して、室温で1時間添加した。ELISAプレート洗浄機を用いて、プレートを5回洗浄した。TMB基質を添加し、10%硫酸で反応停止した。プレートを450 nmの波長および570 nmの参照波長において分光光度計で読み取った。データを図6に示す。これらのデータにより、本明細書において開示されるいくつかの態様と一致して、本明細書において作製および記載されたFab構築物が、濃度に対する光学濃度の上昇によって明らかのように、LSEctinに結合する能力を有することが実証される。

40

50

【 0 1 5 4 】

実施例12

肝臓切片への抗LSECtin Fab結合の免疫蛍光検査

マウスをハックス緩衝塩類溶液、続いて亜鉛固定液で灌流して、肝臓を固定した。肝臓を亜鉛固定液で一晩固定し、10%スクロース溶液に移して4℃で24時間置き、次いで30%スクロース溶液に移して4℃で24時間置いた。肝臓を瞬時凍結し、凍結切片を作製した。切片を、TBST中の0.5%カゼイン中で、A1A1抗LSECtin Fabまたは無関係のFab対照で一晩、およびラット抗マウススタビリン2 (MBL International) で、4℃で染色した。切片を洗浄し、TBST中の0.5%カゼイン中で、抗ヒトF(ab)₂ Alexa Fluor 594 (Jackson ImmunoResearch) および抗ラットAlexa Fluor 488二次抗体で、室温で1時間染色した。切片をProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies) を用いて封入し、Olympus共焦点顕微鏡上で画像化した。データを図7に示す。(A)スタビリン2およびA1A1で染色し、60×倍率で画像化したマウス切片。(B)A1A1で染色し、20×倍率で画像化したマウス切片。(C)A1A1で染色し、60×倍率で画像化したサル切片。

10

【 0 1 5 5 】

実施例13

抗LSECtin Fabの取り込み解析

LSECを上記のようにマウスから単離し、CD31およびスタビリン2の発現ならびにCD45およびF4/80の欠如に基づいて選別した。(図8A) Fabを重鎖上のmCherryと共に組換えにより発現させた。Fab-mCherryをLSECに4℃で20分間添加し、洗浄して過剰のFabを除去した。LSECを37℃でインキュベートしてエンドサイトーシスを可能にし、続いて抗Fab抗体で染色した。(図8B) LSECをA1A1-mCherryまたは無関係のFab-mCherryと共に37℃で2時間インキュベートし、mCherryの蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。図8Bにおいて検出され示されたシグナルの増強は、FabがLSECによって取り込まれた(例えば、エンドサイトーシスされた)ことを示し、これはさらに、本明細書において開示される寛容原性組成物がLSECによって(LSECtinへの結合を介して)内部移行され、免疫系により自己として認識されるべき抗原のプロセッシングをもたらし、このようにして抗原に対する寛容を誘導することを示す。

20

【 0 1 5 6 】

実施例14

インビボにおける抗LSECtin Fabの生体内分布

インビボにおいてLSECに局在化する能力を測定するために、抗LSECtin Fab A1A1およびD3C9、無関係の特異性のFabを、近赤外蛍光小分子のDY-800 (Dyomics) にコンジュゲートさせた。25 μgのFab-800をヌードマウスに注射した。25分後、60分後、および24時間後に、ヌードマウスにおいて蛍光を測定した (IVIS, Perkin Elmer) (A)。図8Aは、無関係の特異性であるFabとは対照的に、Fab A1A1が肝臓への高度に特異的な局在化をもたらすことを示す画像データを示す。同様に、Fab D3C9もまた、インビボにおいて肝臓への局在化を示した。(B) LSECによる特異的な取り込みを測定するために、Fabを蛍光色素DY-649 (Dyomics) にコンジュゲートさせた。2.5 μgのFab-649をマウスに注射し、注射の30分後にマウスを屠殺した。LSECを実施例7と同様に単離し、649 nmシグナルの平均蛍光強度によって示されるFabの存在についてフローサイトメトリーにより解析した。これらのデータにより、インビボ投与後のLSECへのFab A1A1 (非限定的な例として) の局在化の増加が示される。上記のように、これらのデータにより、寛容が所望される抗原に結合されたLSECtin結合剤を含む寛容原性組成物の局在化(例えば、肝臓への)が支持される。

30

40

【 0 1 5 7 】

実施例15

Fabとペイロードとの間のカテプシン切断可能リンカーの設計

酸性区画における分離、ならびに分解および抗原提示の増強を可能にするために、カテプシン切断可能リンカーをFabとペイロードとの間に設計した。RNAseqデータにより、LSECにおいて最もよく見られるカテプシンが、カテプシンLおよびカテプシンBであることが

50

明らかになる (Ding et al., Mol. Cell Proteomics 15:3190-202, 2016)。細胞をそれぞれのカテプシンと共にインキュベートした後、ペプチド単離物に対して質量分析を行い、予測されるカテプシン特異性を同定したSudoら (Sudo et al., J Control Release 255:1-11, 2017) から、潜在的な配列を得た。配列は、存在量および予測されたカテプシン特異性に対する忠実性に基づいて選択した。Fabは、Gly₄Serリンカー、カテプシン切断可能な配列、およびペイロード (OVAまたはmCherry) を有するように設計した。カテプシン切断可能リンカーによって隔てられたペイロードを有するFab構築物がカテプシンによって切断されたかどうかを判定するために、タンパク質を0.2 μg/mLで、1:100マウスカテプシンLと共にpH 6またはpH 7.5において37 °Cで様々な時間インキュベートした。

カテプシン切断可能リンカーの配列：

CtsL1 YGYTHLSTGDLLR (SEQ ID NO:97)

CtsB LPPPIGGAGPPLGLPK (SEQ ID NO:98)

CtsL5 LFIGGLSFET (SEQ ID NO:99)

【 0 1 5 8 】

実施例16

抗原提示を増強するためのエンドソーム脱出-Fab融合物の設計

クラスI MHC提示を増強するために、Fabを、エンドソーム脱出ペプチドを含むように設計した。Fabの内部移行およびサイトゾル区画への送達の後、エンドソーム脱出ペプチドは、エンドソームからのFab-ペイロードの放出、細胞質への移行、およびプロテアソームによる分解を可能にする。これはクラスI MHC上の提示の増強をもたらす。エンドソームからのペイロード脱出を促進するために、カテプシン切断可能リンカーを利用したエンドソーム脱出ペプチドの様々な型を設計した。インフルエンザ赤血球凝集素由来のHA2膜融合ペプチド変種であるINF7は、エンドソーム脱出を増強することが広く実証されているという理由で選択した (Plank et al., Journal of Biological Chem, 1994)。胎盤発生に参与するヒト膜融合タンパク質であるシンシチン1由来の第2の膜融合ペプチドは、その移動能力のために選択した (Sudo et al., J Control Release 255:1-11, 2017)。報告により、エンドソーム脱出ペプチドはエンドソームを破裂させ得るが、カーゴは膜内に捕捉され得ることが実証されている。これを克服するために、脱出ペプチドが膜に結合すると、カテプシンがペイロードを切断することができ、それが細胞質に放出され得るように、カテプシン切断可能リンカーを脱出ペプチドと共に付加した。カテプシン切断可能リンカーに加えて、リンカーがエンドソームまたはリソソーム内で還元され、ペイロードがエスケープペプチドから放出されるように、SPDPなどの様々なリンカーを使用して、Fab、ペイロード、およびエンドソーム脱出ペプチドを結合させてもよい。

	INF7	シンシチン1
Fab-X-Cts-EEP	GGGSGGGGSYGYTHLSTGD LLRGLFEAIEGFIENGWEGMID GWYG (SEQ ID NO:101)	GGGSGGGGSLFIGGLSFETPFVIGAGVLGAL GTGIGGI (SEQ ID NO:102)
Fab-EEP-Cts-X	GGGSGGGGSGAAAGLFEAIE GFIENGWEGMIDGWYGYTHL STGDLLR (SEQ ID NO:103)	GGGSGGGGSGAAAPFVIGAGVLGALGTGI GGLSFE (SEQ ID NO:104)
Fab-EEP-X	GGGSGGGGSGAAAGLFEAIEG FIENGWEGMIDGWYG (SEQ ID NO:105)	GGGSGGGGSGAAAPFVIGAGVLGALGTGI GGI (SEQ ID NO:106)
Fab-X-EEP	GGGSGGGGSLFEAIEGFIENG EGMIDGWYG (SEQ ID NO:107)	GGGSGGGSPFVIGAGVLGALGTGIGGI (SEQ ID NO:108)
Fab-リンク-X-EEP	GGGSC-リンカー-X- GGGSGGGGSLFEAIEGFIENG WEGMIDGWYG (SEQ ID NO:109)	GGGSC-リンカー-X- GGGSGGGSPFVIGAGVLGALGTGIGGI (SEQ ID NO:110)
Fab-X-リンク-EEP	X-GGGSC-リンカー- GGGSGGGGSLFEAIEGFIENG WEGMIDGWYG (SEQ ID NO:111)	X-GGGSC-リンカー- GGGSGGGSPFVIGAGVLGALGTGIGGI (SEQ ID NO:112)

10

20

30

40

50

ここで、Xはペイロードであり、Ctsはカテプシン切断可能リンカーであり、EEPはエンドソーム脱出ペプチドであり、およびリンカーは酸性区画内で還元され得る化学リンカーである。

【0159】

実施例17

エンドソーム脱出変種の評価

エンドソーム脱出ペプチドを有するFabが細胞質に脱出する能力を評価するために、Fabを、前述の配列（実施例12）およびペイロードとしてのmCherryと共に組換えにより発現させる。LSECを上記のように単離し、ガラスカバースリップ上で培養する。LSECをFab-EEP-mCherry変種と共に4で20分間インキュベートする。LSECを次いで37で1時間インキュベートし、洗浄し、2%パラホルムアルデヒドで固定し、初期および後期エンドソーム区画のマーカで染色し、共焦点顕微鏡を使用して画像化する。mCherryがもはやエンドソームマーカとの共同が見られず、むしろ細胞質内で拡散している場合に、脱出ペプチドは有効であると見なされる。並行して、LSECを単離し、Fab-mCherryエンドソーム脱出変種をパルスし、格子光シート顕微鏡でライブ画像化して、エンドソーム区画からのライブ脱出を観察する。

10

【0160】

実施例18

インビトロにおけるクラスIおよびクラスII MHC上の提示

カテプシン切断可能リンカーおよびエンドソーム脱出ペプチドを有する前述のすべての変種を、ペイロードとしてのオボアルブミンと共に組換えにより発現させる。LSECを単離し、培養する。LSECに100 μg/mL Fab-OVAカテプシンおよびエンドソーム脱出変種を12~16時間パルスし、クラスI MHC上に提示されたCD8免疫優性エピトープSIINFEKLを認識する抗H2-Kb-SIINFEKL抗体で染色する。並行して、それぞれクラスI MHCおよびクラスII MHC上に提示されたオボアルブミンのCD8およびCD4エピトープを認識するOTIおよびOTII T細胞を、Fab-OVA変種をパルスしたLSECに添加し、増殖および活性化のマーカについて評価する。

20

【0161】

実施例19

モデル抗原に対する寛容

インビボでモデル系における寛容を判定するために、上記の実験で最良の抗原提示を示したFab-OVA変種を発現させる。OTI細胞およびOTII細胞をマウスに養子移入し、続いてFab-OVA変種を静脈注射する。マウスに、足蹠へのオボアルブミンおよびリボ多糖の皮下注射を負荷する。4~7日後にマウスを屠殺し、T細胞応答をアネルギーおよび寛容のマーカについて測定する。

30

【0162】

明瞭性および理解の目的で、前述のものを説明および実施例によってある程度詳細に記載してきたが、本開示の精神から逸脱することなく修正が行われ得ることが、当業者によって理解されるであろう。したがって、本明細書において開示された形態は例示に過ぎず、本開示の範囲を限定することは意図されず、むしろ本発明の態様の真の範囲および精神に付随するすべての修正および代替物をも包含することが意図されることが明白に理解されるべきである。

40

【0163】

上記で開示された態様の特定の特徴および局面の様々な組み合わせまたは部分的組み合わせがなされてもよく、なお本発明の1つまたは複数の範囲に入ることが企図される。さらに、1つの態様と関連した任意の特定の特徴、局面、方法、特質、特性、品質、性状、要素、または同様のものの本明細書における開示は、本明細書に記載されるすべての他の態様において使用することができる。したがって、開示された態様の様々な特徴および局面は、開示された発明の様々な様式を形成するために、互いに組み合わせるまたは置き換えることができることが理解されるべきである。よって、本明細書において開示された本

50

発明の範囲は、上記に開示された特定の態様によって限定されるべきではないことが意図される。さらに、本発明は様々な修正および代替形態を受け入れやすいが、それらの具体例は図面に示されており、本明細書に詳細に記載されている。しかしながら、本発明は開示された特定の形態または方法に限定されるものではなく、反対に、本発明は、記載される様々な態様および添付の特許請求の範囲の精神および範囲内に入るすべての修正、等価物、および代替物を包含することが理解されるべきである。本明細書において開示されたいずれの方法も、列挙された順序で行われる必要はない。本明細書において開示された方法は、実行者によって行われるある特定の動作を含むが、任意の第三者によるそのような動作の指示もまた明示的または暗示的に含み得る。例えば、「LSEctin結合タンパク質を投与する」などの動作は、「LSEctin結合タンパク質の投与を指示する」を含む。加えて、本開示の特徴または局面がマーカッシュ群の観点から記載されている場合、当業者は、本開示がまたそれにより、そのマーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループの観点からも記載されていることを認識するであろう。

10

20

30

【0164】

本明細書において開示される範囲は、ありとあらゆる重複、部分範囲、およびそれらの組み合わせもまた包含する。「最大で～まで」、「少なくとも」、「～を超える」、「～未満」、「～の間」、および同様のものなどの言語は、列挙される数字を含む。「約」または「およそ」などの用語が先行する数字は、列挙される数字を含む。例えば、「約90%」は「90%」を含む。いくつかの態様において、少なくとも95%相同は、参照配列と96%、97%、98%、99%、および100%相同を含む。加えて、配列がヌクレオチドまたはアミノ酸配列を「含む」として開示される場合、そのような参照は、別段の指示がない限り、この配列が、列挙される配列「を含む」、「からなる」、または「から本質的になる」ことも含むものとする。

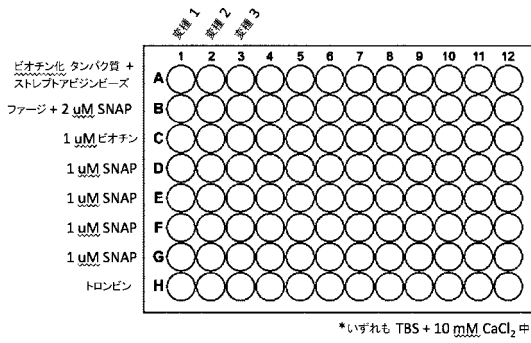
【0165】

本出願において用いられる用語および語句、ならびにその変化形は、特に添付の特許請求の範囲において、他に明示的に述べられていない限り、限定的とは対照的に非制限的として解釈されるべきである。前述の一例として、「含む」という用語は、「非限定的に含む」、「含むがそれに限定されない」、または同様のものを意味するように読み取られるべきである。

【0166】

不定冠詞「1つの(a)」または「1つの(an)」は、複数を排除しない。例えば、分子量の値および範囲を規定するために本明細書で用いられる「約」という用語は、表示の値および/または範囲の限界が±20%以内、例えば±10%以内で変動し得ることを意味する。数字の前の「約」の使用は、その数字自体を含む。例えば、「約5」は「5」の明示的な支持を提供する。範囲で提供される数字は、重複する範囲およびその間の整数を含む；例えば、1～4と5～7の範囲は、例えば、1～7、1～6、1～5、2～5、2～7、4～7、1、2、3、4、5、6、および7を含む。

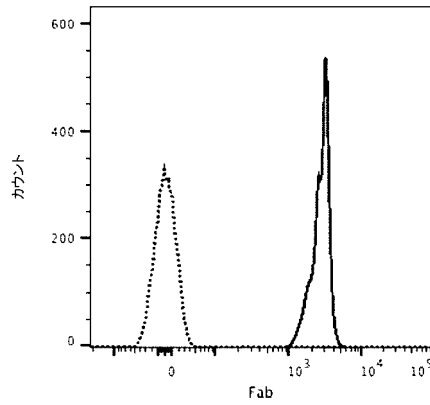
【 図 1 】



【 図 2 】

名称	CDRL3	CDRH1	CDRH2	CDRH3	出現回数
A1A1	SYWYPV	LSSSSI	SISSYGYTY	NDDWYIWDWYYTRWYGL	46
E1B2	SPWWGPI	FSYYSI	SIYPYSGYTS	YSYEWRLYLQYFWLGL	1
A6B8	SSSLI	VYYSI	SISPSSTYS	WYWDYFWWHQEAL	30
D3C9	YVRYYGPI	ISSSI	SISPSYGSTY	YWHWGFYWAYGYGFI	1
HPW	YGSSPI	FYSYI	YISPSGYTS	HPWYWTNYWFYEYGL	13
YEE	YLAYQSP	VYSYI	SISSYSYTS	YEEWAYYSSEMAF	82
HDS	SSSLI	VYYSI	YIYSYSGTS	HDSWYPYEQRWGL	9
YQE	SYHWLI	VYSYI	SIYPYSGYTS	YQEQYGSYFGGAL	27
PAP	SSSLI	FSSSI	YISSYGYTS	PAPQLGLGEKGL	1
YQH	YPSLLI	VYYSI	SIYSGYTS	YQHYYPWGYRYLSSAM	1

【 図 3 】



【 図 4 A 】

軽鎖: SEQ ID NO:1
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQKPKAPKLLI
 YSASSLYSGVPSRFRSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLAYS
 PLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

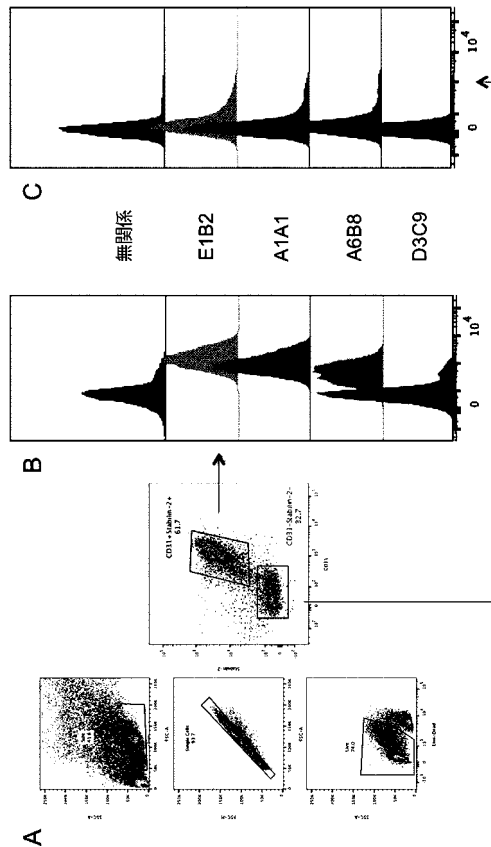
重鎖: SEQ ID NO:2
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNVSYSIIHWVRQAPGKGLE
 WVASISSYYSYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 YCARNDWYIWDWYYTRWYGLDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC

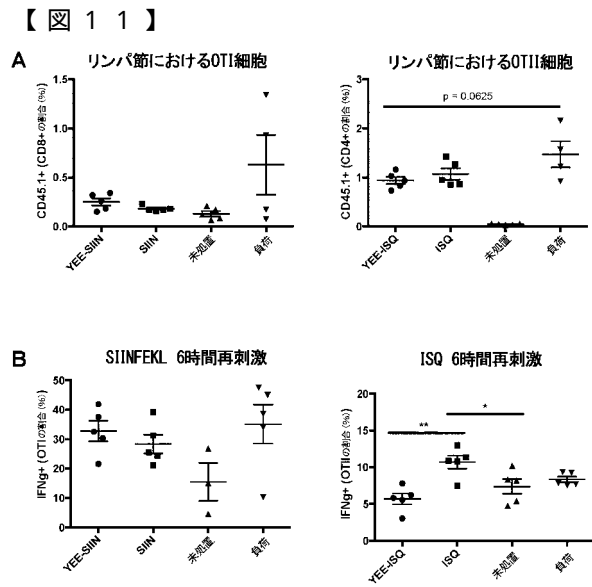
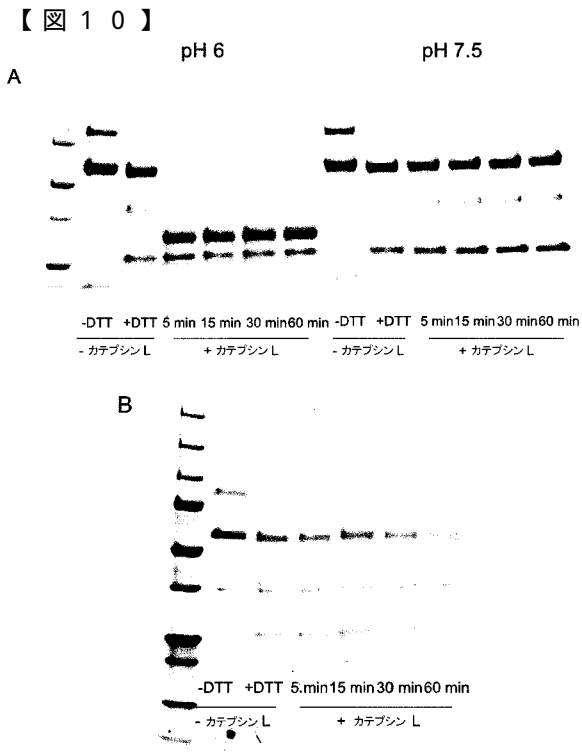
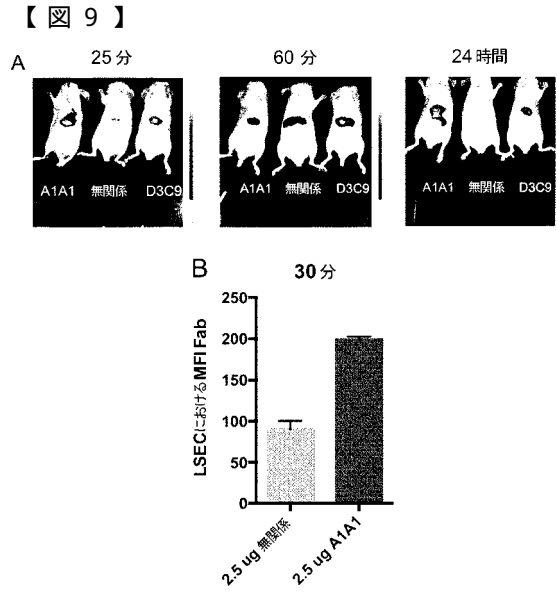
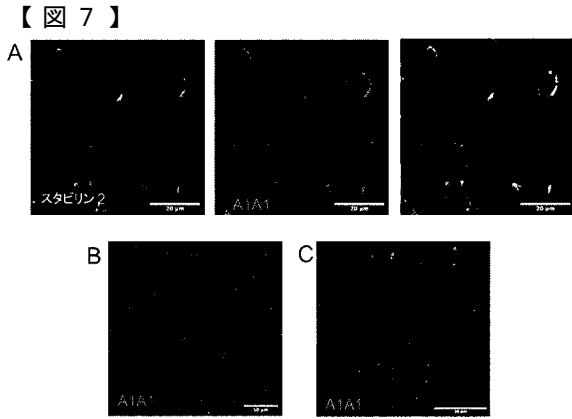
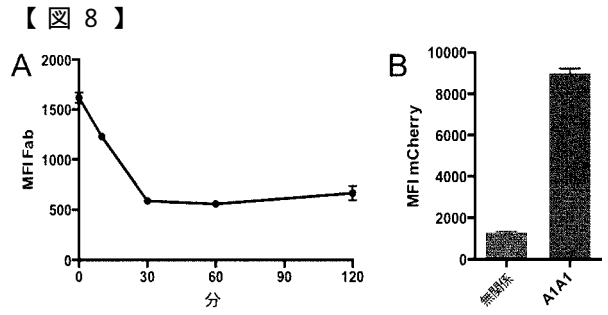
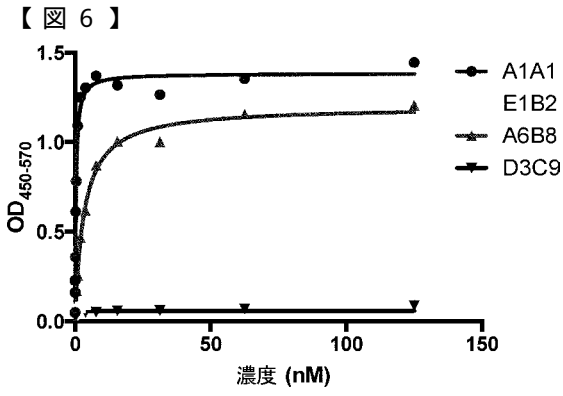
【 図 4 B 】

軽鎖: SEQ ID NO:113
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQKPKAPKLLI
 YSASSLYSGVPSRFRSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYWYP
 VTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重鎖: SEQ ID NO:114
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSYSIIHWVRQAPGKGLE
 WVASISSYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 YCARNDWYIWDWYYTRWYGLDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA
 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC

【 図 5 】





【配列表】

2021519305000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 19/24052
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/18; C07K 16/28; C07K 19/00; A61K 39/00; A61K 39/395 (2019.01) CPC - A61K 39/0008; A61K 39/001; A61K 47/6811; C07K 16/18; C07K 16/28; C07K 2319/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	DOMINGUEZ-SOTO et al. The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. <i>Blood</i> , 15 June 2007, Vol 109, No 12, Pages 5337-5345. Especially abstract, pg 5341 col 1 para 1, pg 5344 Fig 7 legend, pg 5344 Fig 7C	70, 71, 75, 81-84 ----- 1-42, 49-60, 62, 63, 65-68, 72, 74
Y --- A	KONTOS et al. Engineering antigen-specific immunological tolerance. <i>Curr Opin Immunol</i> , August 2015, Vol 35, Pages 80-88. Especially pg 82 col 2 para 2	70, 71, 75, 81-84 ----- 1-42, 49-60, 62, 63, 65-68, 72, 74
A	US 2011/0123536 A1 (CHERMANN et al.) 26 May 2011 (26.05.2011). Especially para [0005], SEQ ID NO: 6.	1-42, 49-60, 62, 63, 65-68
A	US 2013/0059299 A1 (PARR et al.) 7 March 2013 (07.03.2013). Especially SEQ ID NO: 40	72
A	WO 2017/044308 A1 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE, INC.) 16 March 2017 (16.03.2017). Especially SEQ ID NO: 68, 69	74
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same parent family		
Date of the actual completion of the international search 7 June 2019		Date of mailing of the international search report 03 JUL 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/24052

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOs: 1, 2, 12, 26, 27, 59, 68, 100, 113, 114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/24052

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 43-48, 61, 64, 69, 73, 76-80, 85-89
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/14 (2006.01)	A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ハッベル ジェフリー エイ .

アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州 シカゴ サウス ハーバー アベニュー 5 1 1 3
 スイート 2 シー ユニバーシティ オブ シカゴ ポリスキー センター フォア アントウレ
 プレナーシップ アンド イノベーション

(72) 発明者 ワトキンス エリス エイ .

アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州 シカゴ サウス ハーバー アベニュー 5 1 1 3
 スイート 2 シー ユニバーシティ オブ シカゴ ポリスキー センター フォア アントウレ
 プレナーシップ アンド イノベーション

(72) 発明者 スレザク トーマス

アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州 シカゴ サウス ハーバー アベニュー 5 1 1 3
 スイート 2 シー ユニバーシティ オブ シカゴ ポリスキー センター フォア アントウレ
 プレナーシップ アンド イノベーション

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC01 CC16 CC21 CC41 EE41 EE59

4C084 AA01 AA02 BA03 BA44 NA05 NA13 ZA01 ZA69 ZB08 ZC35

4C085 AA02 AA40 BB11 DD62 EE01 EE05 GG01

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA20 FA74