

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6735233号  
(P6735233)

(45) 発行日 令和2年8月5日(2020.8.5)

(24) 登録日 令和2年7月15日(2020.7.15)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28 Z N A
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02

請求項の数 24 (全 232 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-560527 (P2016-560527)	(73) 特許権者	516147420
(86) (22) 出願日	平成27年3月13日 (2015.3.13)		ルビウス セラピューティクス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-517485 (P2017-517485A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ビニー ストリート 399
(43) 公表日	平成29年6月29日 (2017.6.29)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/020614		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W02015/153102	(74) 代理人	100113413
(87) 国際公開日	平成27年10月8日 (2015.10.8)		弁理士 森下 夏樹
審査請求日	平成30年3月12日 (2018.3.12)	(74) 代理人	100181674
(31) 優先権主張番号	62/006,832		弁理士 飯田 貴敏
(32) 優先日	平成26年6月2日 (2014.6.2)	(74) 代理人	100181641
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 石川 大輔
(31) 優先権主張番号	62/006,828		
(32) 優先日	平成26年6月2日 (2014.6.2)		
(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】 免疫調節方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

外因性抗原を含む融合ポリペプチドを発現する除核赤血球系細胞を含む医薬組成物であって、前記医薬組成物の有効量の投与が、自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象において免疫トレランスを誘導する能力を有する、医薬組成物。

【請求項2】

外因性抗原を含む少なくとも1,000コピーのポリペプチドを発現する除核赤血球系細胞を含む医薬組成物であって、前記医薬組成物の有効量の投与が、自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象において免疫トレランスを誘導する能力を有する、医薬組成物。

【請求項3】

前記外因性抗原が前記除核赤血球系細胞の細胞膜に会合している、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記外因性抗原が前記細胞の表面上において細胞外に局在する、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記外因性抗原が細胞内にある、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記融合ポリペプチドがアンカードメインおよび表面ドメインを含み、前記表面ドメインが前記外因性抗原を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記アンカードメインが膜貫通領域を含む、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記除核赤血球系細胞が、少なくとも 10 コピー、100 コピー、1,000 コピー、10,000 コピー、25,000 コピー、50,000 コピー、100,000 コピー、500,000 コピー、1,000,000 コピー、又は 2,000,000 コピーの前記外因性抗原を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記外因性抗原が、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、プレプロインスリン、プロインスリン、インスリン、ホスホリパーゼ A 2 受容体、 $\alpha$ -2 糖タンパク質 1、又はその抗原断片から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記除核赤血球系細胞が赤血球又は網赤血球である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記除核赤血球系細胞がヒト 除核赤血球系細胞である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記除核赤血球系細胞が低張負荷されていない、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記除核赤血球系細胞が、対応する単離非修飾非培養赤血球系細胞と実質的に同じ浸透圧膜脆弱性を示す、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

静脈内注射用の液体懸濁物として製剤化される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

60% 超、65% 超、70% 超、75% 超、80% 超、85% 超、90% 超、95% 超、99% 超、99.5% 超、又は 99.9% 超が除核されている赤血球系細胞の集団を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

疾患または病態の処置または予防において使用するための、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象において免疫トレランスを誘導する方法において使用するための、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象において、免疫トレランスを誘導する方法において使用するための医薬組成物であって、前記医薬組成物は、外因性抗原を含む融合ポリペプチドを発現する除核赤血球系細胞を含み、前記自己免疫疾患、障害又は病態を媒介する前記抗原に対して前記対象において免疫トレランスを誘導するのに有効な量で投与される、医薬組成物。

【請求項 19】

前記対象が、多発性硬化症、1型糖尿病、膜性腎炎、抗リン脂質症候群 (APS)、劇症型 APS、又は天疱瘡を有する、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 0】

前記自己免疫疾患が治療されるか、又はその症状が軽減されるように、治療期間にわたって少なくとも 2 回投与するために製剤化される、請求項 1 6 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

## 【請求項 2 1】

抗原特異的免疫細胞の割合が治療期間中に実質的に低下するように、前記治療期間にわたって十分な回数投与するために製剤化される、請求項 1 6 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

## 【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物を作製する方法であって、  
前記融合ポリペプチドをコードする外因性核酸を含む、有核赤血球系細胞またはその前駆体を提供する工程、および

10

前記有核赤血球系細胞の除核、および前記融合ポリペプチドの産生に適切な条件下で、前記有核赤血球系細胞またはその前駆体を培養する工程を含む、方法。

## 【請求項 2 3】

前記方法が、前記外因性核酸を前記有核赤血球系細胞またはその前駆体に導入する工程をさらに含む、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

前記有核赤血球系細胞の除核が、前記有核赤血球系細胞またはその前駆体を培養して、その核の排出を生じさせることを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明の分野は、疾患及び障害を治療するための医薬組成物である。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

異常な免疫活性化は、多くのヒト疾患及び病態の顕著な特徴である。自己免疫疾患は、生体の免疫系が自己抗原を非自己として不適切に感知し、生体自体の組織を攻撃するときに生じる。炎症性疾患及びアレルギーは、生体の免疫系が共通の食物由来抗原又は環境抗原によって不適切に惹起されるときに生じ得る。様々なヒト疾患の治療に使用されるポリペプチド及びタンパク質は、多くの場合に、それらが外来抗原であるかのようにそれらに反応する免疫細胞によって破壊されるか、中和されるか、又は他に無効にされる。

30

## 【0 0 0 3】

不適切な免疫活性化の疾患の現行の治療は、コルチコステロイド類などの化学剤、又は抗ヒスタミン薬、抗体、若しくはサイトカインなどの炎症性メディエーターの阻害薬による免疫抑制を含む。これらの全身性の治療は免疫系を広範に抑制するため、感染症に罹り易くなるなど、高い罹患性を伴う。

## 【0 0 0 4】

ある種の重度のアレルギーについては、時間をかけて徐々に用量を漸増させながら原因タンパク質に曝露することによってアレルゲンに対する「トレランス」を誘導しようとする臨床試験が実施中である。これまでのところ、これらの治療は長期有効性を欠き、重度のアナフィラキシーのリスクを伴う。

40

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0 0 0 5】

これらの疾患を治療するための新規療法が必要とされている。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0 0 0 6】

本発明は、特定の態様において、抗原を発現する単離された除核造血細胞に関する。除

50

核造血細胞は、本明細書では、「EHC」（又はその単数形では：「EHC」）と称する。一部の実施形態において、除核造血細胞又はEHCは核物質を欠く。例えば、EHCは赤血球系細胞又は血小板系細胞（thromboid cell）であり得る。一部の実施形態において、核物質を欠くEHCは、赤血球（red blood cell）、赤血球（erythrocyte）、網赤血球、又は血小板である。一部の実施形態において、除核造血細胞又はEHCは、例えばその核物質を失うように誘導されるか又は機能上除核された状態で複製不能となるように誘導される有核前駆赤血球系細胞又は前駆血小板系細胞である。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは赤血球細胞などの循環細胞である。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、定義付けられた因子を使用して造血前駆体から培養される。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは血小板などの血小板系細胞である。一部の実施形態において、血小板系細胞は、定義付けられた因子を使用して造血前駆体から培養される。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、自己使用又は同種使用のいずれかのために患者から単離された、抗原と接触する初代細胞である。

10

**【0007】**

本発明の特定の態様は、例えば外因性抗原発現EHCを含む医薬組成物の形態で対象に投与したときに免疫トレランスを誘導する能力を有する外因性抗原発現EHCに関する。EHCが発現する外因性抗原は、特定の疾患、障害又は病態に合わせて調整され得る。外因性抗原発現EHCは、目的の抗原の例えば表面提示、細胞内発現、細胞内負荷、又は表面コンジュゲーションなど、複数の方法で抗原を含むことができる。外因性抗原発現EHCは、異常な免疫活性化疾患を既存の治療と比べてより有効に及び/又はより少ない副作用で管理し得る。例えば、外因性抗原発現EHCは、広範な免疫系生理機能が実質的に損動を受けることのないまま免疫系を選択的に調節し得る。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、抗原特異的T及びBリンパ球の破壊、失活、及び/又はアネルギーを誘導し得る。それに代えて又は加えて、外因性抗原発現EHCは、抗原特異的調節性Tリンパ球の増殖を誘導し得る。

20

**【0008】**

本発明の特定の態様は、自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、1型糖尿病、関節リウマチ、及び膜性腎炎などで免疫細胞によって認識される外因性抗原を含む外因性抗原発現EHCに関する。

30

**【0009】**

本発明の特定の態様は、炎症性疾患、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、又は他の特発性炎症性腸疾患などで免疫細胞によって認識される外因性抗原を含む外因性抗原発現EHCに関する。

**【0010】**

本発明の特定の態様は、ヒト白血球抗原（HLA）不適合媒介性疾患、例えば、移植片対宿主病又は移植臓器拒絶反応などで免疫細胞によって認識される外因性抗原を含む外因性抗原発現EHCに関する。

**【0011】**

本発明の特定の態様は、アレルギー性疾患、例えば、喘息、ピーナッツアレルギー、甲殻類アレルギー、花粉アレルギー、乳タンパク質アレルギー、虫刺されアレルギー、及びラテックスアレルギーなどで免疫細胞によって認識される外因性抗原を含む外因性抗原発現EHCに関する。

40

**【0012】**

本発明の特定の態様は、例えば、血友病Aにおける第V I I I凝固因子、血友病Bにおける第I X凝固因子、関節リウマチ及び他の炎症性疾患における抗腫瘍壊死因子（TNF）抗体、ゴーシェ病におけるグルコセレブロシダーゼ、又は急性リンパ性白血病（ALL）におけるアスパラギナーゼなどの、その有効性又は効力が免疫細胞によって低減されるか又は損なわれる治療用タンパク質である外因性抗原を含む外因性抗原発現EHCに関する。

50

## 【 0 0 1 3 】

本発明の特定の態様は、a) 補体調節を媒介するか、b) 免疫複合体の結合及び隔絶を媒介するか、c) 自己免疫性抗体であるか、又はd) 病原性粒子であるポリペプチドの完全長、トランケーション、及びキメラ融合物を含む外因性抗原を含む外因性抗原発現 EHC に関する。一部の実施形態において、外因性抗原は、ある小分子基質から別の小分子生成物への変換又は例えばポリペプチド基質の開裂を含めた、あるポリペプチド (poly peptide) 基質から第2のポリペプチド生成物への変換において酵素的に活性なポリペプチドの完全長、トランケーション、及びキメラ融合物を含む。

## 【 0 0 1 4 】

本発明はまた、特定の態様において、本明細書に提供される外因性抗原発現 EHC 及びその医薬組成物を使用した疾患の治療方法も提供する。

10

## 【 0 0 1 5 】

一部の態様において、本明細書には、免疫トレランスを誘導する方法が開示される。本方法は、自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象に対し、外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医薬組成物を投与するステップを含み、ここで医薬組成物は、自己免疫疾患、障害又は病態を媒介する抗原に対して対象において免疫トレランスを誘導するのに有効な量で投与される。

## 【 0 0 1 6 】

一部の実施形態において、自己免疫疾患は、多発性硬化症、1型糖尿病、及び表Fに列挙されるものからなる群から選択される。

20

## 【 0 0 1 7 】

一部の実施形態において、本方法は、自己免疫疾患、障害又は病態が治療されるか、又はその症状が低下するように、医薬組成物を治療期間にわたって少なくとも2回投与するステップをさらに含む。

## 【 0 0 1 8 】

特定の実施形態において、本方法は、自己免疫疾患、障害又は病態が予防されるように、医薬組成物を治療期間にわたって少なくとも2回投与するステップをさらに含む。

## 【 0 0 1 9 】

他の実施形態において、本方法は、抗原特異的免疫細胞の割合が治療期間中に実質的に低下するように、医薬組成物を治療期間にわたって十分な回数投与するステップをさらに含む。

30

## 【 0 0 2 0 】

一部の実施形態において、免疫細胞はT細胞である。一部の実施形態において、免疫細胞はB細胞である。

## 【 0 0 2 1 】

一部の実施形態において、抗原特異的免疫細胞の濃度の低下は、対象から採取された生物学的試料からフローサイトメトリーによって計測される。

## 【 0 0 2 2 】

一部の実施形態において、生物学的試料は、リンパ節生検、脾臓試料、又は末梢血である。

40

## 【 0 0 2 3 】

一部の実施形態において、抗原特異的免疫細胞の濃度は、治療期間の一部又は全体で少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超低下する。

## 【 0 0 2 4 】

他の実施形態において、抗原特異的免疫細胞の濃度は、投与から約1、5、10、15、20、30、40、若しくは50分、又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、若し

50

くは23時間、又は1、2、3、4、5、若しくは6日、又は約1、2、3、4、5、若しくは6週間以内に少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超低下する。

【0025】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、抗原特異的免疫細胞の濃度が少なくとも約1週間、2週間、3週間、4週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、又は6ヵ月超にわたり実質的に低下するように、治療期間にわたって十分な回数投与される。

10

【0026】

特定の実施形態において、本医薬組成物は、少なくとも治療期間中である期間にわたり抗原特異的免疫細胞の濃度が実質的に低下するように、治療期間にわたって十分な回数投与される。

【0027】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、循環中の抗原特異的抗体の濃度が治療期間中に実質的に低下するように、治療期間にわたって十分な回数投与される。

【0028】

一部の実施形態において、循環中の抗原特異的抗体の濃度はELISAによって計測される。

20

【0029】

一部の実施形態において、抗原特異的循環抗体の濃度は、治療期間の一部又は全体で少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超低下する。

【0030】

一部の実施形態において、抗原特異的抗体の濃度は、投与から約1、5、10、15、20、30、40、若しくは50分、又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、若しくは23時間、又は1、2、3、4、5、若しくは6日、又は約1、2、3、4、5、若しくは6週間以内に少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超低下する。

30

【0031】

特定の実施形態において、本医薬組成物は、抗原特異的循環抗体の濃度が少なくとも約1週間、2週間、3週間、4週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、又は6ヵ月超にわたり実質的に低下するように、治療期間にわたって十分な回数投与される。

40

【0032】

特定の実施形態において、本医薬組成物は、少なくとも治療期間中である期間にわたり抗原特異的循環抗体の濃度が実質的に低下するように、治療期間にわたって十分な回数投与される。

【0033】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、抗原特異的調節性T細胞の割合が治療期間中に実質的に増加するように、治療期間にわたって十分な回数投与される。

【0034】

一部の実施形態において、抗原特異的免疫細胞の濃度の低下は、対象から採取された生物学的試料からフローサイトメトリーによって計測される。

50

## 【0035】

一部の実施形態において、生物学的試料は、リンパ節生検、脾臓試料、又は末梢血である。

## 【0036】

特定の実施形態において、抗原特異的調節性T細胞の濃度は、治療期間の一部又は全体で少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超増加する。

## 【0037】

特定の実施形態において、抗原特異的調節性T細胞の濃度は、投与から約1、5、10、15、20、30、40、若しくは50分、又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、若しくは23時間、又は1、2、3、4、5、若しくは6日、又は約1、2、3、4、5、若しくは6週間以内に少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超増加する。

## 【0038】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、抗原特異的調節性T細胞の濃度が少なくとも約1週間、2週間、3週間、4週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、又は6ヵ月超にわたり実質的に増加するように、治療期間にわたって十分な回数投与される。

## 【0039】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、少なくとも治療期間中である期間にわたり抗原特異的調節性T細胞の濃度が実質的に増加するように、治療期間にわたって十分な回数投与される。

## 【0040】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、自己免疫疾患、障害又は病態の1つ以上の症状が予防されるか、軽減されるか、又は遅延するように、治療期間にわたって十分な回数投与される。

## 【0041】

一部の実施形態において、治療期間は、1年、6ヵ月、3ヵ月、2ヵ月、1ヵ月、2週間、1週間、3日、2日、1日以下である。

## 【0042】

特定の実施形態において、治療期間内における投与間の時間間隔は、投与される医薬組成物中に存在する外因性抗原を発現する除核造血細胞の数の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%未満にまで外因性抗原を発現する除核造血細胞の数が減少する期間以下である。

## 【0043】

一部の実施形態において、投与頻度は、抗原特異的免疫細胞の濃度を、自己免疫疾患、障害又は病態の症状に関連するレベル未満に有効に低減するのに十分である。

## 【0044】

特定の実施形態において、投与頻度は、抗原特異的循環抗体の濃度を、自己免疫疾患、障害又は病態の症状に関連するレベル未満に有効に低減するのに十分である。

## 【0045】

特定の実施形態において、投与頻度は、抗原特異的調節性T細胞の濃度を、自己免疫疾患、障害又は病態の症状に関連する閾値レベルより高く有効に増加させるのに十分である。

。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

一部の実施形態において、除核造血細胞は、赤血球系細胞、血小板系細胞、又はそれらの前駆体である。一部の実施形態において、赤血球系細胞は赤血球又は網赤血球である。一部の実施形態において、血小板系細胞は血小板である。

## 【 0 0 4 7 】

一部の実施形態において、除核造血細胞はドナーから単離される。一部の実施形態において、除核造血細胞は対象から自己細胞によって誘導される。一部の実施形態において、除核造血細胞は同種細胞によって誘導される。一部の実施形態において、除核造血細胞は異種細胞によって誘導される。

## 【 0 0 4 8 】

一部の実施形態において、有核造血細胞は、有核前駆細胞から、その核の排出を生じさせる培養に基づくプロセスによって誘導される。一部の実施形態において、除核造血細胞は、有核前駆細胞であって、その核を取り除く化学的又は物理的操作を受ける有核前駆細胞から作成される。

## 【 0 0 4 9 】

一部の実施形態において、除核造血細胞は、有核前駆細胞の核の照射又は化学的破壊によって作成される。一部の実施形態において、化学的破壊はサイトカラシン B によって行われる。一部の実施形態において、照射は、少なくとも 5 Gy、7 Gy、10 Gy、15 Gy、25 Gy、30 Gy、40 Gy 又は少なくとも 50 Gy で行われる。

## 【 0 0 5 0 】

一部の実施形態において、外因性抗原は、外因性核酸によってコードされるポリペプチドである。

## 【 0 0 5 1 】

一部の実施形態において、外因性抗原は除核造血細胞の細胞膜に会合している。

## 【 0 0 5 2 】

一部の実施形態において、外因性抗原は融合物又はキメラポリペプチドである。

## 【 0 0 5 3 】

一部の実施形態において、融合物又はキメラは、Sドメイン、Aドメイン又はUドメインのうちの少なくとも1つを含み、ここでSドメインは除核造血細胞上の表面ドメインであり、Aドメインは細胞膜内又は細胞膜上のアンカーであり、Uドメインは除核造血細胞の細胞内の非露出側に向いており、Sドメイン、Aドメイン、及び/又はUドメインは異なるポリペプチド由来である。

## 【 0 0 5 4 】

一部の実施形態において、Sドメイン及び/又はAドメインは、少なくとも5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、又は少なくとも500アミノ酸を含む。一部の実施形態において、Sドメイン及び/又はAドメインは、少なくとも500、750、又は少なくとも1,000アミノ酸を含む。

## 【 0 0 5 5 】

一部の実施形態において、外因性抗原は、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、膵細胞抗原、インスリン、並びに表F、表6、及び表8に列挙されるものからなる群から選択される。

## 【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、除核造血細胞は、少なくとも10コピー、100コピー、1,000コピー、10,000コピー、25,000コピー、50,000コピー、100,000コピー、500,000コピー、1,000,000コピー、又は2,000,000コピーの外因性抗原を含む。

## 【 0 0 5 7 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は薬学的に活性な薬剤をさらに含む。

## 【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50



一部の実施形態において、本方法は、薬学的に活性な薬剤を投与するステップをさらに含み、ここで薬学的に活性な薬剤は医薬組成物の前に、その後、又はそれと同時に投与される。

【0059】

一部の実施形態において、本医薬組成物は静脈内投与される。

【0060】

一部の実施形態において、薬学的に活性な薬剤は、生物学的薬剤、小分子薬剤、又は核酸薬剤から選択される。

【0061】

一部の実施形態において、本医薬組成物は薬学的に許容可能な担体をさらに含む。

10

【0062】

特定の実施形態において、本方法は、血栓性血小板減少性紫斑病、CAPS、APS、重症筋無力症、グッドパスチャー症候群、膜性腎炎、1型糖尿病、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、又は表F及び表Gに列挙されるものからなる群から選択される自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はそのリスクがある対象を治療のために選択するステップをさらに含む。

【0063】

一部の態様において、本明細書には、外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医薬組成物が開示され、ここで医薬組成物の有効量の投与は、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法による投与を受ける、自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象において免疫トレランスを誘導する能力を有する。

20

【0064】

一部の実施形態において、本医薬組成物は薬学的に許容可能な担体をさらに含む。

【0065】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、外因性抗原を発現する造血細胞の集団を含む。一部の実施形態において、本医薬組成物は、外因性抗原を発現する少なくとも $1 \times 10^3$ 個の造血細胞を含む。

【0066】

本医薬組成物の特定の実施形態において、外因性抗原を発現する造血細胞は、約10nl、100nl、1 $\mu$ l、10 $\mu$ l、100 $\mu$ l、1ml、10ml、20ml、又は50mlの容積で提供される。本医薬組成物の他の実施形態において、外因性抗原を発現する造血細胞は、約1ml、10ml、20ml、50ml、100ml、250ml、又は500mlの容積で提供される。

30

【0067】

本医薬組成物の一部の実施形態において、本組成物は長期保存用に製剤化される。本医薬組成物の一部の実施形態において、本組成物は凍結される。一部の実施形態において、本医薬組成物は薬学的に活性な薬剤を含む。

【0068】

本医薬組成物の特定の実施形態において、薬学的に活性な薬剤は、生物学的薬剤、小分子薬剤、又は核酸薬剤から選択される。

40

【0069】

一部の態様において、本明細書には、静脈内注射用の液体懸濁物として製剤化された本明細書に記載される組成物を含む剤形が開示される。

【0070】

一部の態様において、本明細書には、本明細書に記載される医薬組成物を保持する容器と、対象への医薬組成物の静脈内注射用のアプリケーションターを含む医療器具が開示される。

【0071】

一部の態様において、本明細書には、本明細書に記載される医薬組成物と、対象への医薬組成物の静脈内注射用の医療器具とを含む医療用キットが開示される。

50

## 【 0 0 7 2 】

一部の態様において、本明細書には、本明細書に記載される方法のいずれかによって投与される医薬組成物の外因性抗原を発現する造血細胞が開示される。

## 【 0 0 7 3 】

一部の態様において、本明細書には、本明細書が開示されるとおりの外因性抗原を発現する造血細胞の集団が開示される。

## 【 0 0 7 4 】

一部の実施形態において、外因性抗原を発現する造血細胞の集団は液体として製剤化される。

## 【 0 0 7 5 】

一部の実施形態において、外因性抗原を発現する造血細胞の集団は凍結される。

## 【 0 0 7 6 】

一部の態様において、本明細書には、本明細書に記載される造血細胞集団によって発現される単離抗原が開示される。

## 【 0 0 7 7 】

一部の態様において、本明細書には、本明細書に記載される外因性抗原をコードする外因性核酸が開示される。

## 【 0 0 7 8 】

一部の態様において、本明細書には、Sドメイン、Aドメイン又はUドメインのうち少なくとも1つを含む外因性抗原を含む除核造血細胞が開示され、ここでSドメインは細胞外表面ドメインであり、Aドメインはアンカーであり、及びUドメインは細胞内に局在し、除核造血細胞は対象への投与時に免疫トレランスを誘導する能力を有する。

## 【 0 0 7 9 】

本明細書が開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、外因性抗原は融合物又はキメラポリペプチドである。

## 【 0 0 8 0 】

本明細書が開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、Sドメイン、Aドメイン、及び/又はUドメインは異なるポリペプチド由来である。

## 【 0 0 8 1 】

本明細書が開示される除核造血細胞の特定の実施形態において、Sドメイン及び/又はAドメインは、少なくとも5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、又は少なくとも500アミノ酸を含む。

## 【 0 0 8 2 】

本明細書が開示される除核造血細胞の特定の実施形態において、Sドメイン及び/又はAドメインは、少なくとも500、750、又は少なくとも1,000アミノ酸を含む。

## 【 0 0 8 3 】

本明細書が開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、外因性抗原は、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、膵細胞抗原、インスリン、並びに表F、表6、及び表8に列挙されるものからなる群から選択される。

## 【 0 0 8 4 】

一部の実施形態において、除核造血細胞は、少なくとも10コピー、100コピー、1,000コピー、10,000コピー、25,000コピー、50,000コピー、100,000コピー、500,000コピー、1,000,000コピー、又は2,000,000コピーの外因性抗原を含む。

## 【 0 0 8 5 】

特定の実施形態において、除核造血細胞は、赤血球系細胞、血小板系細胞、又はそれらの前駆体である。一部の実施形態において、赤血球系細胞は赤血球又は網赤血球である。一部の実施形態において、血小板系細胞は血小板である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 6 】

一部の実施形態において、除核造血細胞はドナーから単離される。一部の実施形態において、除核造血細胞は対象から自己細胞によって誘導される。一部の実施形態において、除核造血細胞は同種細胞によって誘導される。一部の実施形態において、除核造血細胞は異種細胞によって誘導される。

## 【 0 0 8 7 】

特定の実施形態において、除核造血細胞は、有核前駆細胞から、その核の排出を生じさせる培養に基づくプロセスによって誘導される。

## 【 0 0 8 8 】

特定の実施形態において、除核造血細胞は、有核前駆細胞であって、その核を取り除く化学的又は物理的操作を受ける有核前駆細胞から作成される。

10

## 【 0 0 8 9 】

特定の実施形態において、除核造血細胞は、有核前駆細胞の核の照射又は化学的破壊によって作成される。一部の実施形態において、化学的破壊はサイトカラシン B によって行われる。一部の実施形態において、照射は、少なくとも 5 Gy、7 Gy、10 Gy、15 Gy、25 Gy、30 Gy、40 Gy 又は少なくとも 50 Gy で行われる。

## 【 0 0 9 0 】

本明細書に開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、外因性抗原は、外因性核酸によってコードされるポリペプチドである。

## 【 0 0 9 1 】

20

本明細書に開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、細胞はヒト供給源から誘導される。

## 【 0 0 9 2 】

本明細書に開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、細胞は、ブタ、チンパンジー、マカク、非ヒト霊長類、及び非霊長類哺乳動物からなる群から選択される非ヒト供給源から誘導される。

## 【 0 0 9 3 】

本明細書に開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、ポリペプチド抗原は細胞内に局在する。本明細書に開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、ポリペプチド抗原は細胞の表面上において細胞外に局在する。本明細書に開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、ポリペプチド抗原は内因性細胞タンパク質に融合している。本明細書に開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、ポリペプチド抗原は内因性膜貫通タンパク質の細胞内領域に融合している。本明細書に開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、ポリペプチド抗原は内因性膜貫通タンパク質の細胞外領域に融合している。本明細書に開示される除核造血細胞の一部の実施形態において、ポリペプチド抗原はグリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol) ( GPI ) アンカリングタンパク質に融合している。

30

## 【 0 0 9 4 】

一部の態様において、本明細書には、本明細書に記載される除核造血細胞を含む組織培養バッチが開示される。

40

## 【 0 0 9 5 】

一部の態様において、本明細書には、本明細書に記載される除核造血細胞の集団が開示される。

## 【 0 0 9 6 】

一部の態様において、本明細書には、本明細書に記載される細胞集団を含む医薬組成物が開示される。

## 【 0 0 9 7 】

一部の態様において、本明細書には、免疫トレランスを誘導する方法が開示され、この方法は、それを必要としている対象に対し、対象において免疫トレランスを誘導するのに十分な量及び / 又は頻度で本明細書に記載される医薬組成物を投与するステップを含む。

50

## 【 0 0 9 8 】

一部の態様において、本明細書には、免疫活性化疾患を治療する方法が開示され、この方法は、それを必要としている対象に対し、免疫活性化疾患を治療するのに十分な量及び/又は頻度で本明細書に記載される医薬組成物を投与するステップを含む。

## 【 0 0 9 9 】

一部の実施形態において、疾患は、自己抗体媒介性疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー性疾患、HLA不適合媒介性疾患、及び免疫原性治療用タンパク質によって治療可能な疾患からなる群から選択される。

## 【 0 1 0 0 】

一部の態様において、本明細書には、治療用タンパク質治療レジメンに応答した免疫活性化を低減又は軽減する方法が開示され、この方法は、それを必要としている対象に対し、免疫活性化を実質的に低減又は軽減するのに十分な量及び/又は頻度で本明細書に記載される医薬組成物を投与するステップを含む。

10

## 【 0 1 0 1 】

一部の実施形態において、治療用タンパク質は、表I、表J、及び表7に列挙されるものからなる群から選択される。

## 【 0 1 0 2 】

一部の態様において、本明細書には、表F、表G、表H、表I、表J、表6、表7、及び表8に列挙されるものからなる群から選択される1つ以上の外因性ポリペプチド抗原と融合した内因性赤血球系細胞タンパク質をコードする核酸配列を含む発現ベクターが開示される。

20

## 【 0 1 0 3 】

一部の態様において、本明細書には、表F、表G、表H、表I、表J、表6、表7、及び表8に列挙されるものからなる群から選択される1つ以上の外因性ポリペプチド抗原と融合した内因性赤血球系細胞タンパク質をコードする核酸配列を含むメッセンジャーRNAが開示される。

## 【 0 1 0 4 】

一部の態様において、本明細書には、免疫トレランスを誘導する方法が開示され、この方法は、アレルゲン媒介性疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象に対し、外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医薬組成物を投与するステップを含み、ここで医薬組成物は、対象においてその疾患、障害又は病態を媒介するアレルゲンに対する免疫トレランスを誘導するのに有効な量で投与される。

30

## 【 0 1 0 5 】

特定の実施形態において、外因性抗原は、Ara h 2、2Sアルブミン、ヒアラウロニダーゼ(hyaluronidase)、及び表Hに列挙されるものからなる群から選択される。

## 【 0 1 0 6 】

特定の実施形態において、アレルゲン媒介性疾患、障害又は病態は、ピーナッツアレルギー、ナッツアレルギー、昆虫毒アレルギー、及び表Hに列挙されるものからなる群から選択される。

40

## 【 0 1 0 7 】

一部の態様において、本明細書には、免疫トレランスを誘導する方法が開示され、この方法は、ヒト白血球抗原(HLA)不適合媒介性疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象に対し、外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医薬組成物を投与するステップを含み、ここで医薬組成物は、対象においてその疾患、障害又は病態を媒介するHLAに対する免疫トレランスを誘導するのに有効な量で投与される。

## 【 0 1 0 8 】

一部の態様において、本明細書には、免疫トレランスを誘導する方法が開示され、この方法は、免疫原性治療用分子によって治療され得る疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象に対し、外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医

50

薬組成物を投与するステップを含み、ここで医薬組成物は、対象においてその疾患、障害又は病態の治療に使用される免疫原性治療用分子に対する免疫トレランスを誘導するのに有効な量で投与される。

【0109】

一部の実施形態において、治療用分子は、組換え（第VII因子）、ベネフィックス（Benefix）（第IX因子）、ヒュミラ（Humira）（抗TNF）、並びに表I、表J、及び表7に列挙されるものからなる群から選択される。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目1）

免疫トレランスを誘導する方法であって、自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象に対し、外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医薬組成物を投与するステップを含み、前記医薬組成物が、前記自己免疫疾患、障害又は病態を媒介する前記抗原に対して前記対象において免疫トレランスを誘導するのに有効な量で投与される、方法。

10

（項目2）

前記自己免疫疾患が、多発性硬化症、1型糖尿病、及び表Fに列挙されるものからなる群から選択される、項目1に記載の方法。

（項目3）

前記自己免疫疾患、障害又は病態が治療されるか、又はその症状が軽減されるように、前記医薬組成物を治療期間にわたって少なくとも2回投与するステップをさらに含む、項目1又は2に記載の方法。

20

（項目4）

前記自己免疫疾患、障害又は病態が予防されるように、前記医薬組成物を治療期間にわたって少なくとも2回投与するステップをさらに含む、項目1又は2に記載の方法。

（項目5）

抗原特異的免疫細胞の割合が治療期間中に実質的に低下するように、前記医薬組成物を前記治療期間にわたって十分な回数投与するステップをさらに含む、項目1又は2に記載の方法。

（項目6）

前記免疫細胞がT細胞である、項目5に記載の方法。

30

（項目7）

前記免疫細胞がB細胞である、項目5に記載の方法。

（項目8）

抗原特異的免疫細胞の濃度の低下が、前記対象から採取された生物学的試料からフローサイトメトリーによって計測される、項目5に記載の方法。

（項目9）

前記生物学的試料が、リンパ節生検、脾臓試料、又は末梢血である、項目8に記載の方法。

（項目10）

抗原特異的免疫細胞の濃度が、前記治療期間の一部又は全体で少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超低下する、項目5～7のいずれか一項に記載の方法。

40

（項目11）

抗原特異的免疫細胞の濃度が、前記投与から約1、5、10、15、20、30、40、若しくは50分、又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、若しくは23時間、又は1、2、3、4、5、若しくは6日、又は約1、2、3、4、5、若しくは6週間以内に少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、

50

45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超低下する、項目5～7のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

抗原特異的免疫細胞の濃度が少なくとも約1週間、2週間、3週間、4週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、又は6ヵ月超にわたり実質的に低下するように、前記医薬組成物を治療期間にわたって十分な回数投与するステップを含む、項目5～7のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

少なくとも治療期間中である期間にわたり抗原特異的免疫細胞の濃度が実質的に低下するように、前記医薬組成物を前記治療期間にわたって十分な回数投与するステップを含む、項目5～7のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目14)

循環中の抗原特異的抗体の濃度が治療期間中に実質的に低下するように、前記医薬組成物を前記治療期間にわたって十分な回数投与するステップをさらに含む、項目1又は2に記載の方法。

(項目15)

循環中の抗原特異的抗体の濃度がELISAによって計測される、項目14に記載の方法。

(項目16)

抗原特異的循環抗体の濃度が、前記治療期間の一部又は全体で少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超低下する、項目14に記載の方法。

20

(項目17)

抗原特異的抗体の濃度が、前記投与から約1、5、10、15、20、30、40、若しくは50分、又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、若しくは23時間、又は1、2、3、4、5、若しくは6日、又は約1、2、3、4、5、若しくは6週間以内に少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超低下する、項目14に記載の方法。

30

(項目18)

抗原特異的循環抗体の濃度が少なくとも約1週間、2週間、3週間、4週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、又は6ヵ月超にわたり実質的に低下するように、前記医薬組成物を治療期間にわたって十分な回数投与するステップを含む、項目14に記載の方法。

(項目19)

少なくとも治療期間中である期間にわたり抗原特異的循環抗体の濃度が実質的に低下するように、前記医薬組成物を前記治療期間にわたって十分な回数投与するステップを含む、項目14に記載の方法。

40

(項目20)

抗原特異的調節性T細胞の割合が治療期間中に実質的に増加するように、前記医薬組成物を前記治療期間にわたって十分な回数投与するステップをさらに含む、項目1又は2に記載の方法。

(項目21)

抗原特異的免疫細胞の濃度の低下が、前記対象から採取された生物学的試料からフローサイトメトリーによって計測される、項目20に記載の方法。

50

(項目22)

前記生物学的試料が、リンパ節生検、脾臓試料、又は末梢血である、項目21に記載の方法。

(項目23)

抗原特異的調節性T細胞の濃度が、前記治療期間の一部又は全体で少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超増加する、項目20に記載の方法。

(項目24)

抗原特異的調節性T細胞の濃度が、前記投与から約1、5、10、15、20、30、40、若しくは50分、又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、若しくは23時間、又は1、2、3、4、5、若しくは6日、又は約1、2、3、4、5、若しくは6週間以内に少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、又は99.99%超増加する、項目20に記載の方法。

(項目25)

抗原特異的調節性T細胞の濃度が少なくとも約1週間、2週間、3週間、4週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、又は6ヵ月超にわたり実質的に増加するように、前記医薬組成物を治療期間にわたって十分な回数投与するステップを含む、項目20に記載の方法。

(項目26)

少なくとも治療期間中である期間にわたり抗原特異的調節性T細胞の濃度が実質的に増加するように、前記医薬組成物を前記治療期間にわたって十分な回数投与するステップを含む、項目20に記載の方法。

(項目27)

前記自己免疫疾患、障害又は病態の1つ以上の症状が予防されるか、軽減されるか、又は遅延するように、前記医薬組成物が治療期間にわたって十分な回数投与される、項目5~26のいずれか一項に記載の方法。

(項目28)

前記治療期間が、1年、6ヵ月、3ヵ月、2ヵ月、1ヵ月、2週間、1週間、3日、2日、1日以下である、項目27に記載の方法。

(項目29)

前記治療期間内における投与間の時間間隔が、前記投与される医薬組成物中に存在する外因性抗原を発現する除核造血細胞の数の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%未満にまで外因性抗原を発現する除核造血細胞の数が減少する期間以下である、項目3~27のいずれか一項に記載の方法。

(項目30)

投与頻度が、抗原特異的免疫細胞の濃度を自己免疫疾患、障害又は病態の症状に関連するレベル未満に有効に低減するのに十分である、項目5~7のいずれか一項に記載の方法。

(項目31)

投与頻度が、抗原特異的循環抗体の濃度を自己免疫疾患、障害又は病態の症状に関連するレベル未満に有効に低減するのに十分である、項目14に記載の方法。

(項目32)

投与頻度が、抗原特異的調節性T細胞の濃度を自己免疫疾患、障害又は病態の症状に関連する閾値レベルより高く有効に増加させるのに十分である、項目20に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 3 3)

前記除核造血細胞が、赤血球系細胞、血小板系細胞、又はそれらの前駆体である、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記赤血球系細胞が赤血球又は網赤血球である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記血小板系細胞が血小板である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記除核造血細胞がドナーから単離される、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

前記除核造血細胞が前記対象から自己細胞によって誘導される、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記除核造血細胞が同種細胞によって誘導される、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 9)

前記除核造血細胞が異種細胞によって誘導される、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

前記除核造血細胞が、有核前駆細胞から、その核の排出を生じさせる培養に基づくプロセスによって誘導される、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記除核造血細胞が、有核前駆細胞であって、その核を取り除く化学的又は物理的操作を受ける有核前駆細胞から作成される、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 2)

前記除核造血細胞が、有核前駆細胞の核の照射又は化学的破壊によって作成される、項目 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

化学的破壊がサイトカラシン B によって行われる、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

照射が、少なくとも 5 Gy、7 Gy、10 Gy、15 Gy、25 Gy、30 Gy、40 Gy 又は少なくとも 50 Gy で行われる、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記外因性抗原が、外因性核酸によってコードされるポリペプチドである、項目 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記外因性抗原が前記除核造血細胞の細胞膜に会合している、項目 1 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記外因性抗原が融合物又はキメラポリペプチドである、項目 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記融合物又はキメラが、S ドメイン、A ドメイン又は U ドメインのうちの少なくとも 1 つを含み、前記 S ドメインが前記除核造血細胞上の表面ドメインであり、前記 A ドメインが前記細胞膜内又は前記細胞膜上のアンカーであり、前記 U ドメインが前記除核造血細胞の細胞内の非露出側に向いており、前記 S ドメイン、前記 A ドメイン、及び / 又は前記 U ドメインが異なるポリペプチド由来である、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記 S ドメイン及び / 又は前記 A ドメインが、少なくとも 5、6、7、8、9、10、

10

20

30

40

50



15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、又は少なくとも500アミノ酸を含む、項目48に記載の方法。

(項目50)

前記Sドメイン及び/又はAドメインが、少なくとも500、750、又は少なくとも1,000アミノ酸を含む、項目48に記載の方法。

(項目51)

前記外因性抗原が、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、臍細胞抗原、インスリン、並びに表F、表6、及び表8に列挙されるものからなる群から選択される、項目1～50のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目52)

前記除核造血細胞が、少なくとも10コピー、100コピー、1,000コピー、10,000コピー、25,000コピー、50,000コピー、100,000コピー、500,000コピー、1,000,000コピー、又は2,000,000コピーの前記外因性抗原を含む、項目1～51のいずれか一項に記載の方法。

(項目53)

前記医薬組成物が薬学的に活性な薬剤をさらに含む、項目1～52のいずれか一項に記載の方法。

(項目54)

薬学的に活性な薬剤を投与するステップをさらに含み、前記薬学的に活性な薬剤が前記医薬組成物の前に、その後、又はそれと同時に投与される、項目1～53のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目55)

前記医薬組成物が静脈内投与される、項目1～54のいずれか一項に記載の方法。

(項目56)

前記薬学的に活性な薬剤が、生物学的薬剤、小分子薬剤、又は核酸薬剤から選択される、項目54又は55に記載の方法。

(項目57)

前記医薬組成物が薬学的に許容可能な担体をさらに含む、項目1～56のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目58)

血栓性血小板減少性紫斑病、CAPS、APS、重症筋無力症、グッドパスチャー症候群、膜性腎炎、1型糖尿病、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、又は表F及び表Gに列挙されるものからなる群から選択される自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はそのリスクがある対象を治療のために選択するステップをさらに含む、項目1～57のいずれか一項に記載の方法。

(項目59)

外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医薬組成物であって、前記医薬組成物の有効量の投与が、項目1～58のいずれか一項に記載の方法による投与を受ける、自己免疫疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象において免疫トレランスを誘導する能力を有する、医薬組成物。

40

(項目60)

薬学的に許容可能な担体をさらに含む、項目59に記載の医薬組成物。

(項目61)

外因性抗原を発現する造血細胞の集団を含む、項目59又は60に記載の医薬組成物。

(項目62)

外因性抗原を発現する少なくとも $1 \times 10^3$ 個の造血細胞を含む、項目61に記載の医薬組成物。

(項目63)

外因性抗原を発現する前記造血細胞が、約10nl、100nl、1 $\mu$ l、10 $\mu$ l、

50

100 μl、1 ml、10 ml、20 ml、又は50 mlの容積で提供される、項目62に記載の医薬組成物。

(項目64)

外因性抗原を発現する前記造血細胞が、約1 ml、10 ml、20 ml、50 ml、100 ml、250 ml、又は500 mlの容積で提供される、項目62に記載の医薬組成物。

(項目65)

長期保存用に製剤化される、項目59～64のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目66)

凍結される、項目59～64のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

(項目67)

薬学的に活性な薬剤を含む、項目59～64のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目68)

前記薬学的に活性な薬剤が、生物学的薬剤、小分子薬剤、又は核酸薬剤から選択される、項目67に記載の医薬組成物。

(項目69)

静脈内注射用の液体懸濁物として製剤化された項目59～65、67又は68のいずれか一項に記載の組成物を含む剤形。

(項目70)

項目59～69のいずれか一項に記載の医薬組成物を保持する容器と、前記対象への前記医薬組成物の静脈内注射用のアプリケータとを含む医療器具。

20

(項目71)

項目59～69のいずれか一項に記載の医薬組成物と、前記対象への前記医薬組成物の静脈内注射用の医療器具とを含む医療用キット。

(項目72)

項目1～58のいずれか一項に記載の方法によって投与される前記医薬組成物の外因性抗原を発現する造血細胞。

(項目73)

項目72に記載の外因性抗原を発現する造血細胞の集団。

(項目74)

液体として製剤化された項目73に記載の外因性抗原を発現する造血細胞の集団。

30

(項目75)

凍結される、項目73に記載の外因性抗原を発現する造血細胞の集団。

(項目76)

項目73に記載の造血細胞集団によって発現される単離抗原。

(項目77)

項目73に記載の外因性抗原をコードする外因性核酸。

(項目78)

Sドメイン、Aドメイン又はUドメインのうちの少なくとも1つを含む外因性抗原を含む除核造血細胞であって、前記Sドメインが細胞外表面ドメインであり、前記Aドメインがアンカーであり、及び前記Uドメインが細胞内に局在し、前記除核造血細胞が対象への投与時に免疫トレランスを誘導する能力を有する、除核造血細胞。

40

(項目79)

前記外因性抗原が融合物又はキメラポリペプチドである、項目78に記載の除核造血細胞。

(項目80)

前記Sドメイン、前記Aドメイン、及び/又は前記Uドメインが異なるポリペプチド由来である、項目79に記載の除核造血細胞。

(項目81)

前記Sドメイン及び/又は前記Aドメインが、少なくとも5、6、7、8、9、10、

50

15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、又は少なくとも500アミノ酸を含む、項目78～80のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目82)

前記Sドメイン及び/又はAドメインが、少なくとも500、750、又は少なくとも1,000アミノ酸を含む、項目78～80のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目83)

前記外因性抗原が、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、隣細胞抗原、インスリン、並びに表F、表6、及び表8に列挙されるものからなる群から選択される、項目78～80のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

10

(項目84)

前記除核造血細胞が、少なくとも10コピー、100コピー、1,000コピー、10,000コピー、25,000コピー、50,000コピー、100,000コピー、500,000コピー、1,000,000コピー、又は2,000,000コピーの前記外因性抗原を含む、項目78～83のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目85)

前記除核造血細胞が、赤血球系細胞、血小板系細胞、又はそれらの前駆体である、項目78～84のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目86)

前記赤血球系細胞が赤血球又は網赤血球である、項目85に記載の除核造血細胞。

20

(項目87)

前記血小板系細胞が血小板である、項目85に記載の除核造血細胞。

(項目88)

前記除核造血細胞がドナーから単離される、項目78～84のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目89)

前記除核造血細胞が前記対象から自己細胞によって誘導される、項目78～84のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目90)

前記除核造血細胞が同種細胞によって誘導される、項目78～84のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

30

(項目91)

前記除核造血細胞が異種細胞によって誘導される、項目78～84のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目92)

前記除核造血細胞が、有核前駆細胞から、その核の排出を生じさせる培養に基づくプロセスによって誘導される、項目78～84のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目93)

前記除核造血細胞が、有核前駆細胞であって、その核を取り除く化学的又は物理的操作を受ける有核前駆細胞から作成される、項目78～84のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

40

(項目94)

前記除核造血細胞が、有核前駆細胞の核の照射又は化学的破壊によって作成される、項目78～84のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目95)

化学的破壊がサイトカラシンBによって行われる、項目94に記載の方法。

(項目96)

照射が、少なくとも5 Gy、7 Gy、10 Gy、15 Gy、25 Gy、30 Gy、40 Gy又は少なくとも50 Gyで行われる、項目94に記載の方法。

50

(項目 97)

前記外因性抗原が、外因性核酸によってコードされるポリペプチドである、項目 78 ~ 96 のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目 98)

ヒト供給源から誘導される、項目 78 ~ 97 のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目 99)

ブタ、チンパンジー、マカク、非ヒト霊長類、及び非霊長類哺乳動物からなる群から選択される非ヒト供給源から誘導される、項目 78 ~ 97 のいずれか一項に記載の除核造血細胞。

(項目 100)

前記ポリペプチド抗原が細胞内に局在する、項目 79 に記載の除核造血細胞。

10

(項目 101)

前記ポリペプチド抗原が前記細胞の表面上において細胞外に局在する、項目 79 に記載の除核造血細胞。

(項目 102)

前記ポリペプチド抗原が内因性細胞タンパク質に融合している、項目 79 に記載の除核造血細胞。

(項目 103)

前記ポリペプチド抗原が内因性膜貫通タンパク質の細胞内領域に融合している、項目 79 に記載の除核造血細胞。

20

(項目 104)

前記ポリペプチド抗原が内因性膜貫通タンパク質の細胞外領域に融合している、項目 79 に記載の除核造血細胞。

(項目 105)

前記ポリペプチド抗原がグリコシルホスファチジルイノシトール ( GPI ) アンカリングタンパク質に融合している、項目 79 に記載の除核造血細胞。

(項目 106)

項目 78 ~ 105 のいずれか一項に記載の除核造血細胞を含む組織培養バッチ。

(項目 107)

項目 78 ~ 105 のいずれか一項に記載の除核造血細胞の集団。

30

(項目 108)

項目 107 に記載の細胞集団を含む医薬組成物。

(項目 109)

免疫トレランスを誘導する方法であって、それを必要としている対象に対し、項目 108 に記載の医薬組成物を、前記対象において免疫トレランスを誘導するのに十分な量及び/又は頻度で投与するステップを含む方法。

(項目 110)

免疫活性化疾患を治療する方法であって、それを必要としている対象に対し、項目 108 に記載の医薬組成物を、前記免疫活性化疾患を治療するのに十分な量及び/又は頻度で投与するステップを含む方法。

40

(項目 111)

前記疾患が、自己抗体媒介性疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー性疾患、HLA 不適合媒介性疾患、及び免疫原性治療用タンパク質によって治療可能な疾患からなる群から選択される、項目 110 に記載の方法。

(項目 112)

治療用タンパク質治療レジメンに応答した免疫活性化を低減又は軽減する方法であって、それを必要としている対象に対し、項目 108 に記載の医薬組成物を、前記免疫活性化を実質的に低減又は軽減するのに十分な量及び/又は頻度で投与するステップを含む方法。

(項目 113)

50

前記治療用タンパク質が、表 I、表 J、及び表 7 に列挙されるものからなる群から選択される、項目 1 1 2 に記載の方法。

(項目 1 1 4)

表 F、表 G、表 H、表 I、表 J、表 6、表 7、及び表 8 に列挙されるものからなる群から選択される 1 つ以上の外因性ポリペプチド抗原と融合した内因性赤血球系細胞タンパク質をコードする核酸配列を含む発現ベクター。

(項目 1 1 5)

表 F、表 G、表 H、表 I、表 J、表 6、表 7、及び表 8 に列挙されるものからなる群から選択される 1 つ以上の外因性ポリペプチド抗原と融合した内因性赤血球系細胞タンパク質をコードする核酸配列を含むメッセンジャー RNA。

10

(項目 1 1 6)

免疫トレランスを誘導する方法であって、アレルギー媒介性疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象に対し、外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医薬組成物を投与するステップを含み、前記医薬組成物が、前記疾患、障害又は病態を媒介するアレルギーに対して前記対象において免疫トレランスを誘導するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 1 1 7)

前記外因性抗原が、A r a h 2、2 S アルブミン、ヒアラウロニダーゼ、及び表 H に列挙されるものからなる群から選択される、項目 1 1 6 に記載の方法。

20

(項目 1 1 8)

前記アレルギー媒介性疾患、障害又は病態が、ピーナツアレルギー、ナツアレルギー、昆虫毒アレルギー、及び表 H に列挙されるものからなる群から選択される、項目 1 1 6 に記載の方法。

(項目 1 1 9)

免疫トレランスを誘導する方法であって、ヒト白血球抗原 (H L A) 不適合媒介性疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象に対し、外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医薬組成物を投与するステップを含み、前記医薬組成物が、前記疾患、障害又は病態を媒介する H L A に対して前記対象において免疫トレランスを誘導するのに有効な量で投与される、方法。

30

(項目 1 2 0)

免疫トレランスを誘導する方法であって、免疫原性治療用分子によって治療され得る疾患、障害又は病態に罹患しているか又はその発症リスクがあるヒト対象に対し、外因性抗原を発現する除核造血細胞を含む医薬組成物を投与するステップを含み、前記医薬組成物が、前記疾患、障害又は病態の治療に使用される前記免疫原性治療用分子に対して前記対象において免疫トレランスを誘導するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 1 2 1)

前記治療用分子が、組換え (第 V I I I 因子)、ベネフィックス (第 I X 因子)、ヒュミラ (抗 T N F )、並びに表 I、表 J、及び表 7 に列挙されるものからなる群から選択される、項目 1 2 0 に記載の方法。

**【図面の簡単な説明】**

40

**【0 1 1 0】**

**【図 1】** リポソーム内に封入された蛍光標識 I g G と接触させた赤血球の一連のフローサイトメトリープロットである。リポソーム無し (左)、低用量のリポソーム (中央)、及び高用量のリポソーム (右) と共にインキュベートした細胞が示される。下段のヒストグラムには、蛍光を示す細胞の割合が示される。

**【図 2】** 定量的フローサイトメトリーによって評価した細胞表面発現レベルのプロットである。このプロットは、赤血球系細胞分化の過程における種々の細胞表面受容体 - グリコホリン A (塗り潰した三角形)、c K I T (破線上の四角形)、トランスフェリン受容体 (点線上の菱形) - 及び外因性表面トランス遺伝子 (白色の丸) を示す。

**【図 3 - 1】** 図 3 A ~ 3 C、3 F、3 I ~ 3 M、3 O ~ 3 Z 及び A A ~ A U は、3 つの細

50

胞型、除核赤血球系細胞、有核赤血球系前駆細胞、及び赤白血病細胞における、表面上での、細胞質における、融合物としての、及びインタクトなタンパク質としての多数の例示的抗原の発現を実証する一連のフローサイトメトリープロット及びウエスタンプロットである。図3A～3C、3F、3I-3M及び3O-3Sは、除核培養赤血球系細胞における表面タンパク質及び細胞質タンパク質の外因性発現を示す。図3A：共翻訳されるGFPの発現によって評価した、細胞質C末端にHAエピトープタグを有するグリコホリンAの発現。図3B：抗HA染色によって評価した、リーダー配列と遺伝子本体との間のN末端にHAエピトープタグを有するグリコホリンAの発現。図3C：抗HA染色によって評価した、N末端にHAエピトープタグを有する約70kDaの補体受容体1由来断片の発現。

10

【図3-2】抗HA染色によって評価した、グリコホリンAに対するN末端融合としての抗体scFvの発現。

【図3-3】抗HA染色によって評価した、71アミノ酸のKe11由来断片のC末端に融合した抗体scFvの発現。

【図3-4】図3J：抗HA染色によって評価した、79アミノ酸のKe11由来断片のC末端に融合した抗体scFvの発現。図3K：抗HA染色によって評価した、リーダー配列後の細胞外N末端にHAエピトープタグを有するCD55の発現。図3L：抗HA染色によって評価した、リーダー配列後の細胞外N末端にHAエピトープタグを有するCD59の発現。

【図3-5】図3M：抗HAウエスタンプロットによって評価した、37アミノ酸のCD55由来断片のN末端に融合した抗体scFvの発現。図3O：抗HAウエスタンプロットによって評価した、HAタグに融合したアデノシンデアミナーゼの細胞質発現。予想サイズ約40kDa。図3P：抗HAウエスタンプロットによって評価した、HAタグに融合したフェニルアラニンヒドロキシラーゼの細胞質発現。予想サイズ約33kDa。図3Q：抗HAウエスタンプロットによって評価した、アデノシンデアミナーゼ及びHAタグに融合したフェニルアラニンヒドロキシラーゼの細胞質発現。図3R：抗HAウエスタンプロットによって評価した、グリコホリンAの細胞内C末端に融合したアデノシンデアミナーゼの細胞質発現。予想サイズ約55kDa。図3S：抗HAウエスタンプロットによって評価した、グリコホリンAの細胞内C末端に融合したフェニルアラニンヒドロキシラーゼの細胞質発現。予想サイズ約50kDa。

20

30

【図3-6】図3T-3AO：有核培養赤血球系前駆細胞における表面タンパク質及び細胞質タンパク質の外因性発現を示す。図3T：共翻訳されるGFPの発現によって評価した、細胞質C末端にHAエピトープタグを有するグリコホリンAの発現。図3U：抗HA染色によって評価した、リーダー配列と遺伝子本体との間のN末端にHAエピトープタグを有するグリコホリンAの発現。図3V：抗CR1染色によって評価した、補体受容体1の過剰発現。

【図3-7】図3W：抗HA染色によって評価した、N末端にHAエピトープタグを有する約70kDaの補体受容体1由来断片の発現。図3X：抗HA染色によって評価した、N末端にHAエピトープタグを有する約210kDaの補体受容体1由来断片の発現。図3Y：抗HA染色によって評価した、N末端にHAエピトープタグを有するグリコホリンAのN末端に融合した約230kDaの補体受容体1由来断片の発現。

40

【図3-8】図3Z：抗HA染色によって評価した、グリコホリンAに対するN末端融合としての抗体scFvの発現。図3AA：抗HA染色によって評価した、Ke11の細胞外C末端に融合した抗体scFvの発現。予想サイズ約108kDa。図3AB：抗HA染色によって評価した、Ke11の細胞外C末端に融合したHAタグの発現。

【図3-9】図3AC：抗HA染色によって評価した、C(細胞外)末端にHAタグを有する71アミノ酸のKe11由来断片の発現。図3AD：抗HA染色によって評価した、C末端にHAタグを有する79アミノ酸のKe11由来断片の発現。図3AE：抗HA染色によって評価した、71アミノ酸のKe11由来断片のC末端に融合した抗体scFvの発現。

50

【図3-10】図3AF：抗HA染色によって評価した、79アミノ酸のK e l l由来断片のC末端に融合した抗体s c F vの発現。図3AG：抗HA染色によって評価した、リーダー配列後の細胞外N末端にHAエピトープタグを有するCD55の発現。図3AH：抗HA染色によって評価した、リーダー配列後の細胞外N末端にHAエピトープタグを有するCD59の発現。

【図3-11】図3AI：抗HA染色によって評価した、37アミノ酸のCD55由来断片のN末端に融合した抗体s c F vの発現。図3AJ：抗HA染色によって評価した、CD59のN末端に融合した抗体s c F vの発現。図3AK：抗HAウエスタンブロットによって評価した、HAタグに融合したアデノシンデアミナーゼの細胞質発現。予想サイズ約40kDa。図3AL：抗HAウエスタンブロットによって評価した、HAタグに融合したフェニルアラニンヒドロキシラーゼの細胞質発現。予想サイズ約33kDa。

【図3-12】図3AM：共翻訳されるGFPからの蛍光についてフローサイトメトリーによって評価した、アデノシンデアミナーゼ及びHAタグに融合したフェニルアラニンヒドロキシラーゼの細胞質発現。図3AN：抗HAウエスタンブロットによって評価した、グリコホリンAの細胞内C末端に融合したアデノシンデアミナーゼの細胞質発現。予想サイズ約55kDa。図3AO：抗HAウエスタンブロットによって評価した、グリコホリンAの細胞内C末端に融合したフェニルアラニンヒドロキシラーゼの細胞質発現。予想サイズ約50kDa。図3AP-3AU：K562赤白血病細胞における表面タンパク質及び細胞質タンパク質の外因性発現を示す。図3AP：抗CR1染色によって評価した、補体受容体1の過剰発現。

【図3-13】図3AP-3AU：K562赤白血病細胞における表面タンパク質及び細胞質タンパク質の外因性発現を示す。図3AQ：抗HA染色によって評価した、グリコホリンAに対するN末端融合としての抗体s c F vの発現。図3AR：抗HA染色によって評価した、37アミノ酸のCD55由来断片のN末端に融合した抗体s c F vの発現。図3AS：抗HA染色によって評価した、CD59のN末端に融合した抗体s c F vの発現。

【図3-14】図3AT：抗HAウエスタンブロットによって評価した、HAタグに融合したアデノシンデアミナーゼの細胞質発現。予想サイズ約40kDa。図3AU：抗HAウエスタンブロットによって評価した、HAタグに融合したフェニルアラニンヒドロキシラーゼの細胞質発現。予想サイズ約33kDa。

【図4】蛍光タンパク質(GFP)をコードするmRNAをトランスフェクトした初代血小板における蛍光を計測する一連のフローサイトメトリーヒストグラムである。(A)非トランスフェクト血小板。(B)3ug GFP mRNAをトランスフェクトした血小板。(C)6.8ug GFP mRNAをトランスフェクトした血小板。

【図5】培養下のトランスジェニック赤血球系細胞のタンパク質発現及び酵素活性を示す。(A)は、有核前駆細胞(「分化I D5」)から除核赤血球系細胞(「分化I I I D8」)に至るまでの分化の過程にわたって抗HA抗体で検出した外因的に発現するアデノシンデアミナーゼのウエスタンブロットである。(B)は、インタクトなアデノシンデアミナーゼ発現293T細胞によってアデノシンから産生されるイノシンの棒グラフである。(C)は、有核前駆細胞(「分化I D5」)から除核赤血球系細胞(「分化I I I D8」)に至るまでの分化の過程にわたって種々の時点で抗HA抗体で検出した外因的に発現するフェニルアラニンヒドロキシラーゼのウエスタンブロットである。(D)は、培養フェニルアラニンヒドロキシラーゼ発現除核赤血球系細胞のライセートによってフェニルアラニンから産生されるチロシンの棒グラフである。

【図6】補体受容体1(CR1)を過剰発現する培養赤血球系細胞による免疫複合体の捕捉及びマクロファージへのトランスファーを示す。(A)は、CR1を過剰発現する培養赤血球系細胞による蛍光免疫複合体(白色のヒストグラム)及び補体欠損免疫複合体(網掛けのヒストグラム)の捕捉を示すフローサイトメトリープロットである。(B)は、マクロファージ(左のセット)又はCR1を過剰発現する培養赤血球系細胞と共にインキュベートしたマクロファージ(右のセット)による蛍光免疫複合体(斜線網掛けのバー)、

10

20

30

40

50

補体欠損免疫複合体（灰色のバー）、又は免疫複合体無し（黒色のバー）の取込みを評価するフローサイトメトリーデータの棒グラフである。

【図7】培養赤血球系細胞の表面上のB型肝炎表面抗原を結合する抗体s c F v（s c F v）の活性を示す。（A）は、450 nM抗原（白色のヒストグラム）又は抗原無し（灰色のヒストグラム）の結合を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。（B）は、様々な抗原濃度についてフローサイトメトリーによって評価した結合シグナルのタイトレーションである。（C～D）は、蛍光抗原及びs c F vを発現しない（C）又は発現する（D）培養赤血球系細胞を注射したマウスからの血液細胞のフローサイトメトリープロットである。y軸は抗原蛍光を表す。x軸は培養細胞の蛍光を表す。

【図8 - 1】インビボで外因性抗原発現EHCによって媒介される循環抗体の特異的クリアランスを示す。（A）は、表面上にHAエピトプタグを発現しない（上）、或いは発現する（下）レシピエントマウスから単離したCFSE標識培養ヒト赤血球系細胞に対する循環Dy l i g h t 6 5 0標識マウス抗HA抗体の結合無し（上）及び結合（下）を示す一組のフローサイトメトリープロットである。x軸はCFSE蛍光を表す。y軸は抗HA抗体Dy l i g h t 6 5 0蛍光を表す。（B）は、抗HA抗体（白色の丸、実線）、抗HA抗体と、続いてHAエピトプタグを発現しない培養ヒト赤血球系細胞（破線）、又は抗HA抗体と、続いてHAエピトプタグを発現する培養ヒト赤血球系細胞（点線）を注射したマウスから採取した血漿中の経時的な抗HA抗体レベルを比較するHAエピトプタグ基質ELISAからのデータである。（C）は、表面上でビオチンにコンジュゲートしていない（上）、或いはコンジュゲートしている（下）CFSE標識初代ヒト赤血球に対するDy l i g h t 6 5 0標識マウス抗ビオチン抗体の結合無し（上）及び結合（下）を示す一組のフローサイトメトリープロットである。x軸はCFSE蛍光を表す。y軸は抗ビオチン抗体Dy l i g h t 6 5 0蛍光を表す。（D）は、抗ビオチン抗体（白色の丸、実線）、抗ビオチン抗体と、続いてビオチンにコンジュゲートしていない培養ヒト赤血球系細胞（破線）、又は抗ビオチン抗体と、続いてビオチンにコンジュゲートしている培養ヒト赤血球系細胞（点線）を注射したマウスから採取した血漿中の経時的な抗ビオチン抗体レベルを比較するビオチン基質ELISAからのデータである。

【図8 - 2】インビボで外因性抗原発現EHCによって媒介される循環抗体の特異的クリアランスを示す。（A）は、表面上にHAエピトプタグを発現しない（上）、或いは発現する（下）レシピエントマウスから単離したCFSE標識培養ヒト赤血球系細胞に対する循環Dy l i g h t 6 5 0標識マウス抗HA抗体の結合無し（上）及び結合（下）を示す一組のフローサイトメトリープロットである。x軸はCFSE蛍光を表す。y軸は抗HA抗体Dy l i g h t 6 5 0蛍光を表す。（B）は、抗HA抗体（白色の丸、実線）、抗HA抗体と、続いてHAエピトプタグを発現しない培養ヒト赤血球系細胞（破線）、又は抗HA抗体と、続いてHAエピトプタグを発現する培養ヒト赤血球系細胞（点線）を注射したマウスから採取した血漿中の経時的な抗HA抗体レベルを比較するHAエピトプタグ基質ELISAからのデータである。（C）は、表面上でビオチンにコンジュゲートしていない（上）、或いはコンジュゲートしている（下）CFSE標識初代ヒト赤血球に対するDy l i g h t 6 5 0標識マウス抗ビオチン抗体の結合無し（上）及び結合（下）を示す一組のフローサイトメトリープロットである。x軸はCFSE蛍光を表す。y軸は抗ビオチン抗体Dy l i g h t 6 5 0蛍光を表す。（D）は、抗ビオチン抗体（白色の丸、実線）、抗ビオチン抗体と、続いてビオチンにコンジュゲートしていない培養ヒト赤血球系細胞（破線）、又は抗ビオチン抗体と、続いてビオチンにコンジュゲートしている培養ヒト赤血球系細胞（点線）を注射したマウスから採取した血漿中の経時的な抗ビオチン抗体レベルを比較するビオチン基質ELISAからのデータである。

【図9】マウスにおける培養ヒト赤血球系細胞のクリアランス速度を示す。（A）は、ヒトグリコホリンA（y軸）及びCFSE（x軸）について染色した採取血液の代表的なフローサイトメトリードットプロットであり、ここではヒト培養細胞がダブルポジティブである。（B）は、NSGマウスにヒト赤血球（塗り潰しの丸）、培養除核赤血球系細胞（破線上の菱形）、細胞内外因性タンパク質を発現する培養除核赤血球系細胞（点線上の四

10

20

30

40

50



角形)及び表面外因性タンパク質を発現する培養除核赤血球系細胞(白色の三角形)を注射した後に残るダブルポジティブ細胞の割合としての経時的なクリアランス速度のプロットである。

【図10】培養ヒト赤血球系細胞をマウスに注射した後の有害事象の評価である。(A~B)は、(1)ヒト赤血球、(2)培養ヒト赤血球系細胞、(3)外因性細胞質タンパク質を発現する培養ヒト赤血球系細胞、(4)外因性表面トランス遺伝子を発現する培養ヒト赤血球系細胞、又は(5)組換えタンパク質の注射後20分(黒色)、6時間(灰色)、及び48時間(白色)にマウスから採取した血漿中のELISAによって評価した(A)フィブリノペプチドA及び(B)フィブリノペプチドBのレベルを示す。(C~D)は、(C)培養ヒト赤血球系細胞及び(D)組換えタンパク質を注射したマウスに関する脾臓の組織染色切片の顕微鏡像を示す。

10

【図11】循環中の培養赤血球系細胞上での外因性タンパク質の発現を追跡する。(A)は、外因性表面タンパク質を発現する培養ヒト赤血球系細胞を注射したマウスから採取した血液のフローサイトメトリーデータであり、経時的なHA陽性の培養ヒト赤血球系細胞のパーセントを示す。(B)は、2匹のマウスから採取した血液のウエスタンブロットであり、ここで一方のマウスには外因性細胞質タンパク質を発現する培養ヒト赤血球系細胞を注射し、他方のマウスには細胞の非存在下で精製組換え産生外因性タンパク質を注射しており、経時的な血中HA含有タンパク質レベルを示す。

【図12】培養ヒト赤血球系細胞の拡大及び分化の評価である。(A)は、トランス遺伝子を含有するインビトロ分化赤血球系細胞(破線及び点線)及びトランス遺伝子を含有しない細胞(実線)の個別的な培養物に関する拡大速度のプロットである。(B)は、トランス遺伝子を含有しない(左)又は含有する(右)培養ヒト赤血球系細胞の個別的な培養物に関する細胞表面マーカーGPA及びCKITのフローサイトメトリープロットである。(C)は、トランス遺伝子を含有しない(左)又は含有する(右)培養ヒト赤血球系細胞のフローサイトメトリープロットであり、ここで細胞はDNA染色剤DRAQ5(y軸)及び抗グリコホリンA(x軸)で染色し、これによって(1)除核細胞、(2)有核細胞、及び(3)核の個別的な集団が同定される。

20

【図13】図13Aは、抗原が外因性抗原発現EHCに局在し得る3つの方法の概略図である。図13Bは、外因性抗原発現EHC内又はその上に局在する抗原が循環中の標的に作用し得る3つの方法の概略図である。図13Cは、SpyTag-SpyCatcher機構を利用した抗原に対する内因性ポリペプチドアンカーの自己触媒融合の概略図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0111】

本発明は、特定の態様において、目的の外因性抗原を含有するように操作又は修飾された単離細胞を提供する。特定の態様において、本発明の単離EHCは、ポリペプチドを含むか又はそれからなる1つ以上の抗原を含む。一部の実施形態において、抗原は完全長タンパク質である。一部の実施形態において、抗原は、約7アミノ酸より大きい任意の長さの、完全長タンパク質内に含まれる1つ以上のポリペプチドを含む。抗原を含むポリペプチドは、立体エピトープであってもよく、又は線状エピトープであってもよい1つ以上の免疫学的エピトープを含み得る。抗原は、1つ以上の異なるタンパク質由来の1つ以上のポリペプチドを含み得る。特定の態様において、本発明のEHCは、炭水化物を含むか又はそれからなる1つ以上の抗原を含む。特定の態様において、本発明のEHCは、脂質を含むか又はそれからなる1つ以上の抗原を含む。特定の態様において、本発明のEHCは、1つ以上のポリペプチド、脂質、及び/又は炭水化物、及びそれらの任意の組み合わせを含むか又はそれからなる1つ以上の抗原を含む。細胞はEHCなどの循環細胞であり得る。EHCは、例えば幹細胞因子、IL-3及びIL-6などのサイトカイン、インスリン、トランスフェリン、エリスロポエチン、ヒドロコルチゾン、及びエストロゲンなどの定義付けられた因子を使用して造血前駆体から培養することができる。

40

【0112】

50

本発明の態様は、目的の外因性抗原を含むようにEHCを培養する方法に関する。目的の外因性抗原は、例えば、細胞内発現、細胞表面発現、内因性タンパク質との融合、化学的又は酵素的手段による細胞表面タンパク質とのコンジュゲーション、又は細胞内空間への物理的負荷など、幾つもの方法によって導入することができる。本発明の抗原を含む細胞は治療剤として使用し得る。

#### 【0113】

本発明の態様は、末梢性トレランスの誘導による免疫活性化疾患の治療におけるこれらの抗原を含む細胞の使用に関する。一部の態様において、末梢性トレランスの誘導とは、例えばCD8 Tリンパ球(CD8 T細胞)、CD4 Tリンパ球(CD4 T細胞)、CD4 T調節性リンパ球(Treg)、又はBリンパ球(B細胞)などの抗原特異的免疫細胞の消失又は不活性化を意味する。免疫活性化疾患には、自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、1型糖尿病、関節リウマチ、及び膜性腎炎などが含まれる。免疫活性化疾患にはまた、炎症性疾患、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、又は他の特発性炎症性腸疾患なども含まれる。免疫活性化疾患にはまた、アレルギー性疾患、例えば、喘息、ピーナッツアレルギー、甲殻類アレルギー、花粉アレルギー、乳タンパク質アレルギー、虫刺されアレルギー、及びラテックスアレルギーなども含まれる。免疫活性化疾患にはまた、例えば、血友病Aにおける第VII凝固因子、血友病Bにおける第IX凝固因子、関節リウマチ及び他の炎症性疾患における抗腫瘍壊死因子(TNF $\alpha$ )抗体、ゴースェ病におけるグルコセレブロシダーゼ、又は急性リンパ性白血病(ALL)におけるアスパラギナーゼなどの治療用タンパク質の有効性を低下させる、原発病態の治療のために投与される治療用タンパク質に応答した免疫活性化も含まれる。

#### 【0114】

##### 免疫トレランスの生物学

身体においては、異常な免疫活性化及び自己免疫疾患を防ぐための精巧な機構が進化しており、こうした機構はまとめて免疫トレランスと称される。中枢性トレランスは、一次リンパ器官、例えば胸腺及び骨髄で発生する間の自己反応性T細胞及びB細胞の抗原特異的な消失を指す。末梢性トレランスは、一次リンパ器官外での成熟T及びBリンパ球の消失又は不活性化を指す。末梢性トレランスには、調節性T細胞(Treg)による自己反応性リンパ球の抑制又は共刺激「危険」シグナルの非存在下で低用量の抗原に連続的に曝露することによる抗原特異的エフェクターリンパ球におけるアネルギー又は非反応性の誘導が含まれる。Treg活性化及びリンパ球アネルギーは両方とも、阻害因子、例えば、TGF- $\beta$ 、IL-10、及びIL-4などの分泌によって誘導され得る。

#### 【0115】

抗原に応答した免疫活性化は、多くの場合に、病原性微生物又はウイルスに由来することの多いToll様受容体リガンドなどの二次的「危険」シグナルを必要とする(Matzinger, Annu Rev Immunol 1994)。かかる危険シグナルには、二本鎖RNA、一本鎖DNA、リポ多糖、細菌性リポタンパク質、フラジェリン、ゼイモサンなどが含まれる。抗原及び危険シグナルの両方を受け取る抗原提示細胞は、その表面上に、抗原ペプチドに加えてCD80及びCD86などの共刺激分子を提示する。抗原ペプチド及び共刺激分子の両方を認識するT細胞が活性化する。抗原ペプチドシグナルのみを受け取るものはアネルギーとなる。

#### 【0116】

多くの食物アレルギーの実験的治療のため、危険シグナルが存在しない場合の抗原提示を利用して免疫トレランスを誘導する治療戦略が開発されている。これらの研究は、トレランスの誘導を意図した漸増用量のアレルゲンに対する長期曝露の形態をとる。2007年以降、13件の研究において、ピーナッツ、牛乳、及び卵などの種々の一般的な食物アレルゲンがこのフォーマットで試験されている。患者の50~100%が感作され、即ち、アナフィラキシーを起こすことなく食物による攻撃誘発を耐え抜くことができている。しかしながら、長期トレランスは奏効率が低く、1カ月の無治療の後に抗原に耐えることができる患者は僅か25~50%である。例えば、Burks et al., New

England Journal of Medicine 2012を参照されたい。  
【0117】

アレルギーはIgE媒介性であり、肥満細胞及び好塩基球の活性化を伴うと考えられている。持続補給など、低用量のアレルゲンの経口投与は、CD11c<sup>+</sup>樹状細胞による抗原提示並びにTGF- $\beta$ 、IL-10、及びIL-4の分泌を介してTregを誘導する。高用量の経口投与は、形質細胞性樹状細胞を介した抗原特異的T細胞の消失及びアレルギーを誘導する。ヒト研究では、アレルゲンの経口投与が、IgE、肥満細胞、及び好塩基球の減少、IgG4、TGF- $\beta$ 、IL-10の増加、及び治療開始時のTregの一時的な上昇をもたらしている。例えば、Herzog, Adv Drug Deliv Rev 2013を参照されたい。

10

【0118】

いかなる特定の機構に限定されることも望まないが、末梢性免疫トレランスはアポトーシス細胞からの自己抗原によって誘導され得ると考えられる(Griffith and Ferguson, Immunity 2011; Green et al., Nat Rev Immunol 2009)。分子の観点から正確な機構は完全には分かっていないが、HSP90などの自己タンパク質及び他の損傷関連分子パターンが樹状細胞による取り込みを促進する。CD205などの樹状細胞受容体がこれらのシグナルを認識し、抗原を交差提示し、及び寛容原性サイトカインを誘導して共刺激タンパク質発現を抑制する(Bonifaz, J Exp Med 2002)。

【0119】

アポトーシス細胞の潜在的な寛容原性能力を利用して末梢性免疫トレランスを誘導する治療戦略の調査が進められている。こうした戦略には、典型的には細胞の表面に対する目的の抗原の化学的カップリングが関わる。マウス、ラット、及びモルモットにおける研究では、種々のタンパク質抗原が脾細胞及び白血球の表面に化学的に取り付けられている。例えば、Miller et al., J Exp Med 1979; Braley-Mullen et al., Cell Immunol 1980; Luo et al., PNAS 2008; Smarr et al., J Immunol 2011を参照されたい。

20

【0120】

最近のヒトにおける第I相臨床研究において、多発性硬化症に関連するペプチド抗原のカクテルが自己末梢血単核細胞と化学的にカップリングされ、患者に再注入された(Lutterotti and Martin, Sci Trans Med 2013)。これらの細胞は良好に忍容され、抗原特異的T細胞応答の低下のエビデンスがあった。

30

【0121】

EHCは、顕著な瀕死細胞源である。毎日、エリプトーシスと呼ばれるアポトーシス様プログラム細胞死の後に多数の赤血球が除去される(ヒトでは1日1%超、約 $1 \times 10^{11}$ 細胞)。赤血球クリアランスの正確なトリガーは未だ不明であるものの、エリプトーシス赤血球は、アポトーシス有核細胞に類似して、ホスファチジルセリン非対称性、膜不均一性、及びアネキシン-V結合によって特徴付けられる。

【0122】

EHCはまた、体内での持続性もある。成人ヒトにおいて赤血球は最長120日間循環する。そのため、目的の抗原を含むEHCは、抗原を宿主に持続的に曝露させることが可能であり得る。上記に記載したとおり、正確な分子機構は完全には分かっていないものの、抗原に対する持続的な曝露は共刺激シグナルの非存在下における抗原提示によって末梢性トレランスを誘導し、調節性T細胞の拡大、エフェクターT及びB細胞の消失及びアレルギー、並びに抗炎症及び寛容原性促進サイトカインの分泌につながり得ると考えられる。

40

【0123】

赤血球を利用することによる末梢性トレランスの誘導は、また実験的にも調査されている。予備研究では、モデル抗原オボアルブミンが、赤血球に非共有結合的に結合させたと

50

き (Kontos et al., PNAS 2013) 又は赤血球に浸透圧的に負荷したとき (Cremel and Godfrin, Int J Pharm 2013)、抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞の消失及び抗原特異的 Treg 誘導を誘導することが示されている。

#### 【0124】

目的の外因性抗原を含む本発明の培養 EHC は、赤血球に例えばポリペプチド結合ドメインを介して非共有結合的に結合させた抗原に優る特徴的な利点を有し得る。1つの利点は、目的の外因性抗原を含む EHC の体内分布が、標的ドメインを有する抗原のポリペプチド組成物と比べてより定義付けられていることであり得る。目的の外因性抗原を含む EHC は、血管系及び赤血球が典型的に存在する場所、例えば脾臓に限られることになる。目的の外因性抗原を含む EHC は、ポリペプチド抗原組成物を投与したときに生じ得る問題である、腎臓でろ過によって取り除かれたり、又は末梢組織中に抜け出たりすることがない。EHC 当たりの外因性抗原の用量は、目的の外因性抗原を含む細胞を培養する場合には、ポリペプチド抗原を血流中に直接注入して血流内の約 10 兆個の赤血球にわたり分布させる場合と比べて大幅に高くなり得る。場合によっては、目的の外因性抗原を EHC の細胞内コンパートメント内に限局させる方が好ましいこともある。例えば、抗原が免疫原性である場合、免疫系から免疫原性抗原が隠され、従って免疫活性化が防止又は低減されるため、細胞内局在が有利となり得る。この構成は、ポリペプチド抗原組成物では不可能である。

#### 【0125】

目的の外因性抗原を発現する培養 EHC は、EHC に浸透圧的に負荷された抗原に優る特徴的な利点を有し得る。目的の外因性抗原を含む培養 EHC は、大きい孔によって細胞膜及び細胞骨格の完全性が破壊される浸透圧負荷手順の生成物とは対照的に、実質的に改変されていない細胞膜及び細胞骨格を有し得る。EHC の形態及び生物物理学的特徴は、細胞の体内分布、循環、並びに血管系及び免疫細胞との相互作用の重要な決定要因であり (例えば、Pries et al., Cardiovasc. Res. 1996)、ひいては細胞完全性の維持は有効性の保持に重要であり得る。例えば内因性細胞質タンパク質との直接の融合又は内因性膜貫通タンパク質との融合によって培養 EHC に物理的に結合した外因性抗原は、EHC が消費されるまでは、細胞から漏出して免疫系に曝露されることがない。漏出の問題は、細胞膜が損傷を受け得る浸透圧負荷手順を使用して細胞を抗原と接触させる場合に生じ得る。

#### 【0126】

目的の抗原を発現する培養 EHC は、その抗原を必要としている対象に直接投与することができる。生成物製造中の抗原の分離及び精製は不要である。これは、抗原を別途合成して精製し、次に細胞と組み合わせなければならない浸透圧負荷生成物とは対照的であり、生成物の製造において顕著なコスト及び時間上の利点をもたらし得る。目的の抗原を発現する培養 EHC は、培養下での増殖によってスケールアップすることができる。大型の工業規模の細胞バッチを作製して、多くの対象を広く治療するために使用し得る所与の抗原に関して実質的に均一な EHC 医薬組成物を作成し得る。対照的に、浸透圧負荷は概して 1 ドナー対 1 対象のスケールに限られている。

#### 【0127】

##### 細胞の入手

本発明の外因性抗原発現除核造血細胞は、本明細書に記載される任意の方法によって作成することができる。一部の実施形態において、これらのステップには、造血幹細胞から誘導された単離され、任意選択で培養された細胞を抗原と接触させるステップが含まれる。造血幹細胞は、骨髄系統 (単球及びマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球/血小板、樹状細胞) 及びリンパ系統 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞) を含め、哺乳類の血中に見られるあらゆる血液細胞型を生じる。造血幹細胞は、例えば大腿骨、寛骨、肋骨、又は胸骨を含めた成人骨の骨髄から単離し得る。細胞は、例えば針及びシリンジによる吸引を用いて骨髄から細胞を抜き取ることにより、股関節部から直接得てもよい

。或いは、造血幹細胞は、例えば顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）などのサイトカインによる前治療の後に正常末梢血から単離してもよい。G - C S Fは骨髓コンパートメントから末梢循環への細胞の遊離を動員する。他の造血幹細胞源としては、臍帯血及び胎盤が挙げられる。

【 0 1 2 8 】

単離造血幹細胞を培養し、拡大し、及びエキソピボで分化させて種々の供給源材料を提供することにより、外因性抗原発現 E H C を作成し得る。例えば、骨髓、サイトカイン刺激末梢血又は臍帯血から単離した造血幹細胞を拡大してエキソピボで成熟赤血球に分化させ得る（Giarratana et al., Nature Biotech. 23: 69 - 74 (2005)；米国特許出願公開第 2007/0218552 号明細書）。このように、例えば磁気マイクロビーズ選択法及び Mini - MACS カラム（Miltenyi Biotech）を使用して CD 3 4 + 細胞を骨髓又は末梢血若しくは臍帯血から単離する。一例では、続いて細胞を、1% ウシ血清アルブミン（BSA）、120 μg / ml 鉄飽和ヒトトランスフェリン、900 ng / ml 硫酸第一鉄、90 ng / ml 硝酸第二鉄及び 10 μg / ml インスリンを補充した改変無血清培地で培養し、37、5% 二酸化炭素の空气中に維持する。細胞培養物の拡大及び分化は多段階で行い得る。例えば、単離後の最初の成長段階で、本明細書に記載される培地において、例えばヒドロコルチゾン、幹細胞因子、I L - 3、及びエリスロポエチンを含めた複数の成長因子の存在下で細胞を拡大し得る。第 2 段階では、任意選択で、例えば付着間質細胞層上でエリスロポエチンの存在下で細胞を共培養し得る。第 3 段階では、外的因子の非存在下で培養培地中の付着間質細胞層上で細胞を培養し得る。付着間質細胞層は、例えばマウス MS - 5 間質細胞であってもよい。或いは、付着間質細胞層は、成人骨髓に由来する間葉間質細胞であってもよい。付着間質細胞は、例えば 10% ウシ胎仔血清を補充した RPM I 中に維持し得る。一部の実施形態において、赤血球系前駆細胞及びそれから得られる細胞集団は、非 E H C、例えば付着間質細胞層と共培養されず、即ち非 E H C の非存在下で培養される。一部の実施形態では、E H C の 10% 超、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 又は 98% 超が除核され、且つ除核細胞を選択するための濃縮ステップ、例えば重力分離、磁気又は蛍光選別、照射、有核細胞の中毒化などを用いることなく除核細胞の集団が得られるように、抗原を含む E H C は非 E H C の非存在下で培養し、分化させる。

【 0 1 2 9 】

場合によっては、インピトロで CD 3 4 + 造血幹細胞を拡大して部分的に分化させて、インピボで成熟赤血球への最終分化を生じさせることが望ましいこともある（例えば、Neildez - Nguyen et al., Nature Biotech. 20: 467 - 472 (2002) を参照）。単離 CD 3 4 + 造血幹細胞はインピトロで、例えば Flt 3 リガンド、幹細胞因子、トロンボポエチン、エリスロポエチン、及びインスリン成長因子を含めた種々の因子を含有する培地において付着間質細胞層の非存在下で拡大し得る。得られる赤血球系前駆細胞は CD 3 6 及び G P A の表面発現によって特徴付けることができ、対象に輸注して、そこで成熟赤血球への最終分化を生じさせ得る。

【 0 1 3 0 】

一部の実施形態において、E H C 集団は、除核中に保持される抗原ポリペプチドを含む複数の除核 E H C を含む。これにより得られる、抗原ポリペプチドを含む単離除核 E H C は、対応する単離非修飾非培養 E H C と実質的に同じ浸透圧膜脆弱性を呈する。

【 0 1 3 1 】

一部の実施形態において、E H C 集団は、実質的に同じ分化段階及び / 又は細胞周期段階にある複数の赤血球前駆細胞を含み、ここで前駆細胞は、抗原をコードする組換え核酸を含む。抗原をコードする組換え核酸を含む赤血球前駆細胞の大多数は、組換え核酸を保持せずに抗原を保持する成熟赤血球に分化する能力を有する。

【 0 1 3 2 】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、初代細胞は、静脈穿刺、毛細血管穿刺、又は動脈穿刺によって採取し得る。次に、採取した全血から、血漿枯濁、密度勾配、ヘタスターチ、PrepaCyte-CB、及び遠心を含む技法の1つ、又は組み合わせを用いて赤血球、血小板又は他の細胞を単離し得る。

#### 【0133】

同種/及び自己供給源

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCの作成には、対象にとって自己及び/又は同種の、単離され、任意選択で培養された細胞を抗原と接触させるステップが含まれる。例えば、対象にとって同種の赤血球には、血液型特異的赤血球の1つ以上又は1つ以上の万能ドナー赤血球が含まれる。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、赤血球の融合、例えば、対象にとって自己の赤血球と1つ以上の同種赤血球、リポソーム、及び/又は人工小胞との間の融合によって作成し得る。

10

#### 【0134】

特定の実施形態において、外因性抗原発現EHCの自己輸血には、対象から赤血球、網赤血球又は造血幹細胞を単離すること、本明細書に記載される方法によってその細胞を抗原と接触させて好適な外因性抗原発現EHCを作成すること、及びその外因性抗原発現EHCを(例えば、輸液によって)同じ対象に投与することが含まれる。

#### 【0135】

特定の実施形態において、外因性抗原発現EHCの同種輸血には、ドナーから赤血球、網赤血球又は造血幹細胞を単離すること、本明細書に記載される方法によってその細胞を抗原と接触させて好適な外因性抗原発現EHCを作成すること、及びその外因性抗原発現EHCを(例えば、輸液によって)ドナーとは異なる対象に投与することが含まれる。輸血に同種細胞が使用される場合、適合性ABO血液型を使用して、補体活性化及び不適合赤血球の溶解によって特徴付けられる急性血管内溶血性輸血反応を防ぐように注意を払う必要がある。ABO血液型は、血液型抗原A及びBが存在するか否か、赤血球の表面上の糖タンパク質類及び糖脂質類に関連するオリゴ糖鎖の末端に見られる単糖糖鎖構造に基づき定義される(Liu et al., Nat. Biotech. 25: 454-464 (2007))にレビューされる)。O型赤血球はこれらの抗原性単糖構造のいずれをも欠いている。A型赤血球の対象は、B型赤血球に対する天然に存在する抗体を有し、一方、B型赤血球の対象は、A型赤血球に対する抗体を有する。血液型ABの対象はいずれの抗体も有さず、及び血液型Oの個体は両方を有する。抗A抗体及び/又は抗B抗体のいずれかを有する対象は、対応する抗原を含有する血液の輸血を受けることができない。O型赤血球はA抗原もB抗原も含まないため、いずれのABO血液型のレシピエントにも、例えば、A型、B型、AB型、又はO型レシピエントに安全に輸血することができる。O型赤血球は万能と考えられ、あらゆる輸血に使用し得る。対照的に、A型赤血球はA型及びAB型レシピエントに提供することができ、B型赤血球はB型及びAB型レシピエントに提供することができ、及びAB型赤血球はAB型レシピエントにのみ提供することができる。赤血球又はその前駆体を抗原と接触させることによって外因性抗原発現EHCが作成される実施形態において、供給源となる赤血球又はその前駆体は、レシピエントと適合するようにマッチングされる。

20

30

40

#### 【0136】

場合によっては、非O型赤血球を含む外因性抗原発現EHCを万能血液型に変換することが有益であり得る。A型及びB型赤血球の表面上にある免疫優性単糖類の酵素的除去を用いて、O型様外因性抗原発現EHCの集団を作成し得る(例えば、Liu et al., Nat. Biotech. 25: 454-464 (2007))を参照)。B型外因性抗原発現EHCは、生コーヒー豆に由来する $\alpha$ -ガラクトシダーゼを使用して変換し得る。それに代えて又は加えて、E.メニンゴセプトカム菌(E. meningosepticum)に由来する $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ及び $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性を使用して、それぞれ免疫優性A抗原及びB抗原を(外因性抗原発現EHC上に存在する場合には)除去し得る(Liu et al., Nat. Biotech. 25:

50

454-464(2007))。一例では、本明細書に記載するとおり単離した濃厚赤血球を - N - アセチルガラクトサミニダーゼ及び - ガラクトシダーゼ(約300 µg/ml 濃厚赤血球)のいずれかの存在下で200 mMグリシン(pH6.8)及び3 mM NaCl中、26 で60分間インキュベートする。処理後、赤血球を生理食塩水中で遠心して3~4回リンスすることによって洗浄し、標準的な血液バンキング技術によってABO型を決定する。

#### 【0137】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される外因性抗原発現EHCは以下の方法で作成し得る。初めに、赤血球系前駆細胞を単離する。これらの細胞は、或いは患者の自己細胞であっても、又は実質的に万能なドナー血液由来であってもよい。例えば、細胞は、ABO式O型、リーサス因子Rh<sup>r</sup>/r、ダッフィ-/、及び大型ケル抗原K1陰性であってもよい。赤血球系前駆細胞からEHCへの分化の過程で、抗原をコードする組換え核酸が導入される。この抗原をコードする組換え核酸は、GATA-1プロモーターなどの赤血球系特異的プロモーターの制御下にあり得る(例えば、Repik et al., Clin Exp Immunol 2005, 140:230を参照)。抗原をコードする組換え核酸は、当該技術分野において公知の任意の方法で、例えばプラスミドDNA、ウイルス、又はmRNAとして導入することができる。核酸導入は、種々の標準方法、例えば、トランスフェクション、形質導入、又は電気穿孔によって達成することができる。

#### 【0138】

##### 血小板誘導及び成熟

具体的な実施形態において、本明細書に記載される外因性抗原発現EHCは、血小板を抗原と接触させることによって作成し得る。成人ヒトは、毎日 $2 \times 10^{11}$ 個の赤血球、及び約半分の数の白血球及び血小板を産生する。ヒトでは略全ての血液細胞産生が赤色髄で起こり、赤色髄は、各系統に関係した造血幹細胞、中間レベルの前駆体及び成熟細胞を含む階層的な発生系に相当する。

#### 【0139】

主要な血液細胞型はいずれも、それらの初期発生段階を通じて同様の形態であるが、血小板産生に関係する細胞である巨核球は、他の多くの骨髄及び血液細胞の直径の10倍のサイズに成長し、且つ通常の染色体補体の最大128倍を含有する、芽細胞の分化レベルを超えた明らかな構造的及び機能的逸脱によって特徴付けられ、これらの細胞は血小板を生じる。一連の通常の細胞分裂を経た後、発生中の巨核球前駆体は、短時間(約1時間)のG1期と、典型的な(7時間)S期と、極めて短時間(約45分)のG2期と、続く核内有糸分裂期(中断するM期)とによって特徴付けられるユニークな細胞周期に入る。細胞に高倍数性の核が発達すると、細胞にはまた、細胞質の断片化に必要な分画膜も発達する。このイベントには、糖タンパク質GPIIb/IIIa(血小板フィブリノゲン受容体; Papayannopoulou et al., Exp Hematol, 24:660-9, 1996)及びGPIb(フォン・ヴィリブランド(Willibrand)因子受容体; Kaushansky et al., Nature, 369:568-571, 1994)、顆粒であって、ADP、セロトニン、 $\alpha$ -トロンボグロブリンを含有する顆粒、及び成熟血小板機能に不可欠な他の物質の発現が付随する。最後に、高倍数性の巨核球が細胞質の分割を起こし、数千個の血小板が放出される(Choi et al., Blood, 85:402-413, 1995; Cramer et al., Blood, 89:2336-2346, 1997)。

#### 【0140】

全ての血液細胞前駆体と同様に、巨核球は、広範な自己複製能又は血液のあらゆる成分への分化能を保持している多能性骨髄幹細胞から生じる。血小板産生は、一部には、トロンボポエチン(TPO)とその細胞受容体TPOR/MPUC-MPLとが相互作用して誘導されるシグナル伝達機構によって調節される。

#### 【0141】

トロンボポエチン (TPO) は、巨核球形成及び血小板産生の刺激に關与する造血成長因子である。TPOは肝臓及び腎臓で発現し、血小板要求量に応じて骨髓微小環境でその発現が下方調節され得る (Kato et al., Stem Cells, 16:322-328, 1998; McCarty et al., Blood, 86:3668-3675, 1995)。TPO発現は主として構成的であるため、TPOレベルは血小板による隔絶によって調節されると考えられる (Fielder et al., Blood 87:2154, 1996)。

【0142】

TPOをコードする遺伝子はクローニングされ、特徴付けられている (Kuter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11104-11108, 1994; Bartley et al., Cell, 77:1117-1124, 1994; Kaushansky et al., Nature, 369:568-571, 1994; Wendling et al., Nature, 369:571-574, 1994、及び de Sauvage et al., Nature, 369:533-538, 1994)。ヒトTPO (hTPO) cDNAは353アミノ酸長のポリペプチドをコードする。シグナルペプチドの切断後に哺乳類細胞から分泌される完成長hTPOは、332アミノ酸からなる。このタンパク質の予測分子質量は38kDaであるが、組換え細胞からの血清中又は培養液中の材料の計測から報告されている分子質量は18kD~85kDで異なる (グリコシル化、及び翻訳後タンパク質分解プロセッシング)

。

【0143】

TPO (TPOR / MPL / c-MPL) に対する細胞表面受容体は、汎骨髓性障害を引き起こすことが示されている骨髓増殖性白血病ウイルス (MPLV) のエンベロープタンパク質 v-mpl の相同体である癌原遺伝子 c-mpl の産物である (Wendling, Virol., 149:242-246, 1986)。ヒトc-mpl遺伝子は、71kDの予測分子量を有する635アミノ酸のタンパク質をコードする (Vigon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5640-44, 1992; Mignotte et al., Genomics, 20:5-12, 1994)。

【0144】

TPO又はその受容体 (TPOR / MPL / c-MPL) のいずれかの発現をヌルにされたマウスは、重度の血小板減少性の表現型を示す (Gurney et al., Science, 265:1445, 1994; Kaushansky et al., J. Clin. Invest., 96:1683, 1995; de Sauvage et al., J. Exp. Med., 183:651, 1996)。

【0145】

複数のサイトカイン (例えば、幹細胞因子 [SCF]、IL-1、IL-3、IL-6、IL-11、白血病抑制因子 [LIF]、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、エリスロポエチン (EPO)、kitリガンド、及び -インターフェロン) が、血小板新生活性を有することが示されている。

【0146】

血小板活性化

得られる血小板は小さい円盤形の細胞断片であり、これは血管損傷部位に遭遇すると急速な形質転換を起こす。血小板はより球状になり、偽足を突き出し、そのフィブリノゲン受容体が活性化されて凝集が起こると共に、血小板はその顆粒含有物を放出し、最終的には一次止血に關与する血栓を形成する (Siesse, W., Physiol. Rev. 69:58-178, 1989)。血小板の活性化はまた、不安定狭心症、心筋梗塞及び脳卒中の病因に關与するともされている (Packham, M. A., Can J. Physiol. Pharmacol. 72:278-284)。

【0147】

10

20

30

40

50



血小板の活性化には、内皮下表面に露出しているコラーゲン、凝固カスケードによって生成されるトロンピン、並びに活性化した血小板から放出されるトロンボキサンA<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)及びADPなどの幾つかの生理的物質が関わる。コラーゲンは、インテグリン $\alpha$ <sub>2</sub> $\beta$ <sub>1</sub>を含む幾つかの血小板膜タンパク質に結合して、TXA<sub>2</sub>及びADPの放出による血小板の活性化をもたらす(Shattil, S. J., et al., Curr. Opin. Cell Biol. 6: 695-704, 1994)。対照的に、トロンピン、TXA<sub>2</sub>、及びADPはGタンパク質共役受容体を直接活性化し、血小板凝集及び顆粒放出を誘導する(Hourani, S. M., and Cusack, N. J., Pharm. Rev. 43: 243-298, 1991)。血小板活性化に関わる主要なイベントは、ホスホリパーゼC (PLC)の $\gamma$ -アイソフォームが活性化する結果であると

10

## 【0148】

血小板粘着及び凝集を媒介する血小板受容体は、2つの主要な血小板表面糖タンパク質複合体上に位置する。これらの複合体は、糖タンパク質Ib-IX複合体(これはフォン・ヴィレブランド因子(vWF)との結合によって血小板粘着を促進する)、及び糖タンパク質IIb-IIIa複合体(これはフィブリノゲンに結合することによって血小板を連結して凝集体となる)である。先天性出血性障害であるベルナル・スーリエ症候群の患者は、vWFを結合する糖タンパク質Ib-IX複合体の欠損に起因する不十分な血小板粘着、軽度血小板減少症、及び大型リンパ様血小板を示す。

20

## 【0149】

糖タンパク質V (GPV)は、主要な(約12,000分子/血小板)、高度にグリコシル化された血小板膜タンパク質(分子量82,000)である。血小板がトロンピンに曝露されると、GPVf1と呼ばれる69kDaの可溶性断片が遊離する。GPVはGP Ib-IX複合体(GPIb(145kDaのタンパク質GPIbが24kDaのタンパク質GPIbとジスルフィド結合したものからなる)とGPIX(22kDaのタンパク質)との非共有結合性の会合によって形成される複合体)と非共有結合的に相互作用することができる。GPIb-IX複合体上のフォン・ヴィレブランド因子の結合部位及びトロンピンの結合部位の位置がGPIb上に特定されている。ここでトロンピンは、Gタンパク質共役受容体であるトロンピン受容体(Vuet al., Cell 64: 1057-1068(1990))を切断することによって血小板を活性化することが分かっているため、トロンピンがGPVを切断するのはトロンピンがGPIbに結合する結果として偶発的であるのかどうか、又はこの切断に生理学的役割があるのかどうかは不明である。GPIb、GPIb、及びGPIXは1つ以上の相同な24アミノ酸ロイシンリッチドメインを含む。これらのドメインはまた、大型のロイシンリッチ糖タンパク質(LRG)ファミリーにも見られる。

30

## 【0150】

GPVは、巨核球細胞系統のマーカーである。GPVに特異的なモノクローナル抗体(SW16)は、赤血球、白血球、内皮細胞、又は血小板巨核球マーカーを発現することが知られるHEL又はMEG-01などの細胞株には結合しない。

40

## 【0151】

成熟GPVは、単一の膜貫通ドメインと、短い細胞質ドメイン(16残基)と、8個の潜在的なN-グリコシル化部位を有する大きい細胞外ドメインとを含有する543アミノ酸を含む。細胞外ドメインの分析から、GPIbと相同性を有する24アミノ酸の15個のタンデムなLeuリッチリピートの存在が明らかにされ、フィブリノゲンのA鎖と相同性を有するC末端近傍のトロンピンの切断部位が同定された。

## 【0152】

## 培養条件

本明細書に記載される外因性抗原発現EHCを作成するための供給源には、EHCなどの循環細胞が含まれる。好適な細胞供給源は、本明細書に記載するとおり対象から単離す

50

るか、患者由来の造血前駆細胞又は赤血球系前駆細胞からか、不死化EHC株から誘導するか、又は人工多能性幹細胞から誘導し、任意選択で培養して分化させ得る。細胞培養技法を用いて赤血球を生成する方法は当該技術分野において周知である(例えば、Giarratana et al., Blood 2011, 118:5071、Huang et al., Mol Ther 2013, epub ahead of print September 3、又はKurita et al., PLOS One 2013, 8:e59890)。プロトコルは、成長因子、出発細胞株、培養期間、及び得られる細胞を特徴付ける形態学的形質に応じて異なる。ドナー輸血の代用となり得る血液製造用の培養システムもまた確立されている(Fibach et al. 1989 Blood 73:100)。最近では、CD34+細胞が網赤血球段階に分化されており、続くヒト対象への輸血が成功した(Giarratana et al., Blood 2011, 118:5071)。

10

## 【0153】

本明細書には、EHCの培養方法及びEHCから誘導される外因性抗原発現EHCが提供される。EHCは、造血前駆細胞、例えば、CD34+造血前駆細胞(Giarratana et al., Blood 2011, 118:5071)、人工多能性幹細胞(Kurita et al., PLOS One 2013, 8:e59890)、及び胚性幹細胞(Hirose et al. 2013 Stem Cell Reports 1:499)から培養することができる。前駆細胞の拡大及び分化に好適な成長及び分化因子のカクテルは、当該技術分野において公知である。好適な拡大及び分化因子の例としては、限定はされないが、幹細胞因子(SCF)、インターロイキン(IL)、例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、CSF、G-CSF、トロンボポエチン(TPO)、GM-CSF、エリスロポエチン(EPO)、Flt3、Flt2、PIXY 321、及び白血病抑制因子(LIF)が挙げられる。

20

## 【0154】

EHCは、CD34+細胞などの造血前駆細胞から、多段階培養プロセスで前駆細胞を定義付けられた因子と接触させることにより培養し得る。例えば、EHCは、造血前駆細胞から三段階プロセスで培養することができる。

## 【0155】

第1のステップは、1~1000 ng/mLの幹細胞因子(SCF)、1~100 U/mLのエリスロポエチン(EPO)、及び0.1~100 ng/mLのインターロイキン-3(IL-3)を培養下の細胞に接触させることを含み得る。この第1のステップは、任意選択で、核ホルモン受容体、例えば、グルココルチコイド受容体、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、アンドロゲン受容体、又はプレグナンX受容体と結合してそれを活性化するリガンドを培養下の細胞に接触させることを含む。これらの受容体に対するリガンドとしては、例えば、コルチコステロイド、例えば、10 nM~100 µMのデキサメタゾン又は10 nM~100 µMのヒドロコルチゾン；エストロゲン、例えば、10 nM~100 µMの17β-エストラジオール；プロゲステロゲン、例えば、10 nM~100 µMのプロゲステロン、10 nM~100 µMのヒドロキシプロゲステロン、10 nM~100 µMの5α-ジヒドロプロゲステロン、10 nM~100 µMの11-デオキシコルチコステロン、又は合成プロゲステン、例えば、10 nM~100 µMの酢酸クロルマジノン；アンドロゲン、例えば、10 nM~100 µMのテストステロン、10 nM~100 µMのジヒドロテストステロン又は10 nM~100 µMのアンドロステンジオン；又はプレグナンX受容体リガンド、例えば、10 nM~100 µMのリファンピシン、10 nM~100 µMのハイパフォリン、10 nM~100 µMのセイヨウオトギリソウ(St. John's Wort)(ヒペリシン)、又はビタミンE様分子、例えば、10 nM~100 µMのトコフェロールが挙げられる。第1のステップはまた、任意選択で、インスリン様分子、例えば、1~50 µg/mLのインスリン、1~50 µg/mLのインスリン様成長因子1(IGF-1)、1~50 µg/mLのインスリン様成長因子

30

40

50

2 ( I G F - 2 )、又は1 ~ 5 0  $\mu$  g / m L のメカノ成長因子を培養下の細胞に接触させることも含み得る。さらに第1のステップは、任意選択で、0 . 1 ~ 5 m g / m L のトランスフェリンを培養下の細胞に接触させることを含み得る。

【 0 1 5 6 】

第1のステップは、任意選択で、1つ以上のインターロイキン ( I L ) 又は成長因子、例えば、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 11、I L - 12、顆粒球コロニー刺激因子 ( G - C S F )、マクロファージコロニー刺激因子 ( M - C S F )、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F )、トロンボポエチン、線維芽細胞成長因子 ( F G F )、血小板由来成長因子 ( P D G F )、形質転換成長因子 ( T G F - B )、腫瘍壊死因子 ( T N F - A )、巨核球増殖分化因子 ( M G D F )、白血病抑制因子 ( L I F )、及び F l t 3 リガンドを培養下の細胞に接触させることを含み得る。各インターロイキン又は成長因子は、典型的には0 . 1 ~ 1 0 0 n g / m L の濃度で供給し得る。第1のステップはまた、任意選択で、血清タンパク質又は非タンパク質分子、例えば、ウシ胎仔血清 ( 1 ~ 2 0 % )、ヒト血漿 ( 1 ~ 2 0 % )、プラスマネート ( 1 ~ 2 0 % )、ヒト血清 ( 1 ~ 2 0 % )、アルブミン ( 0 . 1 ~ 1 0 0 m g / m L )、又はヘパリン ( 0 . 1 ~ 1 0 U / m L ) を培養下の細胞に接触させることも含み得る。

10

【 0 1 5 7 】

第2のステップは、1 ~ 1 0 0 0 n g / m L の幹細胞因子 ( S C F ) 及び1 ~ 1 0 0 U / m L のエリスロポエチン ( E P O ) を培養下の細胞に接触させることを含み得る。この第2のステップはまた、任意選択で、インスリン様分子、1 ~ 5 0  $\mu$  g / m L のインスリン、1 ~ 5 0  $\mu$  g / m L のインスリン様成長因子1 ( I G F - 1 )、1 ~ 5 0  $\mu$  g / m L のインスリン様成長因子2 ( I G F - 2 )、又は1 ~ 5 0  $\mu$  g / m L のメカノ成長因子を培養下の細胞に接触させることも含み得る。第2のステップは、任意選択で、0 . 1 ~ 5 m g / m L のトランスフェリンを培養下の細胞に接触させることをさらに含み得る。第2のステップはまた、任意選択で、血清タンパク質又は非タンパク質分子、例えば、ウシ胎仔血清 ( 1 ~ 2 0 % )、ヒト血漿 ( 1 ~ 2 0 % )、プラスマネート ( 1 ~ 2 0 % )、ヒト血清 ( 1 ~ 2 0 % )、アルブミン ( 0 . 1 ~ 1 0 0 m g / m L )、又はヘパリン ( 0 . 1 ~ 1 0 U / m L ) を培養下の細胞に接触させることも含み得る。

20

【 0 1 5 8 】

第3のステップは、1 ~ 1 0 0 U / m L のエリスロポエチン ( E P O ) を培養下の細胞に接触させることを含み得る。この第3のステップは、任意選択で、1 ~ 1 0 0 0 n g / m L の幹細胞因子 ( S C F ) を培養下の細胞に接触させることを含み得る。第3のステップは、任意選択で、インスリン様分子、例えば、1 ~ 5 0  $\mu$  g / m L のインスリン、1 ~ 5 0  $\mu$  g / m L のインスリン様成長因子1 ( I G F - 1 )、1 ~ 5 0  $\mu$  g / m L のインスリン様成長因子2 ( I G F - 2 )、又は1 ~ 5 0  $\mu$  g / m L のメカノ成長因子を培養下の細胞に接触させることをさらに含み得る。第3のステップはまた、任意選択で、0 . 1 ~ 5 m g / m L のトランスフェリンを培養下の細胞に接触させることも含み得る。第3のステップはまた、任意選択で、血清タンパク質又は非タンパク質分子、例えば、ウシ胎仔血清 ( 1 ~ 2 0 % )、ヒト血漿 ( 1 ~ 2 0 % )、プラスマネート ( 1 ~ 2 0 % )、ヒト血清 ( 1 ~ 2 0 % )、アルブミン ( 0 . 1 ~ 1 0 0 m g / m L )、又はヘパリン ( 0 . 1 ~ 1 0 U / m L ) を培養下の細胞に接触させることも含み得る。

30

40

【 0 1 5 9 】

この培養プロセスは、任意選択で、当該技術分野において公知の方法によって、1つ以上の遺伝子を活性化又はノックダウンする分子、例えば、D N A 分子、R N A 分子、m R N A、s i R N A、マイクロR N A、l n c R N A、s h R N A、ホルモン、又は小分子を細胞に接触させることを含み得る。標的遺伝子としては、例えば、転写因子、成長因子、又は成長因子受容体をコードする遺伝子を挙げることができ、限定はされないが、例えば、G A T A 1、G A T A 2、C M y c、h T E R T、p 5 3、E P O、S C F、インスリン、E P O - R、S C F - R、トランスフェリン - R、インスリン - R が挙げられる。

50

## 【0160】

一実施形態において、CD34+細胞は、種々の量のIMDM、FBS、グルタミン、BSA、ホロトランスフェリン、インスリン、デキサメタゾン、 $\alpha$ -エストラジオール、IL-3、SCF、及びエリスロポエチンを含む培養液中に、3つの別個の分化段階で合計22日間置かれる。

## 【0161】

一実施形態において、CD34+細胞は、種々の量のIMDM、FBS、グルタミン、BSA、ホロトランスフェリン、インスリン、デキサメタゾン、 $\alpha$ -エストラジオール、IL-3、SCF、及びトロンボポエチンを含む培養液中に、3つの別個の分化段階で合計14日間置かれる。

10

## 【0162】

一実施形態において、CD34+細胞は、種々の量のIMDM、FBS、グルタミン、BSA、ホロトランスフェリン、インスリン、デキサメタゾン、 $\alpha$ -エストラジオール、IL-3、SCF、及びGCSFを含む培養液中に、3つの別個の分化段階で合計15日間置かれる。

## 【0163】

特定の実施形態において、目的の外因性抗原を含む細胞は、限定はされないが、表Aに列挙されるものを含めた複数の循環細胞を含むか又はそれから誘導され得る。好ましい実施形態では、本発明の循環細胞はEHC、例えば有核赤血球、赤血球前駆体又は除核赤血球などである。例えば、EHCは、臍帯血幹細胞、CD34+細胞、造血幹細胞(HSC)、脾臓コロニー形成(CFU-S)細胞、骨髓球系共通前駆(CMP)細胞、未分化胚芽細胞コロニー形成細胞、赤芽球バースト形成細胞(BFU-E)、巨核球-赤芽球系前駆(MEP)細胞、赤芽球コロニー形成細胞(CFU-E)、網赤血球、赤血球、人工多能性幹細胞(iPSC)、間葉系幹細胞(MSC)、多染性正赤芽球、正染性正赤芽球、又は表A1に列挙されるもの、又はそれらの組み合わせである。一部の実施形態において、EHCは不死細胞又は不死化細胞、例えば、CD34+造血前駆細胞のレトロウイルス形質導入によりOct4、Sox2、Klf4、cMycが発現し、及びTP53が抑制されるように作成した不死化赤芽球細胞である(例えば、Huang et al., Mol Ther 2013, epub ahead of print September 3)。

20

30

## 【0164】

本明細書には赤血球組成物が提供され、ここでは複数の赤血球が目的の外因性抗原又はその断片を発現する。細胞は、患者由来の造血又は赤血球系前駆細胞から培養されるか、不死化EHC株から誘導されるか、又は人工多能性幹細胞から誘導され得る。細胞培養で赤血球を作成する方法は、当該技術分野において、例えば、Giarratana et al., Blood 2011, 118:5071、Huang et al., Mol Ther 2013、又はKurita et al., PLOS One 2013, 8:e59890に公知である。外因性抗原は、単一又は複数の遺伝子コピーのトランスフェクション、ウイルスによる形質導入、又はDNA若しくはRNAの存在下における電気穿孔によって導入することができる。哺乳類細胞において外因性タンパク質を発現させる方法は、当該技術分野において周知である。例えば、造血細胞における外因性第IX因子の発現が、CD34+前駆細胞のウイルス形質導入によって誘導される(Chang et al., Nat Biotechnol 2006, 24:1017を参照)。

40

## 【0165】

本明細書に記載される赤血球組成物は以下の方法で作成し得る。初めに、赤血球系前駆細胞を単離する。これらの細胞は、或いは患者の自己細胞であっても、又は実質的に万能なドナー血液由来であってもよい。例えば、細胞は、ABO式O型、リーサス因子Rh r/r、ダuffy-/、及び大型ケル抗原K1陰性であってもよい。赤血球系前駆細胞からEHCへの分化の過程で、外因性抗原をコードする核酸が導入される。この外因性抗

50

原をコードする核酸は、GATA-1プロモーターなどの赤血球系特異的プロモーターの制御下にあり得る（例えば、Repik et al., Clin Exp Immunol 2005, 140:230を参照）。外因性抗原をコードする核酸は、当該技術分野において公知の任意の方法で、例えば、プラスミドDNA、ウイルス、又はmRNAとして導入することができる。核酸導入は、種々の標準方法、例えば、トランスフェクション、形質導入、又は電気穿孔によって達成することができる。

#### 【0166】

前駆細胞の修飾。目的の抗原を作製するためのDNA発現ベクター又はmRNAなどの核酸が前駆細胞に導入されてもよく、これは元の供給源から単離するか、又は上記の拡大したもから本明細書に提供されるとおりのルーチンの組換え技術によって得ることができる。場合によっては、発現ベクターは、当該技術分野において公知の方法による相同組換え又は非相同組換えによって細胞のゲノムに組み込まれ得るように設計し得る。

10

#### 【0167】

場合によっては、ゲノムを選択的に標的化して切断することのできるポリペプチド、例えばCRISPR/Cas9、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、又はジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする核酸を使用して、発現ベクターの核酸ペイロードの挿入が特定のゲノム位置、例えばCR1遺伝子座（1q32.2）、ヘモグロビン遺伝子座（11p15.4）、又は限定はされないが、表Cに列挙されるものを含めた別の赤血球関連タンパク質に向けられる。

#### 【0168】

場合によっては、核酸は、標的遺伝子の発現をサイレンシング又は抑制するRNA分子、又はRNA分子をコードするDNA分子である。例えば、この分子は、低分子干渉RNA（siRNA）、アンチセンスRNA分子、又は低分子ヘアピンRNA（shRNA）分子であり得る。

20

#### 【0169】

前駆細胞に発現ベクターを移入させる方法としては、限定はされないが、ウイルス媒介性遺伝子移入、リポソーム媒介性移入、形質転換、遺伝子銃、トランスフェクション及び形質導入、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及びヘルペスウイルスなどのDNAウイルスをベースとするベクター、並びにレトロウイルスベースのベクターの使用など、ウイルス媒介性遺伝子移入が挙げられる。遺伝子移入方法の例には、例えば、ネイキッドDNA、CaPO<sub>4</sub>沈殿、DEAEデキストラン、電気穿孔、プロトプラスト融合、リポフェクション、及び細胞マイクロインジェクションが含まれる。

30

#### 【0170】

本明細書に記載される遺伝子修飾前駆細胞のいずれも、成熟除核赤血球への分化を可能にする好適な条件下、例えば本明細書に記載されるインピトロ培養プロセスで培養することができる。得られる除核赤血球は成熟赤血球に関連するタンパク質、例えば、ヘモグロビン、グリコホリンAを提示して発現し、これは標準方法（例えば、ウエスタンブロッティング又はFACS分析）によってバリデートし及び定量化することができる。

#### 【0171】

##### 外因性抗原発現戦略

本明細書には、外因性抗原発現EHCによって呈示される抗原が提供される。一部の実施形態において、抗原は標的との相互作用能を有し、例えば標的と会合又は結合する。抗原はポリペプチドを含むことができ、又はそれから本質的になり得る。一部の実施形態において、抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、小分子、又はそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態において、抗原は標的と相互作用せず、外因性抗原発現EHCによって細胞、組織又は対象の体内の他の部位に送達されるペイロードとしての役割を果たす。

40

#### 【0172】

##### 抗原ポリペプチド、キメラ及び融合物

一部の実施形態において、抗原はポリペプチドを含む。レシバー（receiver）が

50

リペプチドはサイズが6アミノ酸～3000アミノ酸の範囲であってもよく、6、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400アミノ酸超であり得るか、又は500アミノ酸超であり得る。レシバー（receiver）ポリペプチドはサイズが約20アミノ酸～約500アミノ酸、約30アミノ酸～約500アミノ酸、又は約40アミノ酸～約500アミノ酸の範囲であってもよい。

#### 【0173】

一部の実施形態において、抗原ポリペプチドは、2つ以上の個別的なタンパク質ドメインを含み得るキメラ又は融合タンパク質を含む。これらのキメラ抗原は、種々のドメインが異なる供給源に由来し、従って天然で一緒に見られることはないという意味で異種又は外因性であり、例えば組換え核酸によってコードされ得る。抗原ポリペプチドは幾つかの方法によって作製することができ、その多くは当該技術分野で周知であり、また本明細書にも記載される。例えば、抗原ポリペプチドは、抽出によるか（例えば、単離細胞から）、抗原ポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によるか、又は化学合成によって得ることができる。抗原ポリペプチドは、例えば、組換え技術によって、及びポリペプチドをコードする発現ベクターを、コードされる抗原ポリペプチドの発現用宿主細胞に（例えば形質転換又はトランスフェクションによって）導入することにより作製し得る。

#### 【0174】

活性を変えることなく一般にアミノ酸配列に加え得る種々の保存的な変化がある。これらの変化は保存的置換又は突然変異と称される；即ち、特定のサイズ、電荷又は他の特性を有するアミノ酸分類に属するアミノ酸によって別のアミノ酸を置換することができる。アミノ酸配列の置換は、アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。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、及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、アスパラギン及びグルタミンが含まれる。正電荷（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン及びヒスチジンが含まれる。負電荷（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。かかる改変は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又は等電点によって決定するときの見かけの分子量に実質的に影響を及ぼさないものと思われる。保存的置換はまた、配列の光学異性体による他の光学異性体の置換、具体的には配列の1つ以上の残基に関するDアミノ酸によるLアミノ酸の置換も含む。さらに、配列中の全てのアミノ酸が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としては、限定はされないが、正電荷を維持するArgに対するLys及びその逆；負電荷を維持するAspに対するGlu及びその逆；遊離-OHを維持するためのThrに対するSer；及び遊離NH<sub>2</sub>を維持するAsnに対するGlnが挙げられる。さらに、ポリペプチド配列又は対応する核酸配列の点突然変異、欠失、及び挿入が、ある場合には、そのポリペプチド又は核酸断片の機能喪失なく作製されてもよい。置換は、例えば、1個、2個、3個、又はそれを超える残基を含み得る。具体的なアミノ酸配列又はポリペプチドをコードする組換え核酸の任意の教示又はそれらの名称の名称の教示には、ポリペプチド又は核酸断片の機能喪失なく作製することのできる、それらのポリペプチド配列又は対応する核酸配列並びにそのタンパク質又は遺伝子についてデータベースに寄託された任意の配列の任意の保存的置換、点突然変異、欠失、及び挿入が含まれる。

#### 【0175】

一部の実施形態において、抗原ポリペプチドは外因性抗原発現EHCの膜と会合している。他の実施形態において、抗原ポリペプチドは外因性抗原発現EHCの膜と会合していない。

#### 【0176】

一実施形態において、外因性抗原発現EHC中の脂質と抗原との質量比は1：1000未満、約1：1000、約1：500、約1：250、約1：100、約1：50、約1：25、約1：10、約1：9、約1：8、約1：7、約1：6、約1：5、約1：4、

10

20

30

40

50

約 1 : 3、約 1 : 2、約 1 : 1、約 2 : 1、約 3 : 1、約 4 : 1、約 5 : 1、約 6 : 1、約 7 : 1、約 8 : 1、約 9 : 1、約 10 : 1、約 25 : 1、約 50 : 1、約 100 : 1、約 250 : 1、約 500 : 1、約 1000 : 1、約 10,000 : 1、約 100,000 : 1、約 1,000,000 : 1、約 10,000,000 : 1、約 100,000,000 : 1、約 1,000,000,000 : 1、又は約 1,000,000,000 : 1 超である。

【 0 1 7 7 】

一実施形態において、外因性抗原発現 E H C 中の非外因性抗原ポリペプチドと抗原との質量比は 1 : 1000 未満、約 1 : 1000、約 1 : 500、約 1 : 250、約 1 : 100、約 1 : 50、約 1 : 25、約 1 : 10、約 1 : 9、約 1 : 8、約 1 : 7、約 1 : 6、約 1 : 5、約 1 : 4、約 1 : 3、約 1 : 2、約 1 : 1、約 2 : 1、約 3 : 1、約 4 : 1、約 5 : 1、約 6 : 1、約 7 : 1、約 8 : 1、約 9 : 1、約 10 : 1、約 25 : 1、約 50 : 1、約 100 : 1、約 250 : 1、約 500 : 1、約 1000 : 1、約 10,000 : 1、約 100,000 : 1、約 1,000,000 : 1、約 10,000,000 : 1、約 100,000,000 : 1、又は約 1,000,000,000 : 1 超である。

10

【 0 1 7 8 】

特定の実施形態において、ポリペプチド抗原は外因性抗原発現 E H C の表面上に位置し、その周りの環境に露出している。一部の実施形態において、ポリペプチド抗原は外因性抗原発現 E H C の内部に位置し、その非露出側に向いている。

20

【 0 1 7 9 】

特定の実施形態において、ポリペプチド抗原は以下のドメイン、即ち、S ドメイン（表面）、A ドメイン（アンカー）、及び/又は U ドメイン（非露出）のうち少なくとも 1 つを含み、ここで S ドメインは外因性抗原発現 E H C の周りの環境に露出した表面ドメインであり、A ドメインはアンカーであり、U ドメインは外因性抗原発現 E H C の内部に位置し及び/又はその非露出側に向いている。

【 0 1 8 0 】

任意選択で抗原ポリペプチドは、i) S' ドメインと称される 1 つ以上の追加的な S ドメイン、又は ii) U' ドメインと称される 1 つ以上の追加的な U ドメインを含む。

【 0 1 8 1 】

一部の実施形態において、S ドメインと A ドメインとは、同じポリペプチド鎖の一部を形成する。

30

【 0 1 8 2 】

一部の実施形態において、A ドメインと U ドメインとは、同じポリペプチド鎖の一部を形成する。

【 0 1 8 3 】

一部の実施形態において、S、A、U ドメインの任意の 1 つ以上は外因性抗原発現 E H C に外部的に加えられる。

【 0 1 8 4 】

一部の実施形態において、S、A、U ドメインの任意の 1 つ以上は外因性抗原発現 E H C 内で作製される。

40

【 0 1 8 5 】

一部の実施形態において、S、A、U ドメインの任意の 1 つ以上はポリペプチドである。

【 0 1 8 6 】

一部の実施形態において、S、A、U ドメインの任意の 1 つ以上はポリペプチドでない。

【 0 1 8 7 】

外因性抗原発現 E H C 内又はその上にある抗原の例示的構造の概略図を図 1 3 A、図 1 3 B、及び図 1 3 C に示す。

50

## 【0188】

## Aドメイン

特定の実施形態において、Aドメインは膜ポリペプチドである。Aドメインは、例えば、内在性膜ポリペプチド又は膜結合ポリペプチドであり得る。

## 【0189】

Aドメインは、以下のクラス、限定はされないが、例えば、ヘリックスバイトピック、ヘリックスポリトピック、バレル膜貫通、全モノトピック/末梢、全モノトピック/末梢、モノトピック/末梢、モノトピック/末梢、+モノトピック/末梢、ヘリックスペプチド、ヘアピンペプチド、ヘリックスペプチド、1型膜貫通タンパク質(N末端細胞外)、2型膜貫通タンパク質(N末端細胞内)、3型膜貫通タンパク質、4A型膜貫通タンパク質、4B型膜貫通タンパク質、脂質アンカー型タンパク質、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型タンパク質、プレニル鎖アンカー型タンパク質、又は非定型構造のペプチドの1つから選択され得る。

10

## 【0190】

特定の実施形態において、Aドメインは内因性であり、例えば、EHC、血小板、又は造血細胞にとって内因性である。一部の実施形態において、Aドメインは哺乳類細胞にとって内因性である。

## 【0191】

特定の実施形態において、Aドメインは外因性であり、例えば、EHC、血小板、又は造血細胞にとって外因性である。一部の実施形態において、Aドメインは哺乳類細胞にとって外因性である。

20

## 【0192】

Aドメインは、以下の分子又はその断片、例えば限定はされないが、CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD12w、CD13、CD14、CD15、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD68、CD69、CD71、CD72、CD73、CD74、CD80、CD81、CD82、CD83、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD95、CD96、CD100、CD103、CD105、CD106、CD107、CD107a、CD107b、CD109、CD117、CD120、CD122、CD123、CD127、CD132、CD133、CD134、CD135、CD138、CD141、CD142、CD143、CD144、CD147、CD151、CD152、CD154、CD155、CD156、CD158、CD163、CD165、CD166、CD168、CD184、CDw186、CD195、CD197、CDw199、CD209、CD202a、CD220、CD221、CD235a、CD271、CD279、CD303、CD304、CD309、CD326、Ras関連タンパク質1A、セマポリン7A(semaporin 7A)前駆体、カルシウム及びインテグリン結合タンパク質1、55kDa赤血球膜タンパク質、フロチリン-1、フロチリン-2、赤血球系膜結合タンパク質、真核生物翻訳開始因子2C2、シトクロムb5レダクターゼ、細胞分裂制御タンパク質42ホモログ、KIAA1363タンパク質、バンド3、アネキシンVII、アクアポリン、エクトADP-リボシルトランスフェラーゼ4、ケル、LFA-3、溶質キャリアファミリー2メンバー1、LGALS3タンパク質、尿素輸送体、Rh血液型CE抗原ポリペプチド(polyptide)、Rh関連糖タンパク質、デマチン、ABO血液型、アクアポリン3、オベルジェ、バンド3、ベイシジン、C41、CD44、シスAB、コルトン抗原、補体成

30

40

50



分4、CR1、DAF、ディエゴ、ダッフィ、Hhノボンベイ抗原、ii抗原、インディアン血液型、ケル、キッド、ルイス抗原、ルセラン抗原、MNS抗原系、コスト(Cost)型、Er型、デマチン、ストマチン、トロポミオシン、グルコース輸送体、アデュシン、ラプフィリン、C1テトラヒドロ葉酸シターゼ、ヴェル(Vel)型、Lan抗原、At抗原、Jr抗原、AnWj抗原、Sd抗原、バッティ(Batty)、ビルケス(Bilkes)、ボックス(Box)、クリスチャンセン(Christiansen)、HJK、HOFM、JFV、JONES、イエンゼン(Jensen)、カタギリ(Katagiri)、リブセイ(Livesay)、ミルン(Milne)、オルデイド(Oldeide)、ピータース(Peters)、ラスムッセン(Rasmussen)、リード(Reid)、REIT、SARA、リーサス血液型D、アルドラーゼ、トロポモジュリン、アルギナーゼ、クレアチンキナーゼ、B-Camタンパク質、Rap1A、ベネット-グッドスピード(Bennett-Goodspeed)、P抗原系、Rh血液型Xg抗原系、XKタンパク質、Ytノカートライト(Cartwright)抗原系、CD58、Rh、シアンナ(Scianna)、ラディン(Radin)、DARC(ダッフィ)、CR1クノップス-マコイ(Knops-McCoy)、DAFクロマー(Cromer)、ゲルビヒ(Gerbich)(GYPC)、CD47、グリコホリンA、バンド3(AE3)、GYPB Ss、C4A、C4Bチド(Chido)、ロジャース(Rodgers)C4補体成分、HLA Bg HLAクラスI、RHAG Rh関連アンモニウム輸送体、糖タンパク質、コルトン(Co)ウォーターチャネルタンパク質、ACHEカートライト(Cartwright)(Yt)アセチルコリンエステラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、グリコホリンC、アクアポリン、赤芽球関連膜タンパク質、CD44、シナプトブレビン2、リボヌクレアーゼ、十二指腸シトクロムB、ABOグリコシルトランスフェラーゼ、CD59、CD44インディアン(In)、AnWj接着受容体、MER2、DOKドンブロックADP-リボシルトランスフェラーゼ、SEMA7A JMH推定接着受容体、UMOD Sdaタム-ホースフォール(Tamm-Horsfall)タンパク質(ウロモジュリン)、ディエゴ(Di)、ライト(Wr)アニオンチャネルタンパク質(バンド3、AE1)、キッド(Jk)尿素輸送体、FUT3ルイス(Le)(1,3)フコシルトランスフェラーゼ、OK Okニューロテリン、推定接着分子、LW接着受容体、FUT2分泌型(Se)(1,2)フコシルトランスフェラーゼ、FUT1 Hh(1,2)フコシルトランスフェラーゼ、LUルセラン(Lu)接着受容体、P1グリコシルトランスフェラーゼ、XK Kx推定神経伝達物質輸送体、XG Xg 旧称PBDX、MIC2、ヘモグロビン、アンキリン、スペクトリン、KEL ケル(フォームK、k、Kp、Js)メタロプロテイナーゼ、トルキルドセン抗原、補酵素Q10、Rab 35、Ral A結合タンパク質、透明帯結合タンパク質、Lyn Bタンパク質、Kiaa1741タンパク質、DC38、カルシウム輸送ATPアーゼ、GPIX、GPIba、GPIbb、GPV、GPIb-IX-V、GPVI、GPIa/IIa、GPIIb/IIIa、GPV/IIaから選択され得る。

#### 【0193】

##### Sドメイン

一部の実施形態において、Sドメインはタンパク質又はポリペプチドである。他の実施形態において、Sドメインは核酸である。一部の実施形態において、Sドメインは化学物質である。特定の実施形態において、Sドメインは小分子である。

#### 【0194】

一部の実施形態において、Sドメインは、以下のクラスの1つ以上、例えば限定はされないが、可動性リンカー、エピトープタグ、酵素、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、抗原、抗体様分子、抗体のリガンド、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、成長因子受容体、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、酵素認識配列、トランスペプチダーゼ認識配列、プロテアーゼ認識配列、切断可能ドメイン、インティン、DNA結合タンパク質、及びRNA結合タンパク質、補体調節分子、補体カスケード分子、凝固カスケード分子、キレ

10

20

30

40

50

ーター、補体調節ドメイン、SCRドメイン、CCPドメイン、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様ドメイン、アルマジロリピート、ロイシンジッパー、デルス (death) エフェクタードメイン、カドヘレイン (cadherin) リピート、EFハンド、ホスホチロシン結合ドメイン、プレクストリン相同性ドメイン、SCR相同性2ドメイン、ジンクフィンガードメイン、環状ペプチド、細胞透過性ペプチドから選択されるか、又はそれに由来するポリペプチドである。

【0195】

一部の実施形態において、Sドメインは非ポリペプチド分子、例えば核酸、炭水化物、又は小分子である。一部の実施形態において、Sドメインは、以下のクラスの1つ以上、例えば限定はされないが、DNAアプタマー、RNAアプタマー、siRNA、shRNA、一本鎖RNAプローブ、一本鎖DNAプローブ、mRNA、化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドから選択される核酸である。一部の実施形態において、Sドメインは、以下のクラスの1つ以上、例えば限定はされないが、キレーター、DOTA、放射性核種、同位体、造影剤、蛍光分子、化学発光分子、気体から選択される小分子である。

【0196】

Uドメイン

一部の実施形態において、Uドメインはタンパク質又はポリペプチドである。他の実施形態において、Uドメインは核酸である。一部の実施形態において、Uドメインは化学物質である。特定の実施形態において、Uドメインは小分子である。

【0197】

一部の実施形態において、Uドメインは、以下のクラスの1つ以上、例えば限定はされないが、可動性リンカー、エピトープタグ、酵素、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、抗原、抗体様分子、抗体のリガンド、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、成長因子受容体、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、酵素認識配列、トランスペプチダーゼ認識配列、プロテアーゼ認識配列、切断可能ドメイン、インティン、DNA結合タンパク質、及びRNA結合タンパク質、補体調節分子、補体カスケード分子、凝固カスケード分子、キレーター、補体調節ドメイン、SCRドメイン、CCPドメイン、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様ドメイン、アルマジロリピート、ロイシンジッパー、デルス (death) エフェクタードメイン、カドヘレイン (cadherin) リピート、EFハンド、ホスホチロシン結合ドメイン、プレクストリン相同性ドメイン、SCR相同性2ドメイン、ジンクフィンガードメイン、環状ペプチド、細胞透過性ペプチド、キナーゼドメイン、ホスファターゼドメイン、細胞骨格タンパク質、細胞骨格タンパク質と相互作用するタンパク質、Gタンパク質共役受容体、チロシンキナーゼ、ITIMドメイン、ITAMドメインから選択されるか、又はそれに由来するポリペプチドである。

【0198】

一部の実施形態において、Uドメインは非ポリペプチド分子、例えば核酸、炭水化物、又は小分子である。一部の実施形態において、Uドメインは、以下のクラスの1つ以上、例えば限定はされないが、DNAアプタマー、RNAアプタマー、siRNA、shRNA、一本鎖RNAプローブ、一本鎖DNAプローブ、mRNA、化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドから選択される核酸である。一部の実施形態において、Uドメインは、以下のクラスの1つ以上、例えば限定はされないが、キレーター、DOTA、放射性核種、同位体、造影剤、蛍光分子、化学発光分子、気体から選択される小分子である。

【0199】

抗原ポリペプチドの例

抗原ポリペプチドの例としては、以下が挙げられる：ポリペプチド抗原は、N末端にHAエピトープタグを有するグリコホリンAを含む；ポリペプチド抗原は、グリコホリンAのリーダー配列、HAエピトープタグ、及びグリコホリンAの本体配列を含む；ポリペプチド抗原は、補体受容体1 (CR1) を含む；ポリペプチド抗原は、CR1のリーダー配列、HAエピトープタグ、CR1の本体配列を含む；ポリペプチド抗原は、CR1のリーダー配列、HAエピトープタグ、CR1のLHR-A及びLHR-Bの6つのSCRドメ

10

20

30

40

50

イン、CR1の膜近位の2つのSCRドメイン、CR1の膜貫通領域、及びCR1の細胞内領域を含む；ポリペプチド抗原は、CR1のリーダー配列、HAエピトープタグ、CR1のLHR-A及びLHR-B及びLHR-Cの9つのSCRドメイン、CR1の膜近位の2つのSCRドメイン、CR1の膜貫通領域、及びCR1の細胞内領域を含む；ポリペプチド抗原は、CR1のリーダー配列、CR1のLHR-A、CR1のLHR-B、CR1のLHR-C、CR1の膜近位の2つのSCRドメイン、CR1の膜貫通領域、及びCR1の細胞内領域を含む；ポリペプチド抗原は、CR1のリーダー配列、CR1のLHR-A、CR1のLHR-B、CR1のLHR-C、CR1の膜近位の2つのSCRドメイン、グリコホリンAの膜貫通領域及び細胞内領域を含む；ポリペプチド抗原は、グリコホリンAのリーダー配列、B型肝炎表面抗原に対する抗体scFv(scFv)、(Gly3Ser)2可動性リンカー、HAエピトープタグ、及びグリコホリンAの本体を含む；ポリペプチド抗原は、ケル、(Gly3Ser)2可動性リンカー、HAエピトープタグ、及びscFvを含む；ポリペプチド抗原は、ケル及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、ケルの71アミノ酸N末端断片及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、ケルの71アミノ酸N末端断片、(Gly3Ser)2可動性リンカー、及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、ケルの79アミノ酸N末端断片及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、ケルの79アミノ酸N末端断片、(Gly3Ser)2可動性リンカー、及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、ケルの71アミノ酸N末端断片、(Gly3Ser)2可動性リンカー、scFv、及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、ケルの79アミノ酸N末端断片、(Gly3Ser)2可動性リンカー、scFv、及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、CD55のリーダー配列、scFv、HAエピトープタグ、及びCD55の末端37アミノ酸を含む；ポリペプチド抗原は、CD55のリーダー配列、HAエピトープタグ、及びCD55の本体を含む。一実施形態において、ポリペプチド抗原は、CD59のリーダー配列、scFv、HAエピトープタグ、及びCD59の本体を含む；ポリペプチド抗原は、CD59のリーダー配列、及びHAエピトープタグ、及びCD59の本体を含む；ポリペプチド抗原は、アデノシンデアミナーゼ及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、アデノシンデアミナーゼ、(Gly3Ser)2可動性リンカー、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、グリコホリンA、細胞質C末端のアデノシンデアミナーゼ、及びHAエピトープタグを含む；ポリペプチド抗原は、グリコホリンA、細胞質C末端のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ、及びHAエピトープタグを含む。

#### 【0200】

特定の実施形態において、抗原はマクロファージとの相互作用能を有する。抗原ポリペプチドは以下の1つ以上を含み得る：補体受容体(Rieu et al., J. Cell Biol. 127:2081-2091(1994))、スカベンジャー受容体(Brasseur et al., Photochem. Photobiol. 69:345-352(1999))、トランスフェリン受容体(Dreier et al., Bioconj. Chem. 9:482-489(1998))；Hamblin et al., J. Photochem. Photobiol. 26:4556(1994))；Fc受容体(Rojanasakul et al., Pharm. Res. 11:1731-1733(1994))；及びマンノース受容体(Frankel et al., Carbohydr. Res. 300:251-258(1997))；Chakrabarty et al., J. Protozool. 37:358-364(1990))。

#### 【0201】

マクロファージとの相互作用能を有する他の抗原には、以下が含まれる：低密度リポタンパク質(Mankertz et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 240:112-115(1997))；von Baeyer et

10

20

30

40

50

al., Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 31: 382 - 386 (1993)), 超低密度リポタンパク質 (Tabas et al., J. Cell Biol. 115: 1547 - 1560 (1991)), マンノース残基及び他の炭水化物部分 (Pittet et al., Nucl. Med. Biol. 22: 355 - 365 (1995)), ポリカチオン性分子、例えばポリ-L-リジン (Hamblin et al., J. Photochem. Photobiol. 26: 45 - 56 (1994)), リポソーム (Bakker-Woudenbergh et al., J. Drug Target. 2: 363 - 371 (1994)); etageriet al., J. Pharm. Pharmacol. 45: 48 - 53 (1993)) 及び 2 - マクログロブリン (Chuet al., J. Immunol. 152: 1538 - 1545 (1994))。

10

## 【0202】

本明細書には、i) 同じ系統の天然 EHC に存在しないか、又は ii) 抗原を含む EHC と比較したとき低下したレベル又は低下した活性レベルで同じ系統の天然 EHC に存在するかのいずれかである機能活性を有する抗原を含む EHC を含有する組成物が提供される。かかる機能活性には、補体阻害、免疫複合体クリアランス、人工抗原提示、凝固カスケードのモジュレーション、酸素移動、薬物送達、細胞毒吸着、食作用の回避、及び循環時間の延長が含まれる。

## 【0203】

一部の実施形態において、EHC は、CR-1 抗原を含むため、同じ系統の天然 EHC と比べてより高いレベルの補体受容体ポリペプチド、例えば CR1 を有する。代替的实施形態において、抗原を含む EHC は、限定はされないが、表 6 及び表 8 に列挙されるポリペプチドを含めた、同じ系統の天然 EHC と比べてより高いレベルの補体受容体アゴニストポリペプチド又は補体関連ポリペプチドを有する。補体受容体抗原ポリペプチドは、ヒト補体受容体 1 (CR1) ポリペプチド、その変異体、又は機能断片を含む。CR1 抗原ポリペプチドは CR1 の天然アレル、例えば、A アレル (F アレル又は CR1 \* 1 アレルとも称される)、B アレル (S アレル又は CR1 \* 2 アレルとも称される)、C アレル (F' アレル又は CR1 \* 3 アレルとも称される)、又は D アレル (CR1 \* 4 アレルとも称される) の 1 つ又は 2 つ以上に由来し得る。これらの天然型の配列及びデータベース受託番号は、表 3 に提供される。一部の実施形態において、CR1 抗原ポリペプチドは、CR1 ポリペプチドのドメインを含有する。例えば、CR1 ポリペプチドは、補体制御タンパク質 (CCP) モジュール又は Sushidメインとも称される 1 つ以上のショートコンセンサスリピート (SCR) ドメイン、例えば、Genbank 受託番号 AAV65577.1 を含み得る。一実施形態において、CR1 抗原ポリペプチドは、1 個以上のショートコンセンサスリピート (SCR)、例えば、1、2、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 個又は 44 個超の SCR を含む。別の実施形態において、CR1 抗原ポリペプチドは、CR1 の 1 個以上のロング相同リピート (LHR) 単位、例えば、LHR-A、LHR-B、LHR-C、又は LHR-D、例えば、1、2、3、4、5、6 個又は 6 個超の LHR ドメインを含む。別の実施形態において、CR1 抗原ポリペプチドは、別の細胞膜タンパク質、例えば、グリコホリン A、グリコホリン B、グリコホリン C、グリコホリン D、ケル、バンド 3、アクアポリン 1、glut 1、キッド抗原タンパク質、リーサス抗原、例えば、限定はされないが、表 1 及び表 6 に列挙される細胞表面部分に融合した CR1 の 1 つ又は 2 つ以上の細胞外ドメインを含み得る。

20

30

40

## 【0204】

一部の実施形態において、EHC は、補体受容体抗原ポリペプチド、又はそれに代えて又は組み合わせで、限定はされないが、表 8 に列挙されるポリペプチド、及びそれらのポリペプチドに対するアゴニストを含めた、補体受容体アゴニスト抗原ポリペプチド又は補

50

体関連抗原ポリペプチドをコードする組換え核酸を含有する。一部の実施形態において、EHCは、外因性崩壊促進因子(CD59、GenBank: CAG46523.1)ポリペプチド、又は外因性膜補因子(CD46、GenBank: BAA12224.1)ポリペプチド、又はその変異体若しくは機能断片、又はそれらの組み合わせをさらに含有する。

#### 【0205】

CR1活性には、C3b含有免疫複合体との結合及び循環から細網内皮系の肝臓及び脾臓マクロファージへのそれらの免疫複合体のシャトリングが含まれる。細網内皮系の細胞と遭遇すると、免疫複合体は食細胞によってエンドサイトーシスで取り込まれるが、赤血球は回避して循環し続ける。免疫複合体の除去により、時にCR1が赤血球の表面からタンパク質分解によって切断されることもある。結合活性を計測するには、EHCと免疫複合体との間のインビトロ結合アッセイを実施することができる。EHCの回避を計測するには、食細胞及び免疫複合体が負荷されたEHCによるインビトロ食作用アッセイを実施することができる。肝臓への循環免疫複合体のインビボクリアランスを計測するには、放射性標識免疫複合体を使用してクリアランス及び体内分布アッセイを実施することができる。

10

#### 【0206】

抗原ポリペプチドを含まない同じ系統の造血細胞より高いレベルで天然ポリペプチドを含む抗原を含有するEHCを含有する組成物が提供される。例えば、EHCの集団は、CR1抗原ポリペプチドを欠く同じ系統の対応する造血細胞より少なくとも約1.1、例えば、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000倍、又は10000倍超高い抗原、例えば補体受容体1レベルを含む。網赤血球及び赤血球のCR1レベルは、典型的には細胞当たり50~2000個の分子である(Lach-Trifilief, J Immunol 1999, 162:7549)。CR1レベルが細胞当たり少なくとも約2500、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、40000、50000、100000、200000、300000、400000、500000、600000、700000、800000、900000、1000000個、又は1000000個超の分子であるEHCの集団を含有する組成物が提供される。野生型及び外因性抗原発現EHCのCR1レベルは、例えば、CR1に特異的な抗体によるフローサイトメトリーによって計測及び定量化することができる。

20

30

#### 【0207】

本明細書には、一部の実施形態において、抗原を含むEHC、抗原を含むEHCの集団、及び抗原を含むEHCの組成物が提供される。一部の実施形態において、抗原は循環病原体、例えばウイルス又は細菌と相互作用する。一部の実施形態において、EHCは、循環病原体に特異的な抗体、s c F v、又はナノボディをコードする組換え遺伝子を発現する。抗体、s c F v、又はナノボディは融合タンパク質として発現し得る。他の実施形態において、抗体、s c F v、又はナノボディ抗原又は循環病原体に対して親和性を有する別の抗原がEHC内又はその上に負荷される。抗体、s c F v、又はナノボディ抗原又は循環病原体に対して親和性を有する他の抗原は細胞内又は細胞外に局在し得る。一部の実施形態において、抗原は、表面抗原、エンベロープ抗原又はカプシド抗原などのウイルス抗原又は細菌抗原に特異的である。

40

#### 【0208】

本明細書には、特定の実施形態において、抗原を含むEHC、抗原を含むEHCの集団、及び抗原を含むEHCの組成物が提供される。一部の実施形態において、抗原は、毒素、好ましくは病原体に由来するか又は他に環境に由来するなどの外来性毒素と相互作用す

50

る。一部の実施形態において、EHCは、リポ多糖結合タンパク質(LBP)、殺菌性/透過性増加タンパク質(BPI)、アミロイドP成分、又はカチオン性タンパク質に由来するアミノ酸配列を含む抗原をコードする組換え遺伝子を発現する。毒素結合抗原は融合タンパク質として発現し得る。他の実施形態において、毒素結合抗原はEHC内又はその上に負荷され得る。毒素結合抗原は細胞内又は細胞外に局在し得る。一部の実施形態において、毒素結合抗原はボツリヌス又は炭疽などの細菌性毒素に特異的である。

#### 【0209】

さらに、外因性抗原発現EHCは、標的を隔絶するその能力を増進する能力を有する抗原を発現し得る。潜在的な隔絶増進抗原には、限定はされないが表1にあるものを含めた、ポリペプチド輸送体が含まれる。

10

#### 【0210】

一実施形態において、抗原は、ダッフイ抗原ケモカイン受容体(DARC)に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。一実施形態において、EHCは、ダッフイ抗原ケモカイン受容体(DARC)に由来するアミノ酸配列をコードする組換え遺伝子を発現する。DARC抗原は完全長タンパク質又はその断片として発現し得る。DARCは融合タンパク質として発現し得る。他の実施形態において、DARCタンパク質はEHC内又はその上に負荷される。一部の実施形態において、負荷されたDARCはさらに機能化されるか、又は他の方法で修飾される。DARC抗原分子は細胞内又は細胞外に局在し得る。

#### 【0211】

DARCは、強力なマルチリガンドケモカイン受容体として同定された。DARCはロドプシン様7本ヘリックス膜貫通タンパク質ファミリーに属する。赤血球に加えて、DARCは、多くの組織における白血球遊出の原発部位である後毛細管細静脈内皮細胞で発現する。DARCは、CC及びCXCケモカインの両方に対する高度に特異的な結合部位を提供する。DARCは、ELRモチーフCXCケモカインに対してより高い親和性を有すると考えられている。CXCケモカインは好中球化学誘引物質であり、潜在的に血管新生促進性であり得る。

20

#### 【0212】

DARCとCXCCL8との間の相互作用では、5nmol/Lの解離定数( $K_d$ )及び赤血球当たり1000~9000個と推定される受容体結合部位が示されている(Hadley, Blood, 1997)。他の7回膜貫通型ケモカイン受容体と異なり、DARCは、2番目の細胞質ループに位置する高度に保存されたGタンパク質共役モチーフを欠いている(Meny, Immunohematology, 2010)。DARCはGタンパク質共役型ではなく、既知の選択的シグナル伝達機構を有しない。DARCの生物学的な役割は完全には解明されていない。DARCは、a)多重特異的であり; b)細胞内シグナルを惹起する能力を有しないと考えられており、及びc)赤血球表面に結合したケモカインにその通常の標的炎症細胞は到達できないと考えられる(Neote, J Biol Chem, 1993)。赤血球は炎症過程の調節においてDARCの存在を用いて役割を果たし得る。

30

#### 【0213】

サイトカインなどの炎症シグナル伝達分子は、高濃度で存在するとき、局所的及び全身的な組織損傷を引き起こし得る。サイトカインのバーストは、細菌性敗血症、関節リウマチ、及び他の幾つかの炎症性疾患の病因に結び付けられている。天然サイトカイン受容体又は合成抗体様受容体模倣体を外因的に発現する修飾EHCは、炎症性サイトカインを隔絶することができる。例示的ケモカイン受容体はDARCである。本明細書には、限定はされないがDARCを含めた、サイトカイン受容体又はケモカイン受容体である抗原を含むEHCが提供される。例えば、DARC抗原を発現する(それにより天然赤血球上に存在する量を増加させる)EHCを使用して、循環中及び/又は体の末梢組織内のケモカインレベルをモジュレートし得る。DARC抗原を含むEHCは、破壊を特徴とし得るか、或いは炎症性メディエーターを緩徐に放出して循環中に、但し低い拡散濃度で戻し得る。

40

50

ケモカイン又はサイトカイン受容体を含む抗原を含むEHCは、シグナル伝達ペプチドのリザーバとして機能し得る。

【0214】

一実施形態において、抗原は、抗体に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。一実施形態において、EHCは、抗体に由来するアミノ酸配列をコードする組換え遺伝子を発現する。抗体抗原は完全長タンパク質又はその断片として発現し得る。抗体は融合タンパク質として発現し得る。他の実施形態において、抗体タンパク質はEHC内又はその上に負荷される。一部の実施形態において、負荷された抗体はさらに機能化されるか、又は他の方法で修飾される。抗体抗原は細胞内又は細胞外に局在し得る。一実施形態において、抗原は、所望の標的に特異的な抗体アミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、抗体はscFvである。他の実施形態において、抗体はナノボディである。

10

【0215】

特定の実施形態において、EHCは、標的に特異的な抗体又はその断片を含み且つ細胞表面上に位置する抗原を含む。例えば、ボツリヌス毒素結合に特異的な抗体の可変断片(Fv)がEHCの表面上で発現する。ボツリヌス毒素結合抗体は当該技術分野において公知であり(Amersdorfer, Inf and Immunity, 1997)、抗体のFv部分の発現も同様に公知である(Hoedemaeker, Journ of Bio Chemistry, 1997)。結合すると、毒素はFv領域を介してEHCに保持され、隔絶され、体からのクリアランスのために循環系を通じて肝臓へとシャトルされる。

20

【0216】

一実施形態において、抗原は、scFv抗体に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。一実施形態において、EHCは、scFv抗体に由来するアミノ酸配列をコードする組換え遺伝子を発現する。scFv抗体抗原は完全長タンパク質又はその断片として発現し得る。scFv抗体は融合タンパク質として発現し得る。他の実施形態において、scFvタンパク質はEHC内又はその上に負荷される。EHCによって発現され得る好適なscFv抗原ポリペプチドとしては、限定はされないが、表6に列挙されるものが挙げられる

【0217】

scFv抗体は、主にハイブリドーマ、免疫化マウス由来の脾臓細胞、及びヒト由来Bリンパ球から構築されている。抗体の可変領域はV(H)及びV(L)ドメインの可変ドメインの非共有結合性ヘテロ二量体によって形成され、これが次には組換えscFv抗体の構築に用いられ得る。

30

【0218】

scFvの作製は当該技術分野において公知であり、mRNAを初めにハイブリドーマから(或いはまた、脾臓、リンパ球、及び骨髄から)単離し、続いて抗体遺伝子増幅(PCR)の鋳型として機能するようにcDNAに逆転写する必要がある。この方法によれば、抗体由来のscFvの多様な集合(scFvがモデル化された元の抗体と同等の集合)を有する大規模ライブラリを作成することができる。

【0219】

scFv抗原は、限定はされないが表4にあるものを含めた、任意の標的分子に特異的にすることができる。

40

【0220】

一例において、EHC上で炭疽毒素に特異的なscFv抗原を発現させ得る。それを必要としている対象に投与すると、炭疽毒素に特異的な抗原分子を含むEHCの集団の有効用量を使用して炭疽毒素を捕捉し、隔絶することができる。EHCは肝臓に遊走し、そこでクリアランスが起こる。

【0221】

特定の実施形態において、赤血球は、細胞の表面上で発現するラクダ科動物由来のナノボディを含む抗原を含む。ナノボディは通常12~15kDaである。ナノボディは抗体

50

及び s c F v と比べてかなり小さい。従ってナノボディはトランスフェクトし易く、ナノボディ抗原は E H C においてより容易に発現し、翻訳され及び/又は細胞表面に輸送されることになる。特定の実施形態において、ナノボディ抗原を用いることにより、特定の抗原によって引き起こされる免疫原性効果が最小限に抑えられる。ナノボディは、そのサイズが小さいため、潜在的な免疫原性の低下をもたらし得る。特定の実施形態において、抗原ナノボディは、それが E H C の原形質膜の機械的及び形態学的挙動の変化を抑えることが理由で用いられる。これにより、E H C が通常の循環赤血球の挙動を呈することが可能となり得る。特定の実施形態において、抗原ナノボディは、標準的な抗体と比較して隠れた又はまれなエピトープを認識する能力が高いことが理由で用いられる。例えば、抗原ナノボディは、標的の小さい酵素キャビティに結合し、標的の分子挙動をモジュレートすることができる。

10

#### 【0222】

特定の実施形態において、E H C は、ヒト補体系の分子の標的エピトープに対して特異性を有する抗原ナノボディを含む。かかる E H C は、それを必要としている対象に投与されると、補体系の1つ以上の過活性因子を選択的に枯渇させ得る。例えば、C5は、対象への細胞の投与時に、C5の標的エピトープに対して特異性を有する抗原ナノボディを含む E H C によって標的化され、E H C によってその系から除去され得る。この手法は、例えば発作性夜間ヘモグロビン尿症などの補体障害に対して治療効果をもたらすのに好適である。特定の実施形態において、E H C は、限定はされないが表4に列挙されるものを含めた、分子の標的エピトープに対して特異性を有する抗原ナノボディを含む。

20

#### 【0223】

一部の実施形態において、抗原は、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ(スクラーゼ)又はヒドロラーゼ(DNアーゼ、リパーゼ)のうちの1つに由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。一実施形態において、E H C は、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ(スクラーゼ)又はヒドロラーゼ(DNアーゼ、リパーゼ)のうちの1つに由来するアミノ酸配列をコードする組換え遺伝子を発現する。抗原プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ及びヒドロラーゼは完全長タンパク質又はその断片として発現し得る。抗原プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ及びヒドロラーゼは融合タンパク質として発現し得る。他の実施形態において、抗原プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ又はヒドロラーゼは E H C 内又はその上に負荷される。一部の実施形態において、負荷された抗原プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ又はヒドロラーゼはさらに機能化されるか、又は他の方法で修飾される。抗原プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ又はヒドロラーゼ抗原分子は細胞内又は細胞外に局在し得る。

30

#### 【0224】

特定の実施形態において、E H C は、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ又はヒドロラーゼを含む抗原を含む。プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ又はヒドロラーゼ抗原を含む E H C は、例えば肝臓のマクロファージによる循環クリアランスとは無関係に E H C 上の標的を分解する能力を有する。特定の実施形態において、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、リアーゼ又はヒドロラーゼを含む抗原を含む E H C がそれを必要としている対象に投与され、癌細胞成長に必須の代謝産物の選択的な分解によって癌が治療され得る。例えば、アスパラギナーゼを使用して局所アスパラギンレベルを低下させることにより、急性リンパ性白血病及び急性骨髄性白血病が治療される。好適な抗原には、例えば、標的分子の分解能を有する2つの主要な酵素クラス、リアーゼ及びヒドロラーゼの一方又は両方が含まれ得る。特定の実施形態において、限定はされないが表6に列挙されるものを含めた分子を含む抗原を含む E H C が提供される。

40

#### 【0225】

特定の実施形態において、赤血球は、リアーゼを含む抗原を含む。一実施形態において、リアーゼはバリンデカルボキシラーゼである。バリンデカルボキシラーゼ抗原は E H C の細胞内空間内で発現し得る。バリンデカルボキシラーゼ抗原を含む E H C がそれを必要

50



としている対象に投与され、血中のバリンレベルがモジュレートされ得る。バリンデカルボキシラーゼ抗原を含む EHC は、血中のアミノ酸バリンレベルが増加する遺伝性障害であるバリン血症の治療に好適である。罹患者は、典型的には嘔吐、成長障害、知的障害、及び疲労を発症する。バリン血症はバリントランスアミナーゼ酵素の欠損によって引き起こされ、常染色体劣性遺伝パターンを有する。

【0226】

特定の実施形態において、赤血球は、ヒドロラーゼを含む抗原を含む。一実施形態において、ヒドロラーゼはデオキシリボヌクレアーゼ I (DNアーゼ I) である。DNアーゼ I 抗原は EHC の表面上で発現し得る。DNアーゼ I 抗原を含む EHC がそれを必要としている対象に投与されると、ピリミジンヌクレオチドに隣接するリン酸ジエステル結合で循環 DNA が優先的に切断され、3' 位に遊離ヒドロキシル基を有する 5' - リン酸末端ポリヌクレオチドが生じる。平均してテトラヌクレオチドが産生される。DNアーゼ I 抗原を含む EHC は、全身性エリテマトーデス (SLE) などの、循環中の高レベルの免疫原性 DNA によって増悪する病態の治療に好適である。

10

【0227】

特定の実施形態において、抗原は、例えばリガンドとの結合時又は刺激との接触時に外部刺激に応答する能力を有し、ここで応答は、例えば、移動、再折り畳み、コンホメーションの変化、二量体の形成、ホモ二量体の形成、ヘテロ二量体の形成、多量体の形成、シグナル伝達、検出可能な形態のエネルギー (例えば蛍光) の放出、別の抗原との機能的相互作用、又は非外因性抗原ポリペプチドとの機能的相互作用を伴う。

20

【0228】

標的

本明細書には、標的との相互作用能を有する外因性抗原ポリペプチドを含む外因性抗原発現 EHC が提供される。本明細書にはさらに、標的との相互作用能を有する非ポリペプチド外因性抗原を含む外因性抗原発現 EHC が提供される。外因性抗原発現 EHC は、対象の循環系に滞留する標的の量又は濃度をモジュレートするため、それを必要としている対象に投与され得る。好適な外因性抗原は、特定の標的と相互作用するように選択され得る。好適な標的には、特定の疾患、障害、又は病態に関連する実体が含まれる。しかしながら、標的はまた、特定の疾患、障害、又は病態とは無関係に選択されてもよい。

【0229】

一部の実施形態において、標的は抗体又は抗体様分子、例えば自己免疫性抗体又は自己抗体、又は外来抗体、又は治療用抗体であり、限定はされないが、例えば、 $\alpha$ -2 グリコプロテイン 1 に対する抗体、I / i 抗原に対する抗体、コラーゲン a3 (IV) の NC1 ドメインに対する抗体、血小板糖タンパク質に対する抗体、ホスホリパーゼ A2 受容体に対する抗体、赤血球グリコホリン A、B、若しくは C に対する抗体、又は赤血球 Rh 抗原に対する抗体が挙げられる。

30

【0230】

一部の実施形態において、標的は補体カスケードの分子、例えば、C1、C1r、C1s、C1q、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4b、C4a、C3bBb、C3bBb3b、C4b2b、C4b2b3b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、ポリ C9、膜侵襲複合体、B 因子、D 因子、プロパージン、C3、C3a、C3b、iC3b、C3c、C3dg、C3dk、C3e、Bb、I 因子、C1q、C1r、C1s、C4、C4a、C4b、C2、C4bp、マンノース結合レクチン (MBL)、MBL 関連セリンプロテアーゼ 1 (MASP1)、MBL 関連セリンプロテアーゼ 2 (MASP2)、C5、C5a、C6、C7、C8、C9、CR1、CR2、CR3、CR4、C3aR、C3eR、崩壊促進因子 (DAF)、膜補因子タンパク質 (MCP)、CD59、C3 鎖受容体、C1 インヒビター、C4 結合タンパク質、I 因子、H 因子である。

40

【0231】

一部の実施形態において、標的は免疫複合体、例えば IgG 免疫複合体、IgA 免疫複

50

合体、IgM免疫複合体である。

【0232】

一部の実施形態において、標的は、アミロイド斑、例えば アミロイド、IAPP（アミリン）、 $\alpha$ -シヌクレイン、PrP<sup>sc</sup>、ハンチンチン、カルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、アポリポタンパク質AI、血清アミロイドA、メジン（medin）、プロラクチン、トランスサイレチン、リゾチーム、 $\alpha$ 2ミクログロブリン、ゲルゾリン、ケラトエピテリン、シスタチン、免疫グロブリン軽鎖AL、S-IBMを含む斑である。

【0233】

一部の実施形態において、標的は細菌、例えばエンテロコッカス属（*Enterococcus*）、ストレプトコッカス属（*Streptococcus*）、又はマイコバクテリア（*Mycobacteria*）、リケッチア属（*Rickettsia*）、マイコプラズマ属（*Mycoplasma*）、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）、淋菌（*Neisseria gonorrhoeae*）、レジオネラ属（*Legionella*）、コレラ菌（*Vibrio cholerae*）、連鎖球菌（*Streptococci*）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、ジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheriae*）、クロストリジウム属種（*Clostridium spp.*）、腸管毒素原性大腸菌（*Escherichia coli*）、及び炭疽菌（*Bacillus anthracis*）である。菌血症がある程度報告されている他の病原体としては、以下が挙げられる：リケッチア属（*Rickettsia*）、バルトネラ・ヘンセラ（*Bartonella henselae*）、バルトネラ・クインタナ（*Bartonella quintana*）、Q熱コクシエラ（*Coxiella burnetii*）、クラミジア属（*Chlamydia*）、らい菌（*Mycobacterium leprae*）、サルモネラ属（*Salmonella*）；赤痢菌属（*Shigella*）；エルシニア・エンテロコリチカ（*Yersinia enterocolitica*）；偽結核菌（*Yersinia pseudotuberculosis*）；レジオネラ・ニューモフィラ（*Legionella pneumophila*）；結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）；リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）；マイコプラズマ属種（*Mycoplasma spp.*）；蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）；コレラ菌（*Vibrio cholerae*）；インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）；炭疽菌（*Bacillus anthracis*）；梅毒トレポネーマ（*Treponema pallidum*）；レプトスピラ属（*Leptospira*）；ボレリア属（*Borrelia*）；ジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheriae*）；フランシセラ属（*Francisella*）；ブルセラ・メリテンシス（*Brucella melitensis*）；カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）；エンテロバクター属（*Enterobacter*）；プロテウス・ミラビリス（*Proteus mirabilis*）；プロテウス属（*Proteus*）；及びクレブシエラ・ニューモニエ（*Klebsiella pneumoniae*）。

【0234】

一部の実施形態において、標的はウイルスであり、限定はされないが、その感染に細胞表面受容体との結合時における宿主細胞への遺伝物質の注入が関わるもの、その感染が細胞表面受容体によって媒介されるウイルスが挙げられる。これらのウイルスの非限定的な例は、パラミクソウイルス科（*Paramyxoviridae*）（例えば、ニューモウイルス、モルビリウイルス、メタニューモウイルス、レスピロウイルス又はルブラウイルス）、アデノウイルス科（*Adenoviridae*）（例えば、アデノウイルス）、アレナウイルス科（*Arenaviridae*）（例えば、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスなどのアレナウイルス）、アルテリウイルス科（*Arteriviridae*）（例えば

、ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス又はウマ動脈炎ウイルス)、ブニヤウイルス科(Bunyaviridae)(例えば、フレボウイルス又はハンタウイルス)、カリシウイルス科(Caliciviridae)(例えば、ノーウォークウイルス)、コロナウイルス科(Coronaviridae)(例えば、コロナウイルス又はトロウイルス)、フィロウイルス科(Filoviridae)(例えば、エボラ様ウイルス)、フラビウイルス科(Flaviviridae)(例えば、ヘパシウイルス又はフラビウイルス)、ヘルペスウイルス科(Herpesviridae)(例えば、シンプレックスウイルス、パルセロウイルス、サイトメガロウイルス、ロゼオロウイルス、又はリンホクリプトウイルス)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)(例えば、インフルエンザウイルス又はトゴトウイルス)、パルボウイルス科(Parvoviridae)(例えば、パルボウイルス)、ピコルナウイルス科(Picornaviridae)(例えば、エンテロウイルス又はヘパトウイルス)、ポックスウイルス科(Poxviridae)(例えば、オルトポックスウイルス、アビポックスウイルス、又はレポリポックスウイルス)、レトロウイルス科(Retroviridae)(例えば、レンチウイルス又はスプーマウイルス)、レオウイルス科(Reoviridae)(例えば、ロタウイルス)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)(例えば、リッサウイルス、ノビラブドウイルス、又はベシクロウイルス)、及びトガウイルス科(Togaviridae)(例えば、アルファウイルス又はルビウイルス)から選択することができる。これらのウイルスの具体的な例としては、ヒト呼吸器コロナウイルス、A型~C型インフルエンザウイルス、A~G型肝炎ウイルス、及び単純ヘルペスウイルス1~9型が挙げられる。

10

20

## 【0235】

一部の実施形態において、標的は寄生虫であり、限定はされないが、例えば、腸内寄生虫又は血液感染性の寄生虫、原虫、トリパノソーマ；マラリアを引き起こす能力を有する血液原虫及び寄生虫；腸内糸虫及びテニア科糸虫を含めた全身性糸虫；腸内コクシジウム；腸内鞭毛原虫；糸状線虫；胃腸管線虫並びに全身性線虫及び鉤虫が挙げられる。

## 【0236】

一部の実施形態において、標的は真菌であり、限定はされないが、例えば、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、カンジダ・グラブラタ(*Candida glabrata*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、T.グラブラタ(*T. glabrata*)、カンジダ・トロピカリス(*Candida tropicalis*)、C.クルセイ(*C. krusei*)、及びC.パラプシロシス(*C. parapsilosis*)が挙げられる。

30

## 【0237】

一部の実施形態において、標的は細菌性毒素であり、限定はされないが、例えば、AB毒素、アルファ毒素、炭疽毒素、バクテリオシン、ボツリヌス毒素、コレステロール依存性細胞溶解素、ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)C3毒素、クロストリジウム・ディフィシル(*Clostridium difficile*)毒素A、クロストリジウム・ディフィシル(*Clostridium difficile*)毒素B、クロストリジウム属(*Clostridium*)エンテロトキシン、クロストリジウム・パーフリンゲンス(*Clostridium perfringens*)アルファ毒素、クロストリジウム・パーフリンゲンス(*Clostridium perfringens*)ベータ毒素、コードファクター、Cry1Ac、クリプトフィシン、デルタエンドトキシン、ジフテリア毒素、エンテロトキシンB型、発赤毒素、表皮剥脱素、ヘモリシンE、易熱性エンテロトキシン、耐熱性エンテロトキシン、溶血素、ロイコシジン、リポ多糖、リステリオリシンO、ミクロシン、パントン-バレンタインロイコシジン、病原性アイランド、フェノール可溶性モジュリン、ニューモリシン、ポア形成毒素、シュードモナス属(*Pseudomonas*)外毒素、RTX毒素、サカシン(*sakacin*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)アルファ毒素、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)ベータ毒素、黄色ブド

40

50

ウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) デルタ毒素、ストレプトリジン、シンプロカミド A (*Symplocamide A*)、タブトキシン、テタノリジン、テタノスパスミン、チオール活性化細胞溶解素、トラアシン、毒素性ショック症候群毒素、トキソフラビン、トレハロースジミコレート、ベロ毒素、及びピブリオシンが挙げられる。

【0238】

一部の実施形態において、標的はプリオンタンパク質であり、限定はされないが、例えば、PRP、PRPc、PrPsc、PRPres が挙げられる。

【0239】

一部の実施形態において、標的はサイトカイン又はケモカイン又は成長因子であり、限定はされないが、例えば、アシル化刺激タンパク質、アディポカイン、アルブインターフェロン、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、コロニー刺激因子、CXCL1、CXCR1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL9、エリスロポエチン、Gc-MAF、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、肝細胞成長因子、IL10ファミリー、IL17ファミリー、IL1A、IL1B、インターフェロン、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、I型インターフェロン、II型インターフェロン、III型インターフェロン、インターロイキン、インターロイキン1ファミリー、インターロイキン1受容体アンタゴニスト、インターロイキン10、インターロイキン12、インターロイキン12サブユニット、インターロイキン13、インターロイキン16、インターロイキン2、インターロイキン23、インターロイキン23サブユニット、インターロイキン34、インターロイキン35、インターロイキン6、インターロイキン7、インターロイキン8、インターロイキン-36、白血病抑制因子、白血球促進因子、リンホカイン、リンホトキシン、リンホトキシニン、リンホトキシニン、マクロファージコロニー刺激因子、マクロファージ炎症性タンパク質、マクロファージ活性化因子、モノカイン、ミオカイン、ミオネクチン、ニコチン

アミドホスホリボシルトランスフェラーゼ、オンコスタチンM、オブレルベキン、血小板第4因子、炎症誘発性サイトカイン、プロメガポエチン、RANKL、ストロマ細胞由来因子1、タリモジーンラハーパレブベック (*talimogene laherparepvec*)、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子類、XCL1、XCL2、XCR1、アンギオポエチン、塩基性線維芽細胞成長因子、ベータセルリン、骨形成タンパク質、脳由来神経栄養因子、CCN細胞間シグナル伝達タンパク質、CTGF、ダルベポエチン、エンドグリン、上皮成長因子、エポエチン、エポエチン、エリスロポエチン、FGF15、FGF15/19、線維芽細胞成長因子、線維芽細胞成長因子23、フィルグラスチム、グリア成熟因子、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、成長分化因子-9、ヘバープロットP (*heberprot-P*)、造血成長因子、ヘパリン結合性EGF様成長因子、肝細胞成長因子、インスリン様成長因子、インスリン様成長因子1、インスリン様成長因子2、ケラチノサイト成長因子、ミオスタチン、神経成長因子、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、オンコモジュリン、骨新生促進剤 (*osteopromotive*)、パリフェルミン、PDGFβ、胎盤成長因子、血小板アルファ顆粒、血小板由来成長因子、血小板由来成長因子受容体、増殖指数、トロンボポエチン、形質転換成長因子、血管内皮増殖因子が挙げられる。

【0240】

一部の実施形態において、標的は小分子、例えば、化学物質、アミノ酸、原子、元素、有機酸、<2000Da、<1000Da、<500Daであり、限定はされないが、例えば、鉄、銅、カルシウム、カリウム、エタノール、メタノール、グリシン、アラニン、

10

20

30

40

50

バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システイン、セレノシステイン、スレオニン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンが挙げられる。

【0241】

一部の実施形態において、標的は、脂質、脂質複合体、プロテオリピド複合体、又はコレステロールであり、限定はされないが、例えば、LDL、VLDL、HDL、HDL2B、トリグリセリド類、LP(a)、コレステロールが挙げられる。

【0242】

一部の実施形態において、標的は哺乳類細胞であり、限定はされないが、例えば、ヒト細胞、循環細胞、免疫細胞、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球、B細胞、T細胞、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、- T細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞、マクロファージ、クッパー細胞、樹状細胞、癌細胞、癌幹細胞、循環腫瘍細胞、以下に挙げる癌、即ち、限定はされないが、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、肛門癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、腸癌、脳腫瘍、乳癌、原発不明癌、骨転移癌、脳転移癌、肝転移癌、肺転移癌、カルチノイド、子宮頸癌、絨毛癌、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、眼癌、胆嚢癌、胃癌、妊娠性絨毛性腫瘍(GTT)、ヘアリー細胞白血病、頭頸部癌、ホジキンリンパ腫、腎癌、喉頭癌、白血病、肝癌、肺癌、リンパ腫、メラノーマ性皮膚癌、中皮腫、男性癌、奇胎妊娠、口腔・中咽頭癌、骨髄腫、鼻腔・副鼻腔癌、鼻咽腔癌、非ホジキンリンパ腫(NHL)、食道癌、卵巣癌、睪癌、陰茎癌、前立腺癌、希少癌、直腸癌、唾液腺癌、二次癌、皮膚癌(非メラノーマ性)、軟部組織肉腫、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、原発不明癌、子宮癌、腔癌、及び外陰癌のうちの1つからの癌細胞が挙げられる。

【0243】

抗原発現、コンジュゲーション、負荷

特定の実施形態において、ポリペプチド抗原は外因性抗原発現EHC内で発現する。ポリペプチド抗原は外因性抗原発現EHCの表面上に呈示されてもよく、又は外因性抗原発現EHC内にあってもよい。

【0244】

特定の実施形態において、ポリペプチド抗原は外因性抗原発現EHCとコンジュゲートされる。ポリペプチド抗原は、通常、外因性抗原発現EHCの表面にコンジュゲートされる。コンジュゲーションは、当該技術分野において公知の方法及び本明細書に記載される方法によって化学的又は酵素的に実現し得る。非ポリペプチド抗原もまた外因性抗原発現EHCにコンジュゲートされ得る。一部の実施形態において、抗原は外因性抗原発現EHCにコンジュゲートされない。

【0245】

特定の実施形態において、ポリペプチド抗原は外因性抗原発現EHC中に負荷される。非ポリペプチド抗原もまた外因性抗原発現EHC内に負荷され得る。一部の実施形態において、抗原は外因性抗原発現EHC内又はその上に負荷されない。

【0246】

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、任意選択で組換え核酸から発現する抗原、EHCにコンジュゲートされる抗原、EHC内又はその上に負荷される抗原、及びそれらの任意の組み合わせを含む。任意選択で、外因性抗原発現EHCは治療剤又は他のペイロードを含む。

【0247】

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、好適な単離細胞、例えば、EHC、網赤血球、EHC前駆体、血小板、又は血小板前駆体を、抗原ポリペプチドをコードする組換え核酸と接触させることによって作成される。一部の実施形態において、抗原ポリペプチドはDNAによってコードされ、DNAが有核赤血球系前駆細胞又は有核血小板前

10

20

30

40

50

駆細胞に接触する。一部の実施形態において、抗原ポリペプチドはRNAによってコードされ、RNAが血小板、有核EHC、有核血小板前駆細胞、又は網赤血球に接触する。一部の実施形態において、抗原はポリペプチドであり、ポリペプチドが初代血小板、有核EHC、有核血小板前駆細胞、網赤血球、又は赤血球に接触する。

#### 【0248】

抗原ポリペプチドは、電気穿孔、化学的又は重合的トランスフェクション、ウイルス形質導入、機械的膜破壊、又は他の方法によってEHCに導入されたトランス遺伝子から発現し得る；電気穿孔、化学的又は重合的トランスフェクション、ウイルス形質導入、機械的膜破壊、又は他の方法によって細胞に導入されるmRNAから発現する抗原ポリペプチド；外部因子、例えば、転写活性化因子、転写リプレッサー、又は分泌経路エンハンサーの導入によって天然遺伝子座から過剰発現する抗原ポリペプチド；及び/又は産生細胞又は他の外部システムから合成されるか、抽出されるか、又は産生され、且つEHCに導入される抗原ポリペプチド。

10

#### 【0249】

一部の実施形態において、抗原は完全長タンパク質である。一部の実施形態において、抗原は、約7アミノ酸より長い任意の長さの、完全長タンパク質内に含まれる1つ以上のポリペプチドを含む。例えば、ポリペプチドは、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又は20アミノ酸超、例えば、30、40、50、60、70、80、90、100、又は100アミノ酸超であり得る。抗原を含むポリペプチドは、立体エピトープであってもよく、又は線状エピトープであってもよい1つ以上の免疫学的エピトープを含み得る。抗原は、1つ以上の異なるタンパク質由来の1つ以上のポリペプチドを含み得る。

20

#### 【0250】

目的の抗原は、限定はされないが、表B及び表Cに列挙されるものを含めた内因性細胞タンパク質との融合によって循環細胞で発現させることができる。自然の分化及び除核過程でEHCは、例えばc-Kit(SCF受容体)及びトランスフェリンなどの、赤血球新生には必要であるが成熟赤血球機能には不要の内因性タンパク質の多くをシェディングして捨てると考えられているため、内因性タンパク質との融合は必須であり得る。例えば、Keerthivasan et al., Stem Cells International 2011; Migliaccio, Haematologica 2010を参照されたい。保持されるタンパク質には、ある種の膜タンパク質、例えばグリコホリンA、バンド3、及びアクアポリンなど；ある種の細胞質タンパク質、例えばヘモグロビン、ヘモグロビン、及びアデノシンデアミナーゼなど；及び細胞骨格タンパク質が含まれる。

30

#### 【0251】

目的の抗原は、トランス遺伝子の直接発現、内因性細胞内タンパク質、例えばヘモグロビンとの融合、内因性細胞表面タンパク質、例えばバンド3、グリコホリンA、ケルの細胞内ドメインとの融合、又は赤血球系細胞骨格の構成成分との融合を含めた幾つもの方法によってEHCの細胞内空間で発現させることができる。

#### 【0252】

目的の抗原は、膜貫通ドメイン又は他の膜結合ドメインを含有する場合にトランス遺伝子の直接発現、例えば、バンド3、グリコホリンA、又はケルなどの内因性赤血球膜タンパク質との融合、又は前記タンパク質の膜貫通ドメインとの融合；又は内因性赤血球GPI結合型細胞表面タンパク質、例えば、アセチルコリンエステラーゼ、CD55、CD58又はCD59などのGPI-リンカーアクセプターペプチドとの融合を含めた幾つもの方法によってEHCの細胞外表面上に発現させることができる(例えば、Kooyman et al., Science 1995を参照)。

40

#### 【0253】

目的の抗原は、限定はされないが、表D、表D1、及び表Eに列挙されるものを含めた様々な化学的及び酵素的手段によって培養EHCの表面にコンジュゲートすることができ

50

る。これらの方法には、例えば、第一級アミン基を還元チオール基に結合させるNHSエステル-マレイミドヘテロ二官能性クロスリンカーなどの二官能性架橋剤による化学的コンジュゲーションが含まれる。これらの方法にはまた、例えば、アクセプター配列LPXTG又はLPXTAを含有するあるポリペプチドを、N末端ドナー配列GGGを含有するポリペプチドに結合させるソルターゼ酵素によって媒介されるトランスペプチダーゼ反応などの酵素的戦略も含まれる(例えば、Sweet et al., PNAS 2013を参照)。これらの方法にはまた、例えば抗原上及び細胞上のクリックケミストリーハンドルの(それぞれアジド及びアルキン)のソルターゼ媒介性コンジュゲーションと、続く抗原を細胞に化学的に結合する環化付加反応など、組み合わせの方法も含まれる(例えば、Neves et al., Bioconjugate Chemistry, 2013を参照)。

10

## 【0254】

必要であれば、EHC上又はEHC内において触媒的結合形成ポリペプチドドメインを細胞内で、或いは細胞外で発現させることができる。多くの触媒的結合形成ポリペプチドが存在し、トランスペプチダーゼ、ソルターゼ、及びイソペプチダーゼ、例えば、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)から分離されたタンパク質であるSpy0128に由来するものが挙げられる。

## 【0255】

Spy0128の自己触媒的イソペプチド結合形成サブユニット(CnaB2ドメイン)を分割すると、互いに対して特異性を有する触媒活性を保持した2つの個別的なポリペプチドが生じることが実証されている。このシステムのポリペプチドは、SpyTag及びSpyCatcherと称される。混合すると、SpyTag及びSpyCatcherはSpyTag上のAsp117とSpyCatcher上のLys31との間でイソペプチド結合形成を起こす(Zakeri and Howarth, JACS 2010, 132:4526)。この反応は細胞環境と適合性があり、タンパク質/ペプチドコンジュゲーションに高度に特異的である(Zakeri, B.; Fierer, J.O.; Celik, E.; Chittock, E.C.; Schwarz-Linek, U.; Moy, V.T.; Howarth, M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2012, 109, E690-E697)。SpyTag及びSpyCatcherは、エラスチン様タンパク質における翻訳後のトポロジー修飾を誘導することが示されている。例えば、SpyTagをN末端に置き、及びSpyCatcherをC末端に置くと、環状エラスチン様タンパク質の形成が誘導される(Zhang et al, Journal of the American Chemical Society, 2013)。

20

30

## 【0256】

構成要素SpyTag及びSpyCatcherは互換することができ、従って分子AがSpyTagに融合して且つ分子BがSpyCatcherに融合するシステムは、分子AがSpyCatcherに融合して且つ分子BがSpyTagに融合するシステムと機能的に均等である。本明細書の目的上、SpyTag及びSpyCatcherが使用されるとき、その相補的分子を代わりに置き換え得ることが理解されるべきである。

40

## 【0257】

SpyTag/SpyCatcherシステムなどの触媒的結合形成ポリペプチドを使用して、目的の外因性抗原をEHCの表面に結合させることができる。SpyTagポリペプチド配列は、EHCの細胞外表面上に発現し得る。SpyTagポリペプチドは、例えば、1型又は3型膜貫通タンパク質、例えばグリコホリンAのN末端に融合するか、2型膜貫通タンパク質、例えばケルのC末端に融合するか、複数回膜貫通タンパク質、例えばバンド3の細胞外末端又は細胞外ループにインフレームで挿入するか、GPI-アクセプターポリペプチド、例えばCD55又はCD59に融合するか、脂質鎖アンカー型ポリペプチドに融合するか、又は末梢膜タンパク質に融合することができる。SpyTag融合物をコードする核酸配列は、EHC内で発現し得る。目的の外因性抗原はSpyCat

50

cherに融合することができる。SpyCatcher融合物をコードする核酸配列は、SpyTag融合物を発現するのと同じEHCで発現し、分泌され得る。或いは、SpyCatcher融合物をコードする核酸配列は、例えば、細菌、真菌、昆虫、哺乳類、又は無細胞産生システムで外因的に産生されてもよい。SpyTag及びSpyCatcherポリペプチドが反応すると、目的の外因性抗原をEHCの表面に結び付ける共有結合が形成される。

【0258】

一実施形態では、SpyTagポリペプチドがEHCにおいてGata1プロモーターの制御下でグリコホリンAのN末端に対する融合物として発現し得る。SpyCatcherポリペプチド配列に融合した目的の外因性抗原、例えば表F、表G、表H、表I及び表Jに列挙される外因性抗原が、同じEHCにおいてGata1プロモーターの制御下で発現し得る。両方の融合ポリペプチドが発現すると、SpyTag及びSpyCatcherポリペプチド間にイソペプチド結合が形成されて、EHC表面と目的の外因性抗原との間に共有結合が形成される。

10

【0259】

別の実施形態では、SpyTagポリペプチドがEHCにおいてGata1プロモーター制御下でグリコホリンAのN末端に対する融合物として発現し得る。SpyCatcherポリペプチド配列に融合した目的の外因性抗原、例えば表F、表G、表H、表I及び表Jに列挙される外因性抗原が、好適な哺乳類細胞発現系、例えばHEK293細胞で発現し得る。EHC上でSpyTag融合ポリペプチドが発現したところで、SpyCatcher融合ポリペプチドを細胞と接触させ得る。好適な反応条件下では、SpyTag及びSpyCatcherポリペプチド間にイソペプチド結合が形成されて、EHC表面と目的の外因性抗原との間に共有結合が形成される。

20

【0260】

SpyTag/SpyCatcherシステムなどの触媒的結合形成ポリペプチドを使用して、目的の外因性抗原をEHCの細胞内空間にアンカリングすることができる。SpyTagポリペプチド配列は、トランス遺伝子の直接的な発現、内因性細胞内タンパク質、例えばヘモグロビンとの融合、内因性細胞表面タンパク質、例えば、バンド3、グリコホリンA、ケルの細胞内ドメインとの融合、又は赤血球系細胞骨格の構造成分との融合を含めた幾つもの方法によってEHCの細胞内空間で発現させることができる。SpyTag配列はポリペプチド末端に限定されず、ポリペプチド翻訳及び局在化が妨害されることのないように内因性ポリペプチドの内部配列内に組み込まれてもよい。目的の外因性抗原はSpyCatcherに融合することができる。SpyCatcher融合物をコードする核酸配列は、SpyTag融合物を発現するのと同じEHC内で発現することができる。SpyTag及びSpyCatcherポリペプチドが反応すると共有結合が形成され、これがEHCの細胞内空間に目的の抗原をアンカリングする役割を果たす。

30

【0261】

一実施形態では、EHCは、細胞内でヘモグロビンに融合したSpyTagを発現し得る。EHCは、翻訳時に細胞内グロビンがそのC末端でSpyTagに融合するように、ヘモグロビンプロモーター、グロビン遺伝子及びSpyTag配列を含む遺伝子配列で遺伝子修飾され得る。加えて、EHCは、翻訳時に細胞内フェニルアラニンヒドロキシラーゼ(PAH)がそのN末端でSpyCatcherに融合するように、PAH発現を駆動するSpyCatcherをコードするGata1プロモーター誘導遺伝子を発現する。両方の融合タンパク質の発現により、SpyTag結合グロビンが細胞内空間でイソペプチド結合を介してSpyCatcher結合PAHに連結され、グロビンに対するPAHのアンカリング及び成熟中の保持が可能となる。

40

【0262】

別の実施形態では、SpyTagポリペプチドがEHC内で目的の外因性抗原に対する融合物として発現し得る。SpyCatcherポリペプチドが、同じEHC内でグリコホリンAのC末端(細胞内)に対する融合物として発現し得る。両方の融合ポリペプチド

50



が発現すると、Spy Tag及びSpy Catcherポリペプチド間にイソペプチド結合が形成されて、膜アンカー型内因性赤血球ポリペプチドと目的の外因性抗原との間に共有結合が形成される。

【0263】

別の例では、目的の外因性抗原は、EHC膜に導入された細孔から外因性抗原が拡散する浸透圧負荷又は低張 - 高張サイクル（例えば、Cremel and Godfrin, Int J Pharm 2013を参照）及び細菌毒素に由来するものなどの細胞透過性ペプチドとの融合（例えば、Kwon et al., J Contr Rel 2009を参照）を含めた幾つもの方法によって、（発現させるのとは対照的に）培養EHCに物理的に負荷され得る。

10

【0264】

目的の外因性抗原は、電気穿孔、化学的又は重合的トランスフェクション、ウイルス形質導入、機械的膜破壊、又は他の方法によってEHCに導入されたトランス遺伝子から発現させ得る；電気穿孔、化学的又は重合的トランスフェクション、ウイルス形質導入、機械的膜破壊、又は他の方法によって細胞に導入されるmRNAから発現する外因性抗原；外部因子、例えば、転写活性化因子、転写リプレッサー、又は分泌経路エンハンサーの導入によって天然遺伝子座から過剰発現する外因性抗原；産生細胞又は他の外部システムから合成されるか、抽出されるか、又は産生され、且つEHCに導入される外因性抗原。

【0265】

本発明のEHCには、任意選択で、材料を細胞の内部（例えば細胞質）に送達することができるように細胞膜に摂動を生じさせるため、細胞に対して制御された傷害を所定の時間だけ加えることにより、ペプチド、タンパク質、DNA、RNA、iRNA、及び他の巨大分子などの材料（ペイロード）を負荷し得る。

20

【0266】

好ましい実施形態において、EHCは網赤血球である。例えば、制御された細胞傷害によって、外因性抗原をコードするmRNAを網赤血球に負荷し得る。mRNAは、必要に応じてネイキッドであっても、又は修飾されていてもよい。mRNA安定性を改善し及び/又は免疫原性を低下させるmRNA修飾としては、例えば、ARCA：抗リバースキャップ類似体（ $m_2^{7 \cdot 3} \cdot 0 GP_3 G$ ）、 $GP_3 G$ （非メチル化キャップ類似体）、 $m^7 GP_3 G$ （モノメチル化キャップ類似体）、 $m_3^{2 \cdot 2 \cdot 7} GP_3 G$ （トリメチル化キャップ類似体）、 $m5CTP$ （5'-メチルシチジン三リン酸）、 $m6ATP$ （N6-メチルアデノシン-5'-三リン酸）、 $s2UTP$ （2-チオウリジン三リン酸）、及び（プソイドウリジン三リン酸）が挙げられる。

30

【0267】

別の実施形態において、EHCは赤血球である。例えば、制御された細胞傷害によって赤血球に外因性抗原を負荷し得る。細胞傷害は、例えば、機械的歪み又はせん断力によって生じる圧力によるか、細胞を変形、狭窄、急激な延伸、急激な圧縮、又は高せん断速度のパルスに供することによって生じさせ得る。制御された細胞傷害により、材料（ペイロード）が周囲の細胞培地から細胞の細胞質に取り込まれる。

【0268】

制御された細胞変形（例えば、細胞が狭窄部を通過することに伴う細胞の機械的変形）に基づく制御された細胞傷害を使用すると、材料（ペイロード）は、エンドサイトーシスよりむしろ、拡散によって取り込まれる。材料（ペイロード）は、制御された傷害に伴い細胞に取り込まれた後にはエンドソームよりむしろ細胞質に存在し、従って細胞にとってその材料が容易に利用可能になる。例えば制御された変形による制御された細胞傷害は、細胞の生存率を維持する（例えば、50%超、70%、又は90%超）。特定の実施形態において、例えば制御された変形による制御された細胞傷害は、細胞分化及び活性の状態を維持する。必要であれば、処理の組み合わせ、例えば、変形による制御された傷害と、それに続く又はそれに先行する例えば電気穿孔又は別の細胞膜透過性増加方法が用いられる。任意選択で、界面活性剤が用いられてもよい。

40

50

## 【0269】

機械的変形方法は、他の膜透過性増加方法を十分に耐容しない細胞、例えば、かかる方法の実施後に生存率の低下又は異なる分化状態を示す細胞に特に好適である。機械的変形方法はまた、他の膜透過性増加方法を十分に耐容しない材料（ペイロード）にも好適である。それに代えて又は加えて、ペイロードは、例えば、ペイロードの例えば電荷、疎水性、又はサイズが原因で、代替的方法を用いると細胞に十分に導入されないこともある。

## 【0270】

変形による制御された傷害の1つの例示的な方法及びかかる方法に好適な装置が、例えば、国際公開第2013059343号パンフレット「INTRACELLULAR DELIVERY」（参照により本明細書に援用される）に記載されている。

10

## 【0271】

具体的な実施形態において、制御された変形による制御された細胞傷害に供された網赤血球の集団が提供される。細胞は、例えば、個々の網赤血球より小さい直径を有するマイクロチャンネルに通過させることにより圧縮して変形させ、それにより細胞膜に摂動を生じさせて膜を多孔質にし得る。細胞は、加えられる圧力によってチャンネル又は導管を通じて進み、例えば押し通される。ペイロード、例えば外因性ポリペプチド又はオリゴヌクレオチド（例えば、DNA、mRNAなどのRNA）を含む送達媒体中で圧縮及び変形が起こる。例えば、送達媒体は、表F、表G、表H、表I及び表Jに列挙される外因性抗原又はそのコードmRNAを含み得る。変形すると、網赤血球は外因性材料を取り込み、保持する。狭窄、延伸、及びノ又は高せん断速度のパルスで細胞に制御された傷害を与えた後、任意選択で、材料（ペイロード）を含有する送達媒体中において細胞をインキュベートする。細胞を送達媒体中に数分間維持し、狭窄部を通過して生じた傷害を回復させ、例えば閉鎖し得る。これは室温で行い得る。

20

## 【0272】

本明細書で使用されるとき、制御された細胞傷害には、i) ウイルス媒介性トランスフェクション（例えば、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、又はシンドビスウイルス）、ii) 化学的に媒介されるトランスフェクション、例えば、カチオン性ポリマー、リン酸カルシウム、カチオン性脂質、ポリマー、及びナノ粒子、例えば、シクロデキストリン、リボソーム、カチオン性リボソーム、DEAE-デキストラン、ポリエチレンイミン、 dendrimer、ポリブレン、リン酸カルシウム、リポフェクチン、DOTAP、リポフェクタミン、CTAB/DOPE、DOTMA；及びiii) マイクロニードル、ナノニードル、フェムトシリンジ、原子間力顕微鏡法（AFM）チップ、遺伝子銃（例えば、金ナノ粒子）、Amaxa Nucleofector、光トランスフェクション（多光子レーザー）、インパルフェクション（impalefection）、及びマグネトフェクションによって例示されるとおりの、物理的に媒介されるトランスフェクション、例えば直接注入、微粒子銃粒子送達、電気穿孔、レーザー照射、ソノレーション、磁気ナノ粒子、及び制御された変形（例えば、細胞の締め付け）、並びに当該技術分野において公知の他の好適な方法が含まれる。任意の好適な方法を使用して、1つ以上の所望のDNA、RNA（例えば、mRNA）、又は抗原を含むポリペプチドを含む本明細書に記載されるEHCを得ることができる。

30

40

## 【0273】

目的の外因性抗原は本発明のEHC上に検出することができる。外因性抗原の存在は、標準的な分子生物学的方法、例えば、ウエスタンブロッティング又はFACS分析を用いて確認し、定量化することができる。細胞内環境に存在する外因性抗原は、細胞溶解時に又は蛍光検出を用いて定量化し得る。

## 【0274】

製造

一部の実施形態において、EHCは、前駆体造血細胞、例えば、CD34+細胞、赤血球、血小板、巨核球、又は好中球を供給源として使用して作成される。一部の実施形態において、前駆体造血細胞はGMPに準拠した方法によってヒトドナーから単離される。一

50

部の実施形態において、出発細胞は自己ドナーから供給される。一部の実施形態において、出発細胞は同種ドナーから供給される。ドナーは血液細胞抗原多型についてタイピングされてもよく、及び/又はドナーは血液細胞抗原について遺伝子型が同定される。ドナーは万能血液ドナーであってもよい。一部の実施形態において、ドナーはボンベイ表現型を有し、即ちH抗原を発現しない。一部の実施形態において、ドナーはA B O血液型Oを有し、且つRh陰性である。

【0275】

一部の実施形態において、EHCは、出発物質の供給源としてCD34+造血前駆細胞、動員末梢CD34+細胞、又は骨髓由来CD34+細胞を使用して作成される。一部の実施形態において、出発細胞は臍帯血に由来するか、人工多能性幹細胞であるか、又は胚性幹細胞である。

10

【0276】

外因性抗原発現EHCは培養されてもよい。培養EHCは卓上スケールからバイオリアクタースケールにスケールアップすることができる。例えば、EHCは、それが飽和密度、例えば1ml当たり $1 \times 10^5$ 個、 $1 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^7$ 個、又は $1 \times 10^7$ 個超のEHCに達するまで培養される。任意選択で、飽和密度に達した後、EHCを大容積の新鮮培地に移してもよい。外因性抗原発現EHCはバイオリアクター、例えばWave型バイオリアクター、攪拌槽型バイオリアクターで培養し得る。様々な構成のバイオリアクターが当該技術分野において公知であり、必要に応じて好適な構成を選択し得る。外因性抗原発現EHCの集団の培養及び/又は拡大に好適な構成は、当業者であれば過度の実験を行うことなく容易に決定することができる。バイオリアクターには酸素を送り込むことができる。バイオリアクターは、任意選択で、1つ以上のインペラ、再循環流、培地注入流、並びに培地及び栄養素の流入を調節するか、又は培地、栄養素、及び廃棄物の流出を調節する制御構成要素を含み得る。

20

【0277】

一部の実施形態において、バイオリアクターは、培養プロセスの間にその細胞内DNAをシェディングする外因性抗原を含むヒトEHCの集団を含み得る。例えば、バイオリアクターは、培養後にヒトEHC、除核EHC、及びピレノサイト(pyrenocyte)の集団を含み得る。具体的な実施形態において、ヒトEHC及び除核EHCは外因性抗原を含み、外因性抗原は除核EHCによって保持されるが、一方、外因性抗原をコードする組換え核酸は除核細胞によっては保持されない。特定の実施形態において、外因性抗原を含む除核EHCは、対応する単離非修飾非培養EHCと実質的に同じ浸透圧膜脆弱性を呈する。

30

【0278】

一実施形態において、バイオリアクターでEHC又はEHC前駆体から作成される外因性抗原発現EHCの集団は、14日間以上で20,000倍超の総拡大を起こす。一部の実施形態において、外因性抗原は、培養された又は新鮮に単離されたEHC前駆体に導入され、及び外因性抗原をコードする組換え核酸の導入後、バイオリアクターでEHC前駆体から作成される外因性抗原発現EHCの集団は、バイオリアクターで前駆細胞から20,000倍超拡大する。

40

【0279】

一部の実施形態において、バイオリアクターはWaveバイオリアクター又はインペラ駆動攪拌機である。バイオリアクターはスパージャを用いて曝気され得る。一実施形態において、バイオリアクターは使い捨てである。一実施形態において、バイオリアクターはCIP(定置洗浄)である。本明細書に記載するおりのバイオリアクター設定で得られ得る外因性抗原発現EHCの最終的な数は、 $10^9$ 個超、 $10^{10}$ 個、 $10^{11}$ 個、 $10^{12}$ 個、 $10^{13}$ 個又は $10^{13}$ 個超のEHCであり得る。培養中、血球計のカウント又は600nmの光学濃度の読取りによって細胞密度を計測することにより、外因性抗原発現EHCの密度をモニタし得る。任意選択で、培養プロセスは、pHレベル、酸素化、攪拌速度、及び/又は再循環速度に関してモニタされる。

50

## 【0280】

## 方法及び特性

外因性抗原発現 E H C のアイデンティティはインビトロアッセイによって評価することができる。例えば、外因性抗原発現 E H C のアイデンティティは、集団中の E H C の数を、例えば顕微鏡法によるか、フローサイトメトリーによるか、又は血球計算によって計数して評価する。それに代えて又は加えて、外因性抗原発現 E H C のアイデンティティは、例えばフローサイトメトリー、ウエスタンブロット、免疫沈降、蛍光分光法、化学発光、質量分析法、又は吸光度分光法によって E H C のタンパク質含量を分析して評価する。一実施形態において、アッセイするタンパク質含量は、非表面タンパク質、例えば、内在性膜タンパク質、ヘモグロビン、成人ヘモグロビン、胎児ヘモグロビン、胚ヘモグロビン、細胞骨格タンパク質である。一実施形態において、アッセイするタンパク質含量は、表面タンパク質、例えば、分化マーカー、受容体、共受容体、輸送体、糖タンパク質である。一実施形態において、表面タンパク質は、限定はされないが、グリコホリン A、C K I T、トランスフェリン受容体、バンド 3、ケル、C D 4 5、C D 4 6、C D 4 7、C D 5 5、C D 5 9、C R 1 を含むリストから選択される。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C のアイデンティティは、例えばフローサイトメトリー、ウエスタンブロット、免疫沈降、蛍光分光法、化学発光、質量分析法、又は吸光度分光法によって E H C の外因性抗原含量を分析して評価する。例えば、外因性抗原発現 E H C のアイデンティティは、例えば R T - P C R、フローサイトメトリー、又はノーザンブロットによって E H C の m R N A 含量で評価することができる。外因性抗原発現 E H C のアイデンティティは、例えば核染色又は核酸プローブを使用した、例えばフローサイトメトリー、顕微鏡法、又はサザンブロットによって核物質含量で評価することができる。それに代えて又は加えて、外因性抗原発現 E H C のアイデンティティは、例えばフローサイトメトリー、液体クロマトグラフィーによるか、又は質量分析法によって E H C の脂質含量で評価する。

10

20

## 【0281】

一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C のアイデンティティは、例えば質量分析法、化学発光、蛍光分光法、吸光度分光法によって E H C の代謝活性で評価する。代謝活性は A T P 消費速度によって評価することができ、及び/又は代謝活性は、外因性抗原発現 E H C 中の 2, 3 - ジホスホグリセレート ( 2, 3 - D P G ) レベルを計測して評価する。代謝活性は、以下に挙げるもの、即ち、限定はされないが、アセチルサリチル酸、N - アセチルシステイン、4 - アミノフェノール、アザチオプリン、ブノロール、カプトプリル、クロルプロマジン、ダブソーン、ダウノルビシン、デヒドロエピアンドロステロン、ジダノシン、ドーパミン、エピネフリン、エスモロール、エストラジオール、エストロン、エトポシド、ハロペリドール、ヘロイン、インスリン、イソプロテレノール、硝酸イソソルビド、L Y 2 1 7 8 9 6、6 - メルカプトプリン、ミソニダゾール、ニトログリセリン、ノルエピネフリン、パラアミノ安息香酸のうちの 1 つの代謝速度として評価することができる。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C のアイデンティティは、例えば質量分析法、化学発光、蛍光分光法、又は吸光度分光法によって、基質を E H C で分配して評価する。基質は、以下に挙げるもの、即ち、限定はされないが、アセタゾラミド、アルブチン、ブメタミド ( B u m e t a m i d e )、クレアチニン、ダルスチン ( D a r s t i n e )、デスエチルドルゾラミド、ジゴキシゲニンジギトキソシド、ジゴキシシン - 1 6 ' - グルクロニド、エピネフリン、ゲンタマイシン、馬尿酸、メトホルミン、ノルエピネフリン、p - アミノ馬尿酸、パパベリン、ペニシリン G、フェノールレッド、セロトニン、スルホサリチル酸、タクロリムス、テトラサイクリン、ツカレソール、及びバンコマイシンのうちの 1 つであり得る。

30

40

## 【0282】

一実施形態において、外因性抗原発現 E H C の集団は前駆体細胞から分化させる。この実施形態において、外因性抗原発現 E H C の集団の分化状態はインビトロアッセイによって評価される。インビトロアッセイには、限定はされないが、拡大速度、数、タンパク質含量又は発現レベル、m R N A 含量又は発現レベル、脂質含量、基質の分配、触媒活性、

50

又は代謝活性を含めた、EHCのアイデンティティの評価に関して本明細書に記載されるものが含まれる。

【0283】

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは培養され、培養プロセスの過程にわたって複数の時点でEHCの分化状態が評価される。

【0284】

外因性抗原発現EHCは、出発物質の供給源として網赤血球を使用して作成し得る。顕微鏡法を用いて単離網赤血球の純度を評価してもよく、ここで網赤血球は、ニューメチレンブルー又はプリリアントクレシルブルーなどの特定の染色によって顕微鏡下で可視化されるリボソームRNAの網状(メッシュ様)ネットワークによって特徴付けられる。トランスフェリン受容体(CD71)の表面発現もまた網赤血球上で高く、赤血球に成熟するに従い減少するため、抗CD71抗体を使用した網赤血球集団の濃縮及び分析が可能である(例えば、Miltenyi CD71マイクロビーズ、製品添付文書番号130-046-201を参照)。或いは、クレアチン及びヘモグロビンA1C含量及びピルビン酸キナーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、及びポルホピリノーゲンデアミナーゼ酵素活性の分析を用いて、成熟赤血球に対する単離網赤血球の特性を評価してもよい(例えば、Brun et al., Blood 76:2397-2403(1990)を参照)。例えば、成熟赤血球と比べて網赤血球ではポルホピリノーゲンデアミナーゼの活性が約9倍高く、一方、ヘモグロビンA1C含量は約10分の1である。

【0285】

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCの作成に好適な細胞は、1つ以上の幹細胞からエキソビポ及び/又はインビポで分化させるものである。一実施形態において、1つ以上の幹細胞は1つ以上の造血幹細胞である。培養造血幹細胞がエキソビポで網赤血球及び赤血球に分化したことは、例えば、顕微鏡法、血液学、フローサイトメトリー、変形能計測、酵素活性、及びヘモグロビン分析及び機能特性を含め、様々なアッセイを実施して確認し得る(Giarratana et al., Nature Biotech. 23:69-74(2005))。培養造血幹細胞の表現型は、例えばクレシルプリリアントブルーで染色した細胞の顕微鏡法を用いて評価し得る。例えば、網赤血球はこれらの染色条件下でリボソームRNAの網状ネットワークを呈するが、一方、赤血球には染色がない。除核細胞もまた、例えばXE2100オートマツト(Sysmex, Roche Diagnostics)を使用して、平均赤血球容積(MCV;フェムトリットル(fL))、平均赤血球血色素濃度(MCHC;%)及び平均赤血球血色素量(MCH;p g/細胞)を含めた標準的な血液学的変数に関してモニタし得る。

【0286】

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、それらの基本的な物理的特性、例えば、サイズ、質量、容積、直径、浮力、密度、及び膜特性、例えば、粘度、変形能の変動、及び流動性に関して評価される。

【0287】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの直径は、顕微鏡法によるか、又は自動計測手段、例えば血液分析機器によって計測される。一実施形態において、外因性抗原発現EHCの直径は約1~20ミクロンである。一実施形態において、外因性抗原発現EHCの直径は少なくとも1つの寸法において約1~20ミクロンである。一実施形態において、外因性抗原発現EHCの直径は約1ミクロン未満である。一実施形態において、1つの寸法におけるEHCの直径は約20ミクロン超である。一実施形態において、外因性抗原発現EHCの直径は、約1ミクロン~約20ミクロン、約2ミクロン~約20ミクロン、約3ミクロン~約20ミクロン、約4ミクロン~約20ミクロン、約5ミクロン~約20ミクロン、約6ミクロン~約20ミクロン、約5ミクロン~約15ミクロン、又は約10ミクロン~約30ミクロンである。

【0288】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの平均赤血球容積は血液分析機器を使用し

10

20

30

40

50

て計測される。一実施形態において、EHCの平均赤血球容積の容積は10 fL超、20 fL、30 fL、40 fL、50 fL、60 fL、70 fL、80 fL、90 fL、100 fL、110 fL、120 fL、130 fL、140 fL、150 fL、又は150 fL超である。一実施形態において、EHCの平均赤血球容積は30 fL未満、40 fL、50 fL、60 fL、70 fL、80 fL、90 fL、100 fL、110 fL、120 fL、130 fL、140 fL、150 fL、160 fL、170 fL、180 fL、190 fL、200 fL、又は200 fL未満である。一実施形態において、EHCの平均赤血球容積は80~100フェムトリットル(fL)である。

【0289】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの平均浮遊質量(pg/細胞)は、懸濁マイクロチャネル共振器又は二重懸濁マイクロチャネル共振器を使用して計測される(例えば、Byun et al PNAS 2013 110(19):7580及びBryan et al. Lab Chip 2014 14(3):569を参照)。

10

【0290】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの乾燥密度はH<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O交換アッセイで浮遊質量によって計測される(例えば、Feijo Delgado et al., PLOS One 2013 8(7):e67590を参照)。

【0291】

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、空間光干渉顕微鏡法(SLIM)によって計測するとき、10 mrad超、20、30、40、50、60、70、80、90、100 mrad又は100 mrad超の標準偏差の平均膜変形能変動を有する(例えば、Bhaduri et al., Sci Reports 2014, 4:6211を参照)。

20

【0292】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団の平均膜粘度は、粘度依存性量子収量フルオロフォアと共にインキュベートしたときの平均蛍光の検出によって計測される(例えば、Haidekker et al. Chem& Biol 2001 8(2):123を参照)。

【0293】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの膜流動性は、例えば、BMG Labtech POLARstar Omegaマイクロプレートリーダーを用いた蛍光偏光によって計測される。

30

【0294】

例えば、変形能を計測するには、培養15日目に網赤血球を例えば白血球除去フィルタ(例えばLeucolab LCG2、Macopharma)に通過させて有核細胞と分離し、続いてエクササイトメトリーを使用してアッセイし得る。除核細胞を4%ポリビニルピロリドン溶液に懸濁し、次に60から450 mosMへの漸増浸透圧勾配に曝露する。細胞のレーザー回折パターン(変形能指数)の変化が容量オスモル濃度の関数として記録され、それにより細胞膜の動的変形能を評価する。生理学的に有意な容量オスモル濃度で達成された最大変形能指数が、赤血球の平均表面積と関係付けられる。

40

【0295】

一部の実施形態では、外因性抗原発現EHCがヘモグロビン含量に関して分析される。ヘモグロビンのアッセイを用いて分化細胞の表現型を評価し得る(Giarratana et al., Nature Biotech. 23:69-74(2005))。例えば、Bio-Rad Variant II Hbアナライザー(Bio-Rad Laboratories)を使用した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて種々のヘモグロビン画分の割合を評価し得る。酸素平衡は、二波長分光光度計(例えば、HemoXアナライザー、TCS)による連続的な方法を用いて計測し得る。ヘモグロビンの結合特性は、閃光光分解を用いて評価し得る。この方法では、532 nmの10ナノ秒パルスによる光分解後、COと細胞内ヘモグロビン四量体の再結合が436 nmで分析

50

される。

【0296】

本明細書に記載される外因性抗原発現 E H C は、必要であれば製造後に精製することができる。多くの好適な精製方法が当該技術分野において公知である。例えば、外因性抗原発現 E H C は、遠心、磁気泳動、照射、音響泳動、及び化学的又は物理的除核によって精製される。一実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、例えば間質細胞共培養によるエキソピボ成熟によって精製される。一実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、E H C の化学処理又は酵素処理、例えば脱グリコシル化酵素で処理することによって精製される。

【0297】

一実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、外因性抗原発現 E H C の任意の残存する複製能を無能化することにより精製される。一実施形態では、外因性抗原発現 E H C が放射線、例えば、X線、ガンマ線、粒子、粒子、中性子、陽子、元素核、紫外線に曝され、残存する複製コンピテントの核酸に損傷が与えられる。

【0298】

電離放射線は、X線、ガンマ線、粒子（高速電子）、粒子（ヘリウム原子の核）、中性子、陽子、及び他の重イオン、例えば、アルゴン、窒素、炭素、及び他の元素の核によって伝達されるエネルギーである。X線及びガンマ線は光と同様に電磁波であるが、そのエネルギーは光と比べてはるかに高い（その波長はるかに短い）。紫外（UV）光は、細胞に損傷を与えることのできる中間エネルギーの放射線であるが、紫外光は原子又は分子に電離（電子の喪失）を生じさせるのではなく、むしろ励起（電子のエネルギーレベルの変化）を生じさせる点で上述の電磁放射線の形態とは異なる。他の形態の放射線 - 粒子 - は、負電荷であるか（電子）、正電荷であるか（陽子、線、及び他の重イオン）、又は電氣的に中性である（中性子）かのいずれかである。

【0299】

放射線誘発性の電離は、細胞成分分子に直接作用するか、又は水分子に間接的に作用して、水由来のラジカルを生じさせる。ラジカルは極めて短時間で隣接分子と反応し、影響を受けた分子に化学結合の切断又は酸化（酸素原子の付加）をもたらす。細胞における主な効果は、DNA切断である。DNAは一对の相補的な二本鎖からなるため、単一の鎖或いは両鎖の切断が起こり得る。しかしながら、両鎖の切断は生物学的に一層重要であると考えられる。ほとんどの一本鎖切断は、通常はDNA分子の二本鎖の性質のために修復され得る（それらの2本の鎖が互いを補完し合い、そのためインタクトな鎖がその損傷を受けた逆鎖を修復するための鋳型として機能し得る）。しかしながら二本鎖切断の場合、修復はより困難であり、切断された末端の誤った再結合が起こり得る。こうしたいわゆる修復誤りは、突然変異、染色体異常、又は細胞死が誘導される原因となる。

【0300】

DNAセグメントの欠失は、照射を生き残った細胞における放射線損傷の主要な形態である。これは、(1) 2つの外側端の結合及び切断間の断片の喪失を伴うDNA分子における2つの別個の二本鎖切断の修復誤り、又は(2) 1つの二本鎖切断を修復する再結合前の切断端のクリーニングプロセス（ヌクレオチド（DNAの構成要素分子）の酵素消化）によって引き起こされ得る。

【0301】

放射線はその構成物（電子、陽子、中性子等）が異なるのみならず、そのエネルギーもまた異なる。飛跡に沿って高密度電離を発生させる放射線（中性子など）は高線エネルギー付与（高LET）放射線と称され、これは、飛跡の単位長さ当たりには放出される平均エネルギーを記述する物理的パラメータである（添付の図を参照）。低LET放射線は、その飛跡に沿ってあくまでも粗い密度で、ひいては細胞内で略均一に電離を発生させる。放射線量は、生物学的材料の単位当たりのエネルギーの量（例えば、1細胞当たりの電離の数）である。従って、高LET放射線は低LET放射線 - X線及びガンマ線など - と比べて生物学的材料を破壊する能力が高く、なぜなら同じ線量では、低LET放射線は細胞内

10

20

30

40

50

で同数のラジカルをより粗い密度で生じさせる一方、高LET放射線 - 中性子及び 粒子など - は、そのエネルギーのほとんどを細胞の小さい領域に付与するためである。高LET放射線からの高密度電離によって生じる限局的なDNA損傷は、低LET放射線からの粗い密度の電離によって生じる拡散したDNA損傷と比べて修復が困難である。

【0302】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、1kGy超、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100kGy、又は100kGy超の照射線量を使用する線照射に供される。

【0303】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、0.1mSv超、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000mSv、又は10000mSv超の照射線量を使用するX線照射に供される。

10

【0304】

外因性抗原発現EHCの集団の純度は、集団の均一性を計測することによって評価し得る。一実施形態では、外因性抗原発現EHCの平均分布幅が血液分析機器で計測される。一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、10超、100、1000、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、又は10<sup>6</sup>超の網赤血球対非網赤血球比を有する。外因性抗原発現EHCの集団の均一性は、集団の間質細胞含量を計測することによって評価し得る。一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は1ppb未満の間質細胞を有する。それに代えて又は加えて、外因性抗原発現EHCの集団の均一性は、集団のウイルス価及び/又は細菌コロニー形成能を計測することによって評価される。

20

【0305】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団の均一性はインビトロアッセイによって評価される。インビトロアッセイには、限定はされないが、拡大速度、数、タンパク質含量又は発現レベル、mRNA含量又は発現レベル、脂質含量、基質の分配、触媒活性、又は代謝活性を含めた、EHCのアイデンティティの評価に関して本明細書に記載されるものが含まれる。

【0306】

外因性抗原発現EHCの作成に使用される成熟赤血球は、様々な方法、例えば、細胞洗浄機、連続フローセルセパレーター、密度勾配分離法、蛍光活性化細胞選別法(FACS)、Miltenyi免疫磁気除去法(MACS)、又はこれらの方法の組み合わせを用いて単離し得る(例えば、van der Berg et al., Clin. Chem. 33:1081-1082(1987); Bar-Zvi et al., J. Biol. Chem. 262:17719-17723(1987); Goodman et al., Exp. Biol. Med. 232:1470-1476(2007)を参照)。

30

【0307】

赤血球は、単純な遠心によって全血から単離してもよい(例えば、van der Berg et al., Clin. Chem. 33:1081-1082(1987)を参照)。例えば、EDTA抗凝固処理全血を800xg、4で10分間遠心してもよい。多血小板血漿及びバフィーコートを除去し、赤血球を等張食塩水(NaCl、9g/L)で3回洗浄する。

40

【0308】

或いは、赤血球は、様々な分離媒体、例えば、Ficoll、Hypaque、Histopaque、Percoll、SigmaCell、又はそれらの組み合わせなどによる密度勾配遠心法を用いて単離してもよい。例えば、所定容積のHistopaque-1077を等容積のHistopaque-1119の上に層状に重ねる。そのHistopaqueの上に等容積の等張食塩水(NaCl、9g/L)中に1:1希釈したE

50



D T A 抗凝固処理全血を層状に重ね、この試料を  $700 \times g$ 、室温で30分間遠心する。これらの条件下では、顆粒球が  $1077/1119$  界面に移動し、リンパ球、他の単核細胞及び血小板が血漿/ $1077$  界面に留まり、及び赤血球がペレット化される。赤血球を等張食塩水で2回洗浄する。

#### 【0309】

或いは、赤血球は、Percollステップ勾配を用いて遠心により単離してもよい(例えば、Bar-Zvi et al., J. Biol. Chem. 262:17719-17723 (1987) を参照)。例えば、 $75 \text{ mM}$  クエン酸ナトリウム及び  $38 \text{ mM}$  クエン酸を含有する抗凝固薬溶液を新鮮な血液と混合し、細胞を HEPES 緩衝生理食塩水で素早く洗浄する。 -セルロース及び Sigma cell (1:1) の混合物で吸着して白血球及び血小板を取り除く。Sorvall SS34 ローターにおける  $2500 \text{ rpm}$  で10分間の  $45/75\%$  Percollステップ勾配での遠心によって、赤血球を網赤血球及び残留白血球からさらに単離する。赤血球はペレットとして回収され、一方、網赤血球バンドが  $45/75\%$  界面にあり、及び残留白血球バンドが  $0/45\%$  界面にある。HEPES 緩衝生理食塩水で数回洗浄することにより、赤血球から Percoll を取り除く。赤血球を単離するための密度勾配の作成に使用し得る他の材料としては、OptiPrep (商標)、水中  $60\%$  イोजキサノール溶液 (Axis-Shield, Dundee, Scotland から) が挙げられる。

10

#### 【0310】

赤血球は、例えばフローサイトメトリーを用いて網赤血球と分離してもよい(例えば、Goodman et al., Exp. Biol. Med. 232:1470-1476 (2007) を参照)。この場合、全血を遠心して ( $550 \times g$ 、20分、 $25^\circ\text{C}$ )、細胞を血漿と分離する。細胞ペレットをリン酸緩衝生理食塩水溶液に再懸濁し、Ficoll-Paque ( $1.077$  密度) で例えば遠心によって ( $400 \times g$ 、30分、 $25^\circ\text{C}$ ) さらに分画して赤血球を白血球と分離する。得られた細胞ペレットは、 $10\%$  ウシ胎仔血清を補充した RPMI に再懸濁し、例えば Becton Dickinson FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, N. J., USA) などの FACS 機器でサイズ及び粒度に基づき選別する。

20

#### 【0311】

赤血球は、免疫磁気除去法によって単離してもよい(例えば、Goodman, et al., (2007) Exp. Biol. Med. 232:1470-1476 を参照)。この場合、細胞型特異抗体を有する磁気ビーズを使用して非赤血球を除去する。例えば、本明細書に記載されるとおりの密度勾配を用いて赤血球を他の血液成分の大部分から単離し、続いて残留する任意の網赤血球を免疫磁気除去する。細胞はヒト抗体血清によって  $25^\circ\text{C}$  で20分間前処理し、次に網赤血球特異的抗原に対する抗体、例えば CD71 及び CD36 で処理する。抗体は磁気ビーズに直接結合させてもよく、又は例えば抗 PE 抗体を有する磁気ビーズが反応し得る PE にコンジュゲートしてもよい。この抗体-磁気ビーズ複合体は、残留網赤血球を例えば赤血球集団から選択的に抽出することが可能である。

30

#### 【0312】

赤血球はまた、アフエーシスを用いて単離してもよい。アフエーシスのプロセスは、患者又はドナーから全血を取り出し、遠心又は細胞選別を用いて血液成分を分離し、分離された部分の1つ以上を抜き取り、残りの成分を患者又はドナーに輸血し戻すことを伴う。現在、例えば Baxter (Deerfield, Ill., USA) の Amicus 及び Alyx 機器、Gambro BCT (Lakewood, Colo., USA) の Trima Accel 機器、及び Haemonetics (Braintree, Mass., USA) の MCS+9000 機器など、この目的のために幾つもの機器が使用されている。適切な細胞純度を達成するには、さらなる精製方法が必要となり得る。

40

#### 【0313】

一部の実施形態では、外因性抗原発現 EHC は1つ以上の網赤血球からエキソピボ及び/又はインピボで分化させる。網赤血球は、外因性抗原発現 EHC の作成に使用し得る。

50

網赤血球は未成熟赤血球であり、人体における赤血球の約1%を占める。網赤血球は骨髄で発達して成熟する。循環中に放出されると、網赤血球は急速に最終分化を起こして成熟赤血球となる。成熟赤血球と同様に、網赤血球は細胞核を有しない。成熟赤血球とは異なり、網赤血球はタンパク質合成を行う能力を維持している。一部の実施形態では、外因性抗原をコードする組換え核酸(mRNAなど)を網赤血球に導入して外因性抗原発現EHCを作成する。

#### 【0314】

網赤血球の成熟に伴う細胞密度の違いに基づき、種々の成熟度の網赤血球を末梢血から単離し得る。網赤血球は末梢血から、様々な密度勾配での分画遠心法を用いて単離し得る。例えば、Percoll勾配を用いて網赤血球を単離し得る(例えば、Noble et al., Blood 74:475-481(1989)を参照)。Percoll(Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo., USA)を10mM トリエタノールアミン、117mM NaCl、5mM グルコース、及び1.5mg/ml ウシ血清アルブミン(BSA)の終濃度となるように希釈して、密度1.096及び1.058g/mlの滅菌等張Percoll溶液を作製する。これらの溶液は容量オスモル濃度が295~310mOsmである。例えば5ミリリットルの第1のPercoll溶液(密度1.096)を滅菌15mlコニカル遠心管に加える。例えば2ミリリットルの第2のPercoll溶液(密度1.058)を、より高密度の第1のPercoll溶液の上に層状に重ねる。2~4ミリリットルの全血をチューブの上部に層状に重ねる。このチューブを、スイングアウト型チューブホルダを備えた冷却遠心機において250xgで30分間遠心する。網赤血球及び一部の白血球が2つのPercoll層の間の界面に移動する。界面にある細胞を新しいチューブに移し、5mMグルコース、0.03mM ナトリウムアジド及び1mg/ml BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄する。残留白血球をサイズ排除カラムでPBS中におけるクロマトグラフィーによって除去する。

#### 【0315】

或いは、網赤血球は、免疫磁気分離手法を用いたポジティブ選択によって単離してもよい(例えば、Brun et al., Blood 76:2397-2403(1990)を参照)。この手法は、成熟前に赤血球と比べて網赤血球の表面上で発現する多数のトランスフェリン受容体を利用するものである。トランスフェリン受容体に対する抗体でコーティングされた磁気ビーズを使用して、混合血液細胞集団から網赤血球を選択的に単離し得る。ヒトを含めた種々の哺乳類種のトランスフェリン受容体に対する抗体が、商業的供給元から入手可能である(例えば、Affinity BioReagents, Golden, Colo., USA; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo., USA)。トランスフェリン抗体は磁気ビーズに直接結合し得る。或いは、トランスフェリン抗体は、二次抗体を介して磁気ビーズに間接的に結合してもよい。例えば、ヒトトランスフェリンに対するマウスモノクローナル抗体10D2(Affinity BioReagents, Golden, Colo., USA)を、ヒツジ抗マウス免疫グロブリンGでコーティングされた免疫磁気ビーズ(Dynal/Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA)と混合し得る。次に免疫磁気ビーズを白血球枯濁赤血球画分とインキュベートする。ビーズ及び赤血球は22で穏やかに混合しながら60~90分間インキュベートし、続いて網赤血球が結合しているビーズを磁場を用いて単離する。単離網赤血球は、例えばDETAChABEAD(登録商標)溶液(Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA)を使用して磁気ビーズから取り外し得る。或いは、網赤血球は、本明細書に記載される方法を用いてCD34+造血幹細胞のインビトロ成長及び成熟から単離してもよい。

#### 【0316】

最終分化した除核赤血球は、そのDNA含量に基づき他の細胞と分離することができる。非限定的な例において、初めに細胞をバイタルDNA染色色素、例えばヘキスト33342(Invitrogen Corp.)で標識する。ヘキスト33342は、二本鎖

10

20

30

40

50

DNAに結合すると青色蛍光を発する細胞透過性核対比染色剤である。培養物中の未分化前駆細胞、マクロファージ又は他の有核細胞はヘキスト33342によって染色されるが、一方、除核赤血球はヘキスト陰性である。ヘキスト陽性細胞は、蛍光活性化セルソーター又は他の細胞選別技法を用いて除核赤血球と分離することができる。ヘキスト色素は、透析又は他の好適な方法によって単離赤血球から除去することができる。

【0317】

外因性抗原発現EHCの集団は、EHCの集団の核物質含量を減少させることによって精製し得る。例えば、EHCの集団中の除核率を増加させ、及び/又は除核された外因性抗原発現EHCの数を増加させ又は濃縮する。

【0318】

外因性抗原発現EHCの集団は、小分子、例えばアクチン阻害薬、例えばサイトカラシンA、B、C、D、E、F、H、Jと共にインキュベートし、次に遠心によって核物質を取り除くことができる。それに代えて又は加えて、外因性抗原発現EHCの集団は、漸減するサイズ制限フィルタに通過させて機械的に操作することにより核物質を取り除くことができる。外因性抗原発現EHCの集団はまた、核物質の除去を増加させるため、フィブロネクチンでコーティングされたプラスチック表面上でインキュベートし得る。一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、核物質の除去を増加させるため、間質細胞、例えばマクロファージとの共培養でインキュベートされる。

【0319】

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、5%超、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%、99.9%、又は99.9%超が除核されている。

【0320】

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは支持細胞、例えば付着間質細胞層とは共培養されない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、EHCを外因性抗原と接触させ且つEHCを分化させて外因性抗原を含む除核細胞の集団を得ることにより作成される。外因性抗原発現EHCの集団は、除核細胞を選択するための濃縮ステップ、例えば、重力分離、磁気又は蛍光選別、照射、有核細胞の中毒化などを用いず得られる。

【0321】

一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、本明細書に記載されるものなどの核物質の検出アッセイによって評価するとき、5%超、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%、99.9%、又は99.9%超が核物質を欠く外因性抗原発現EHCで構成される。

【0322】

一部の実施形態では、外因性抗原発現EHCによって呈示される外因性抗原ポリペプチドなどの外因性抗原の存在、生物学的活性及び/又は機能が評価される。多くの好適なアッセイが利用可能であり、当該技術分野において公知である。

【0323】

一実施形態において、外因性抗原は、外因性抗原発現EHCの表面上のポリペプチドである。この外因性抗原の存在は、限定はされないが、フローサイトメトリー、ウエスタンブロッティング、RT-PCR、ノーザンブロッティング、クームスロゼット形成(Combs rosetting)、質量分析法を含むアッセイによって評価することができる。一実施形態において、外因性抗原は、外因性抗原発現EHCの内部にあるポリペプチドである。この外因性抗原の存在は、限定はされないが、ウエスタンブロッティング、RT-PCR、ノーザンブロッティング、PCR、サザンブロッティング、質量分析法を含むアッセイによって評価することができる。

【0324】

10

20

30

40

50

一実施形態において、外因性抗原は、外因性抗原発現 E H C の表面上の核酸である。この外因性抗原の存在は、限定はされないが、フローサイトメトリー、相同蛍光プローブによるフローサイトメトリー、サザンブロットティング、ノーザンブロットティング、PCR を含むアッセイによって評価することができる。一実施形態において、外因性抗原は、外因性抗原発現 E H C の内部にある核酸である。この外因性抗原の存在は、限定はされないが、サザンブロットティング、ノーザンブロットティング、PCR を含むアッセイによって評価することができる。

【 0 3 2 5 】

一実施形態において、外因性抗原は、外因性抗原発現 E H C の表面上の小分子である。この外因性抗原の存在は、限定はされないが、フローサイトメトリー、質量分析法を含むアッセイによって評価することができる。一実施形態において、外因性抗原は、外因性抗原発現 E H C の内部にある小分子である。この外因性抗原の存在は、限定はされないが、質量分析法、蛍光分光法を含むアッセイによって評価することができる。

10

【 0 3 2 6 】

一実施形態において、外因性抗原は、外因性抗原発現 E H C の膜にある脂質である。この外因性抗原の存在は、限定はされないが、質量分析法、フローサイトメトリー、膜溶解度、蛍光偏光、空間光干渉顕微鏡法を含むアッセイによって評価することができる。

【 0 3 2 7 】

一実施形態において、外因性抗原は蛍光性であるか、又は蛍光分子に融合しているか、又は組換え核酸（例えばベクター中の）から GFP などの蛍光レポータータンパク質と共発現する。外因性抗原発現 E H C 内又はその上にある外因性抗原の存在は、限定はされないが、フローサイトメトリー、蛍光分光法、吸光度分光法を含むアッセイによって評価することができる。

20

【 0 3 2 8 】

一実施形態において、外因性抗原はガス状分子である。外因性抗原発現 E H C 内又はその上にある外因性抗原の存在は、限定はされないが、化学発光アッセイ、質量分析法を含むアッセイによって評価することができる。

【 0 3 2 9 】

外因性抗原発現 E H C 内又はその上にある外因性抗原の存在は、個々の E H C 上の外因性抗原の数を定量化する市販のサイトメトリーキャリブレーションビーズなどのキャリブレーションビーズを使用する定量的形式のフローサイトメトリーによって評価することができる。それに代えて又は加えて、外因性抗原発現 E H C 内又はその上にある外因性抗原の存在は、外因性抗原と同じ検出試薬を使用して検出可能な既知の濃度の標準を使用する定量的形式のウエスタンブロットによって評価することができ、このようにして個々の E H C 上の外因性抗原の数を定量化し得る。

30

【 0 3 3 0 】

一部の実施形態において、2つ以上の異なる外因性抗原の存在が、同じ又は異なる方法で、同時に、逐次的に、或いは並行して評価され得る。例えば、一実施形態において、表面上のある外因性抗原を、その外因性抗原に特異的な抗体を使用するフローサイトメトリーによって評価することができ、及び表面上にない、蛍光性の別の外因性抗原を、フロー

40

【 0 3 3 1 】

具体的な実施形態において、外因性抗原は、細胞供給源の最終分化後も外因性抗原発現 E H C に保持されている。例えば、外因性抗原発現 E H C が培養 E H C から作成され、細胞の最終分化後に外因性抗原の発現又は存在が、好適な方法、例えば、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、免疫沈降、蛍光分光法、化学発光、サザンブロット、ノーザンブロット、又は吸光度分光法によって評価される。

50

## 【 0 3 3 2 】

具体的な実施形態において、外因性抗原は、外因性抗原発現 E H C を対象に投与した後、インビボで循環した後も外因性抗原発現 E H C に保持されている。外因性抗原発現 E H C は、マウスなどの実験動物又は動物モデルに例えば尾静脈から静脈内注射することができ、又はヒトに静脈内注射される。次に血液が採取され、外因性抗原発現 E H C における外因性抗原の存在が好適なアッセイ、例えば、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、免疫沈降、蛍光分光法、化学発光、サザンブロット、ノーザンブロット、又は吸光度分光法によって評価される。

## 【 0 3 3 3 】

一部の実施形態では、外因性抗原発現 E H C 内又はその上の外因性抗原の生物学的活性、E H C の全体的な生物学的活性、及び E H C の集団の全体的な活性が、インビトロアッセイによって評価され得る。

10

## 【 0 3 3 4 】

一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C の活性は、モデル細胞株を使用して速やかに繰り返される。例えば、好適な外因性抗原のライブラリをモデル細胞株、例えば H E K 2 9 3 T 又は K 5 6 2 で発現させて、好適なアッセイにより活性を評価する；次に最良の外因性抗原候補、例えば好適なアッセイにおいて最も高いレベルで発現するもの又は最も高い活性を示すものを、例えば培養 E H C で発現させて、外因性抗原発現 E H C を作成する。

## 【 0 3 3 5 】

一実施形態において、外因性抗原発現 E H C の活性は、培養マウスモデルを使用して速やかに繰り返される。例えば、好適な外因性抗原のライブラリを培養マウス E H C で発現させて；好適なマウス疾患モデル又は活性を評価するのに好適なマウスモデルシステムで活性を評価し；次に、最良の外因性抗原候補、例えば好適なアッセイにおいて最も高いレベルで発現するもの又は最も高い活性を示すものを、例えば培養 E H C で発現させて、外因性抗原発現 E H C を作成する。

20

## 【 0 3 3 6 】

場合によっては、外因性抗原は酵素であり、外因性抗原の活性は、特定の基質分子の消失を検出するか、又は特定の産物分子の出現を検出する酵素アッセイによって評価することができる。かかるアッセイには、限定はされないが、比色アッセイ、質量分析法、H P L C、蛍光アッセイが含まれる。

30

## 【 0 3 3 7 】

例えば、a) 外因性抗原はアデノシンデアミナーゼ ( A D A ) であり、酵素アッセイではアデノシンからイノシンへの変換が検出される；b) 外因性抗原はフェニルアラニンヒドロキシラーゼ ( P A H ) であり、アッセイではフェニルアラニンからチロシンへの変換が検出される；c) 外因性抗原はフェニルアラニンアンモニアリアーゼ ( P A L ) であり、アッセイではフェニルアラニンからトランスケイ皮酸への変換が検出される；d) 外因性抗原はチミジンホスホリラーゼ ( T P ) であり、アッセイではチミジンからチミン及び 2 - デオキシ - リボースへの変換が検出される；e) 外因性抗原はプリンヌクレオシドホスホリラーゼ ( P N P ) であり、アッセイではイノシンからヒポキサンチンへの変換、アデノシンからアデニンへの変換、及びグアノシンからグアニンへの変換が検出される；f) 外因性抗原はホモゲンチジン酸 1 , 2 - ジオキシゲナーゼ ( H D G ) であり、アッセイではホモゲンチジン酸からマレイルアセト酢酸への変換が検出される；g) 外因性抗原はシスタチオニン シンターゼであり、アッセイではセリン及びホモシステインからシスタチオニンへの変換が検出される；h) 外因性抗原はシュウ酸オキシダーゼであり、アッセイではシュウ酸塩の酸化が検出される。

40

## 【 0 3 3 8 】

一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C の活性は、疾患、例えば代謝疾患又は酵素欠損症の動物モデル、例えばマウスモデル、及び免疫不全マウス、又は N S G マウス、又は外因性抗原発現 E H C の効果を実証し得るもの、例えば基質が注入され且つ外因性

50

抗原媒介性変換産物が計測されるマウスで評価される。

【0339】

一実施形態において、外因性抗原は、補体受容体1 (CR1) ポリペプチド、その誘導体又は機能断片である。CR1外因性抗原の活性は、例えば、CR1外因性抗原による免疫複合体の特異的捕捉、マクロファージへの免疫複合体の効率的なトランスファー、又はマウスからの免疫複合体のインビボクリアランスを含め、幾つかの方法で評価することができる。

【0340】

CR1外因性抗原を過剰発現するEHCの機能性は、以下の1つ以上のプロセスによって評価し得る：CR1外因性抗原を含むEHC表面上への免疫複合体の捕捉、CR1外因性抗原を含むEHCは保持しておく一方でのマクロファージに対する免疫複合体の放出、及びCR1外因性抗原を含むEHCの適切な循環。これらの3つのパラメータはインビトロで評価することができる。免疫複合体捕捉アッセイは、当該技術分野において、例えば Oudin et al., J Immunol 2000 及び Schifferli et al., J Immunol 1991 に記載されている。例えば、天然CR1又はCR1外因性抗原ポリペプチド又はその断片を発現するEHCと共に標識免疫複合体をインキュベートし、EHCによって捕捉される免疫複合体の数をフローサイトメトリーによってアッセイする。マクロファージトランスファーアッセイは、当該技術分野において、例えば、Kuhn et al., J Immunol 1998 に記載されている。例えば、天然CR1又はCR1外因性抗原ポリペプチド又はその断片を発現する赤血球に負荷された標識免疫複合体をマクロファージと共にインキュベートする。赤血球表面からマクロファージへの免疫複合体のトランスファー、及びマクロファージによる赤血球の消費又は回避をフローサイトメトリーによって計測することができる。適切な循環は、EHCの形態及び変形能を分析することによって予測し得る。天然CR1又はCR1外因性抗原ポリペプチド又はその断片を発現するEHCの形態は、例えば Giarratana et al., Blood 2011 及び Repik et al., Clin Exp Immunol 2005 によって記載されるとおり、標準的な顕微鏡技法を用いて目測で評価することができる。天然CR1又はCR1外因性抗原ポリペプチド又はその断片を発現するEHCの変形能は、例えば Giarratana et al., Blood 2011 に記載されるとおり、レーザー支援旋光細胞分析 (laser-assisted optical rotational cell analysis: LORCA) としても知られるエクタサイトメトリーによって評価することができる。

【0341】

例えば、外因性CR1抗原発現EHC (このEHCはCR1ポリペプチド外因性抗原を含む) が免疫複合体、例えばインビトロで作成された免疫複合体又は患者に由来する免疫複合体と共にインキュベートされる。CR1外因性抗原による免疫複合体の捕捉が、例えば、免疫複合体中の蛍光マーカースを使用するフローサイトメトリーによるか又は免疫複合体のエレメントに対する二次検出剤を使用するフローサイトメトリーによって評価される。

【0342】

一実施形態では、初めに外因性CR1抗原発現EHCが免疫複合体と共にインキュベートされ、次にマクロファージ、例えば、初代マクロファージ、初代単球、培養マクロファージ、培養単球、U937細胞、PMA活性化U937細胞、AA9細胞、RAW 264.7細胞、J774細胞、THP1細胞、KG-1細胞、NR8383細胞、MV-4-11細胞、3D4/31細胞、MD細胞、Fcwf-4細胞、DH82細胞と共にインキュベートされる。外因性CR1抗原発現EHCによってトランスファーされた免疫複合体の存在に関して、マクロファージが例えばフローサイトメトリー又はX線撮影によって評価される。培養EHCからマクロファージへの捕捉免疫複合体のトランスファーは、当該技術分野の標準アッセイである。例えば：Repik et al. 2005 Clin Exp Immunol. 140:230; Li et al. 2010 Infe

10

20

30

40

50

ction Immunity 78(7):3129を参照されたい。

【0343】

一実施形態において、外因性CR1抗原発現EHCの活性は動物モデルで評価される。例えば、免疫不全マウス、又はNSGマウスなどの好適なマウスモデルを使用し得る。マウス疾患モデルは、例えばループスなどの免疫複合体病であってもよい。マウスモデルには、NZBWF1/J、MRL/MpJ、MRL/MpJ-Fas(lpr)、Smn.C3-Fas1/J、NZM2410/Aeg、129S4-Cd48、Cg-Sle1、NZM-Sle1 Sle2 Sle3/LmoJ、及びBXSb.129P2が含まれる。それに代えて又は加えて、例えば免疫複合体の注入により、マウスに疾患表現型が導入されてもよい。外因性CR1抗原発現EHCを任意の好適なマウス(又は他の動物モデル)に注入して、EHCの1つ以上の生物学的作用、例えば外因性CR1抗原発現EHCによる注入された免疫複合体のクリアランスを試験し得る。

10

【0344】

一実施形態において、外因性抗原は補体調節分子であり、又は補体調節活性を有する。外因性抗原のこの活性は、インビトロアッセイ及びインビボアッセイの両方で評価することができる。例えば、外因性抗原の活性は、インビトロ補体活性化アッセイ、例えば感作ヒツジ赤血球の補体媒介性溶解を計測するCH50アッセイ、又は非感作ウサギ赤血球の第二経路補体媒介性溶解を計測するAH50アッセイにおいて低下を計測することによって評価し得る。或いは、外因性抗原の活性は、限定はされないが、例えば、組換えC2からC2a及びC2bへの切断、B因子からBa因子及びBb因子への切断、C3b因子からiC3bH及びiC3bLへの切断、C3bBbからC3b及びBbへの切断、C4bBbからC4b及びBbへの切断、又はC4b因子からiC4bH及びiC4bLへの切断を含めた、外因性抗原と共にインキュベートされた組換え補体成分の切断又は切断が存在しないこと(ネオエピトープに曝露されても又は曝露されなくてもよい)を検出して評価し得る。好適な組換え補体成分の切断又は切断が存在しないことは、限定はされないが、例えば、クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ELISA、及びウエスタンブロッティングを含めた当該技術分野において公知のタンパク質分析方法によって評価することができる。外因性抗原活性に好適なインビボアッセイは、動物、例えばマウスへの外因性抗原発現EHCの注入、及び組織染色法による補体因子、例えば膜侵襲複合体の沈着の調査を含む。

20

30

【0345】

一実施形態において、外因性抗原は標的を結合又は捕捉する能力を有し、外因性抗原の活性は、インビトロ又はインビボで外因性抗原に捕捉された標的を検出することによって評価し得る。

【0346】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCはインビトロで標的と共にインキュベートされ、限定はされないが、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、磁気分離、X線撮影、コロニー形成アッセイ、顕微鏡法を含めたインビトロアッセイを用いて外因性抗原による標的の捕捉が検出される。

【0347】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCはインビトロで標的と共にインキュベートされ、限定はされないが、例えば、オプソニン化外因性抗原発現EHCのマクロファージ消費アッセイ、T細胞活性化アッセイ、B細胞刺激アッセイ、マスト細胞脱顆粒アッセイ、感染性潜在能力アッセイを含めたインビトロ共培養アッセイを用いて外因性抗原による標的の捕捉が検出される。

40

【0348】

ある実施形態において、外因性抗原発現EHCはインビトロで標的と共にインキュベートされ、限定はされないが、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、磁気分離、X線撮影、コロニー形成アッセイ、顕微鏡法を含めたインビトロアッセイを用いて捕捉された標的の放出速度又はオフ速度が計測される。

50

## 【0349】

外因性抗原発現 EHC による標的の捕捉は、例えば、標的がマウスに天然に存在するマウス疾患モデルを含めた動物において、インビボアッセイでアッセイすることができる。好適な疾患としては、細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、免疫複合体病、自己抗体疾患、高脂血症、高血糖症が挙げられる。他のマウスモデルでは、標的がマウスに外部から、例えば注射によるか又は摂餌によって投与される。これらのアッセイでは、外因性抗原発現 EHC による標的捕捉のアッセイは、動物、例えば血漿、組織を標的の減少又は保持に関して調べることによるか、或いは動物から、例えば血液、血漿、組織から外因性抗原発現 EHC を単離又は採取し、且つ限定はされないが、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、磁気分離、X線撮影、コロニー形成アッセイ、顕微鏡法を含めたインビトロアッセイを用いて外因性抗原上の標的の存在をアッセイすることにより行われる。

10

## 【0350】

一部の実施形態において、外因性抗原は標的を結合又は捕捉してインビボでの標的のクリアランスを実質的に増加させる能力、又は循環中の標的の濃度を実質的に低減する能力を有する。外因性抗原発現 EHC 上の外因性抗原の活性は、インビトロ又はインビボでの標的のクリアランスの亢進を検出することによって評価し得る。

## 【0351】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC はインビトロで標的と共にインキュベートされ、限定はされないが、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、磁気分離、X線撮影、コロニー形成アッセイ、顕微鏡法を含めたインビトロアッセイを用いて外因性抗原による標的の捕捉が検出される。続いて、外因性抗原発現 EHC は、クリアランスを促進することが知られている細胞、例えばマクロファージ又は単球と共に共培養アッセイでインキュベートされ、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、磁気分離、X線撮影、コロニー形成アッセイ、顕微鏡法によって標的及び外因性抗原発現 EHC のクリアランスが評価される。

20

## 【0352】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC はインビトロで標的と共にインキュベートされ、限定はされないが、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、磁気分離、X線撮影、コロニー形成アッセイ、顕微鏡法を含めたインビトロアッセイを用いて外因性抗原による標的の捕捉が検出される。続いて、外因性抗原発現 EHC は、インビボでの EHC のクリアランス機構を模倣する物理的システム、例えば人工脾臓、マイクロチャネル、充填カラム、樹脂、組織外植片、遠心機においてインキュベートされ、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、磁気分離、X線撮影、コロニー形成アッセイ、顕微鏡法によって標的及び外因性抗原発現 EHC のクリアランスが評価される。

30

## 【0353】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC による標的のクリアランスは、例えば、標的がマウスに天然に存在する、疾患、例えば細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、免疫複合体病、自己抗体疾患、高脂血症、高血糖症のマウスモデル、又は例えば、標的がマウスに外部から、例えば注射によるか又は摂餌によって投与されるマウスモデルを例えば含めた動物におけるインビボアッセイでアッセイされる。これらのアッセイでは、外因性抗原発現 EHC による標的クリアランスのアッセイが、動物、例えば血漿、組織を標的の減少に関して調べることによるか、或いは動物から、例えば血液、血漿、組織から外因性抗原発現 EHC を単離又は採取し、且つ限定はされないが、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、磁気分離、X線撮影、コロニー形成アッセイ、顕微鏡法を含めたインビトロアッセイを用いて外因性抗原上の標的の存在をアッセイすることにより行われる。

40

## 【0354】

一部の実施形態において、外因性抗原発現 EHC は、好適な外因性抗原を特定の細胞内コンパートメント、例えばリソソームに送達する能力を有する。

## 【0355】

50



例えば、外因性抗原は、標的細胞、例えばマクロファージのリソソームコンパートメントに送達され得る。標的細胞のリソソームコンパートメントへの外因性抗原の送達の成功は、顕微鏡法及び蛍光外因性抗原又は蛍光外因性抗原検出剤に対応する点状スポットの検出によって評価される。それに代えて又は加えて、標的細胞のリソソームコンパートメントへの外因性抗原の送達の成功は、顕微鏡法及び蛍光外因性抗原検出剤と既知のリソソームマーカ、例えばリソトラッカー (lysotracker) LAMP-1 に対する蛍光検出剤との共局在によって評価される。

【0356】

一部の実施形態において、外因性抗原は、リソソーム蓄積症の遺伝子型又は表現型を呈する細胞又はリソソーム蓄積症患者に由来する細胞のリソソームに蓄積した毒性成分を分解することのできる酵素である。例えば、外因性抗原は、細胞内に蓄積した毒性物質を分解して細胞表現型をレスキューし、例えば細胞死を防ぐ能力を有する。

10

【0357】

外因性抗原発現 EHC の集団は、EHC が複製不能であること、EHC が血管系を通じて安全に循環可能であること、及び EHC に免疫原性がないことに関して評価し得る。

【0358】

一部の実施形態において、外因性抗原発現 EHC の集団の安全性は、好適なインビトロ又はインビボアッセイを用いて EHC の集団の複製能力を計測することにより評価される。例えば、外因性抗原発現 EHC の実質的な自己複製不能性の試験は、a) 免疫不全マウスへの注入時に実質的に腫瘍を形成不能であること；b) 軟寒天での培養時に実質的にコロニーを形成不能であること；c) チミジン取込みアッセイにおいて実質的にチミジンを取り込み不能であること；d) 蛍光レポーターをコードする DNA をトランスフェクトしたときに実質的に陽性シグナルがない、例えば、10%未満、1%、0.1%、0.01%、0.001%、1 ppm、100 ppb、10 ppb、1 ppb、100 ppt、10 ppt、1 ppt、又は 1 ppt 未満の陽性シグナルであること；e) 核色素で染色したときに実質的に陽性シグナルがない、例えば、10%未満、1%、0.1%、0.01%；及び 0.001%、1 ppm、100 ppb、10 ppb、1 ppb、100 ppt、10 ppt、1 ppt、又は 1 ppt 未満の陽性シグナルであること；f) 血液系悪性腫瘍の細胞マーカー、例えば、CKIT、CD34、EpCam で染色したときに実質的に陽性シグナルがない、例えば、10%未満、1%、0.1%、0.01%、0.001%、1 ppm、100 ppb、10 ppb、1 ppb、100 ppt、10 ppt、1 ppt、又は 1 ppt 未満の陽性シグナルであることを含む。特定の実施形態において、実質的な量の複製核酸を含有しない外因性抗原発現 EHC が提供される。

20

30

【0359】

一部の実施形態において、外因性抗原発現 EHC の集団の安全性は、投与された EHC が実質的な血管閉塞又は凝固カスケードの誘導を引き起こすことなくインビボで (対象の循環系において) 循環する能力を計測することにより評価される。任意選択で、外因性抗原発現 EHC の循環薬物動態が評価されてもよい。

【0360】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC の循環薬物動態は、マウスなどの動物に EHC を静脈内注射することによって評価される。マウスは NSG (nod-SCID-) 免疫不全マウスであってもよい。マウスには、マクロファージを枯渇させた後、例えばヒト赤血球の腹腔内注射によるか、又はクロドロネートリポソームの静脈内注射によって EHC を注射する。外因性抗原発現 EHC は、蛍光色素、例えば CFSE で標識することができる。EHC の注射後、血液を採取し、残存する外因性抗原発現 EHC の数を、例えばフローサイトメトリー、ウエスタンブロットによって評価し、これらのデータから外因性抗原発現 EHC のクリアランス速度を推定する。外因性抗原発現 EHC と同じ動物モデルにヒト赤血球を注射することができ、EHC 及びヒト赤血球のクリアランス速度を比較する。

40

【0361】

50

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC による凝固カスケードの活性化リスクがインビトロアッセイで評価される。一実施形態では、外因性抗原発現 EHC をヒト血液とインキュベートし、カオリン、負電荷リン脂質、及びカルシウムの存在下で凝固に要する時間を計測することによるか（活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) 試験) (例えば、Exner and Rickard, Biomedicine 1977 27 (2) : 62 を参照)、又はトロンボプラスチン及びカルシウムの存在下で凝固に要する時間を計測することによって (プロトロンビン時間 (PT) 試験) (例えば、Jacques and Dunlop 1945, Am J Physiol 145 : 67 を参照) 凝固カスケード活性化を評価する。aPTT 試験の正常範囲は約 25 ~ 38 秒である。PT 試験の正常範囲は約 10 ~ 12 秒である。

10

## 【0362】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC によって引き起こされる任意の有害事象が、動物に EHC を静脈内注射し、及び凝固カスケードの活性化を評価することによって評価される。凝固カスケードの誘導レベルの評価は、血液を採取し、血漿中の凝固カスケード成分のレベルを例えばウエスタンブロット又は ELISA で評価することによって行われる。凝固カスケード成分は、典型的にはフィブリノゲン崩壊産物、例えばフィブリノペプチド A 及びフィブリノペプチド B である。例えば、凝固カスケード誘導レベルの評価は、血液を採取し、血小板活性化アッセイによって血漿中の凝血活性レベルを評価すること、例えば、血漿を血小板と共にインキュベートし、及び例えば活性化マーカーの染色、例えば PAC-1、CD62p、又は CD40L の染色によるフローサイトメトリーで血小板の活性化を評価することによって行われる。

20

## 【0363】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC によって引き起こされる任意の有害事象が、動物に EHC を静脈内注射し、炎症経路の活性化を評価することによって評価される。炎症レベルの評価は、血液を採取し、及び血漿中の炎症性サイトカインレベルを例えばウエスタンブロット又は ELISA で評価することによって行われ得る。一実施形態において、炎症性サイトカイン (cytokine) は、インターフェロン、腫瘍壊死因子、又は IL-12 断片 p70 である。

## 【0364】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC によって引き起こされる任意の有害事象が、動物に EHC を静脈内注射し、組織、例えば、肝臓、脾臓、心臓、肺、脳、皮膚、腎臓の状態を評価することによって評価される。組織の状態は、肉眼的剖検、組織解剖、組織染色、及び顕微鏡画像法によって評価することができる。

30

## 【0365】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC が実質的な血管閉塞又は凝固カスケードの活性化を引き起こすことなくインビボで循環する能力は、EHC の変形能を計測することによって評価される。外因性抗原発現 EHC の変形能はインビトロアッセイを用いて評価する。例えば、このアッセイは、浸透圧脆弱性アッセイである。外因性抗原発現 EHC の機械的脆弱性は、クエット型せん断システムにおいてずり応力に回答した構造的完全性を計測することによって評価し得る。一実施形態において、外因性抗原発現 EHC の変形能はエクタサイトメーターを使用して評価する。一実施形態において、外因性抗原発現 EHC の変形能は、レーザー支援旋光セルアナライザー (LORCA) 機器を使用してレーザー回折で限定圧力における伸び指数を計測することによって評価する。一実施形態において、外因性抗原発現 EHC の変形能は、マイクロ流体装置において一定圧力で限定寸法の一連のマイクロスケール狭窄部を通り抜ける通過時間を計測することによって評価する。一実施形態において、外因性抗原発現 EHC の変形能は、マイクロ流体装置において一定圧力で限定寸法の一連のマイクロスケール狭窄部を通過することによる生存率を計測することによって評価する。マイクロ流体装置は、以下に挙げるもの、即ち、限定はされないが、マイクロスケール狭窄部を有するポリジメチルシロキサン (PDMS) チップ (例えば、Hoelzle et al. J Vis Exp 2014 91 : e51474

40

50

) ; 漏斗形狭窄部を有するチップ (例えば、Guo et al. Lab Chip 2012 12 : 1143) ; ピラーを有するPDMSチップ (例えば、Zhang et al. PNAS 2012 109 (46) : 18707) ; 又はインビトロ人工脾臓マイクロビーズ充填カラム (Guillaume DePlaine et al. , Blood 2011 , 117 (8) ) のうちの1つから選択することができる。

【0366】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCが実質的な血管閉塞又は凝固カスケードの活性化を引き起こすことなくインビボで循環する能力は、EHCの血管閉塞を計測することにより評価される。外因性抗原発現EHCの血管閉塞はインビトロアッセイを用いて評価することができる。例えば、外因性抗原発現EHCの血管閉塞はエキソビボアッセイを用いて評価される。外因性抗原発現EHCを基準ヒト赤血球と1:1比でインキュベートし、Rh不適合血液による基準アッセイと比較した多細胞ロゼットの誘導を光学顕微鏡法によって評価する。外因性抗原発現EHCの血管閉塞は、流動条件下におけるヒト血管内皮細胞に対するEHCの付着を計測することによって評価される。例えば、Kaul DK, Finnegan E, and Barabino GA (2009) Microcirculation 16 (1) : 97 - 111を参照されたい。それに代えて又は加えて、血管閉塞は、ラット血管内皮のエキソビボ灌流アッセイにおける末梢抵抗単位 (PRU) の増加を計測することによって評価される。例えば、Kaul, Fabry and Nagel, PNAS 1989, 86 : 3356を参照されたい。さらに、血管閉塞は、生体内顕微鏡法によって評価される。例えば、Zennadi et al. 2007 Blood 110 (7) : 2708を参照されたい。血管閉塞はまた、インビトロで段階的な高さの流動チャンバにおけるEHCの流量及び付着を計測することによって評価されてもよい。例えば、Zennadi et al 2004, Blood 104 (12) : 3774を参照されたい。

【0367】

一実施形態では、外因性抗原発現EHCの集団の安全性が、好適なインビトロ又はインビボアッセイを用いてEHCの集団の免疫原性を計測することによって評価される。

【0368】

例えば、外因性抗原発現EHCの集団は、a) 意図されるレシピエント対象の血清を使用したクームス試験において凝集を生じさせず、又はb) ヒトプール血清を使用したクームス試験において凝集を生じさせない。

【0369】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、優勢な血液型抗原に関して遺伝子型を同定してレシピエントの血液型抗原遺伝子型に適合させた前駆細胞に由来する。

【0370】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、インシリコT細胞エピトープ予測アルゴリズムによって予測されるT細胞反応性が10%未満、1%、0.1%、0.01%、0.001%、又は0.001%未満である外因性抗原又は他の外因性タンパク質を含む。

【0371】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCの集団は、インビトロT細胞活性化アッセイ、例えば、Antitope Inc. EpiScreenアッセイにおける反応性が10%未満、1%、0.1%、0.01%、0.001%、又は0.001%未満である外因性抗原又は他の外因性タンパク質を含む。

【0372】

例えば、赤血球から誘導される外因性抗原発現EHCは、それを必要としている対象に注入するため、遠心し、適切な溶液 (例えば、標準AS-3溶液) に再懸濁することができる。一実施形態において、注入される外因性抗原発現EHCはレシピエントと同じABO型を有し、注入に伴う免疫反応のリスクが最小限に抑えられる。外因性抗原発現EHCはまた、前処理して血液型特異的抗原を除去するか、又は他の方法で抗原性を低下さ

10

20

30

40

50

せることもできる。このために好適な方法としては、限定はされないが、米国特許出願公開第20010006772号明細書及び同第20030207247号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0373】

治療組成物

有効レベルの目的の外因性抗原を有するEHCを含有する組成物が提供される。かかる組成物は、複数のEHC、例えば、 $1 \times 10^3$ 個の細胞、又は $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 個、又は $1 \times 10^{12}$ 個超の細胞を含有する。本発明のEHCは、例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は90%超の質量対体積比(%m/v)の濃度の生理食塩水中の濃厚赤血球として投与することができる。患者への投与時間は10分~4時間の範囲であるか、又はそれを上回ってもよい。

10

【0374】

本発明の培養EHCは、適切な緩衝液、例えば、抗凝固クエン酸デキストロースA(ACD-A)、クエン酸リン酸デキストロース(CPD)、クエン酸リン酸デキストロースデキストロース(CP2D)、又はクエン酸リン酸デキストロースアデニン(CPDA-1)などのFDA承認済みの抗凝固保存溶液中に保存することができる。本組成物は最長21日間保存し得る。

【0375】

或いは、本発明の培養EHCは、認可された添加剤溶液、例えば、AS-1(Adsol)、AS-3(Nutricel)、AS-5(Optisol)、又はAS-7(SOLX)中に保存することができる。

20

【0376】

或いは、本発明の培養EHCは、グリセロール凍結保護溶液中に保存することができる。組成物は凍結して最長10年間保存し得る。凍結細胞は使用前に解凍し、例えば0.9%塩化ナトリウムによる連続洗浄ステップによって脱グリセロール化し得る。

【0377】

ヒト及びマウス赤血球の寿命(それぞれ120日及び50日(例えば、Khandelwal et al., Transfusion 2007を参照))を考えると、人工赤血球の加齢を刺激して抗原提示細胞による食作用を増加させることが有利であり得る。循環からの赤血球除去の最も重要な生理学的機構は、それぞれカルシウムイオノフォア又はBS3化学処理によって人工的に誘導されるホスファチジルセリンの外在化(Schroit et al., J Biol Chem 1985)又はバンド3タンパク質クラスター形成(Kay, PNAS 1975; Turrini et al., J Biol Chem 1991)など、RBC細胞表面上の新規抗原部位に曝露された後に免疫が介在するものである(Singer et al., PNAS 1986)。

30

【0378】

本発明の培養EHCは、例えばカルシウムイオノフォア又はBS3などの食作用誘導剤で処理し得る。本発明の複数の培養EHCは、例えばカルシウムイオノフォア又はBS3などの食作用誘導剤で処理されたEHCを含んでもよく、それにより、対象への投与時に本発明の複数の培養EHCがポラスとしてでなく例えば1日又は数日の間に連続的に異なる速度で取り込まれるように、時間の長さを異ならせることができる。

40

【0379】

本明細書には、目的の外因性抗原を含む複数の培養EHCを含む組成物及び医薬組成物が提供される。本組成物及び医薬組成物は、例えば抗凝固クエン酸デキストロースAなどの適切な保存緩衝剤の溶液を含み得る。目的の外因性抗原を含む複数の培養EHCを含む組成物及び医薬組成物は、例えばAdsolなどの認可された添加剤をさらに含み得る。目的の外因性抗原を含む複数の培養EHCを含む組成物及び医薬組成物は、凍結保存用にグリセロール凍結保護溶液をさらに含み得る。

【0380】

50

本明細書には、表F、表G、表H、表I及び表Jの抗原の1つ以上から選択される目的の外因性抗原、例えば、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、膵細胞抗原、インスリン、フラジェリン、グルテン、2Sアルブミン、ヒアラウロニダーゼ(hyaluronidase)、第VII因子、第IX因子、及び抗TNF $\alpha$ 、アデノシンデアミナーゼ、L-アスパラギナーゼ、ラスプリカーゼ、抗胸腺細胞グロブリン、L-アルギナーゼ、L-メチオナーゼ、プレプロインスリン、プロインスリン、インスリン、GAD65、GAD67、IA-2、A-2、チログロブリン、甲状腺ペルオキシダーゼ、サイトロピン受容体、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、プロテオリピドタンパク質、II型コラーゲン、IV型コラーゲン、アセチルコリン受容体、マトリックスメタロプロテイン1及び3、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、PDGF受容体 $\alpha$ 、PDGF受容体 $\beta$ 、核タンパク質SS-A、コンアラキン(Ara h 1)、アレルゲンII(Ara h 2)、アラキス凝集素(Ara h 6)、 $\alpha$ -ラクトアルブミン(ALA)、ラクトトランスフェリン、グルテン、低分子量グルテン、 $\alpha$ -グリアジン、 $\beta$ -グリアジン、ホルデン、セカリン、アベニン及びそれらの組み合わせなどを含むEHCが提供される。目的の外因性抗原を含む複数のEHCは、組成物又は医薬組成物として提供され得る。

10

#### 【0381】

本明細書には、任意選択で表Cの内因性赤血球タンパク質の1つに融合した、表F、表G、表H、表I及び表Jの1つ以上の抗原、例えば、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、膵細胞抗原、インスリン、フラジェリン、グルテン、Ara h 2、2Sアルブミン、ヒアラウロニダーゼ(hyaluronidase)、第VII因子、第IX因子、及び抗TNF $\alpha$ などをコードする発現ベクターが提供される。

20

#### 【0382】

本明細書には、対象への投与に好適である、外因性抗原発現EHCを含む医薬組成物が提供される。本医薬組成物は、概して外因性抗原発現EHCの集団と薬学的に許容可能な担体とを対象への投与に好適な形態で含む。薬学的に許容可能な担体は、一部には、投与される詳細な組成物によって決まると共に、組成物の投与に用いられる詳細な方法によっても決まる。従って、外因性抗原発現EHCの集団を含む医薬組成物の好適な製剤は多種多様である(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18th ed. (1990)を参照)。本医薬組成物は、概して、無菌で実質的に等張性の、且つ米国食品医薬品局(U.S. Food and Drug Administration)の医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準(GMP)の全ての規則に完全に準拠したものとして製剤化される。

30

#### 【0383】

薬学的に許容可能な賦形剤には、動物への使用並びにヒト医薬品としての使用が許容される賦形剤を含めた、概して安全で非毒性の望ましい賦形剤が含まれる。かかる賦形剤は固体、液体、半固体であってもよく、又はエアロゾル組成物の場合には気体であってもよい。

40

#### 【0384】

担体又は希釈剤の例としては、限定はされないが、水、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。薬学的に活性な物質におけるかかる媒体及び化合物の使用は、当該技術分野において周知である。任意の従来の媒体又は化合物が本明細書に記載される外因性抗原発現EHCと不適合である場合を除き、組成物中におけるその使用が企図される。組成物中には補助的治療剤もまた配合され得る。典型的には、医薬組成物は、その意図される投与経路と適合するように製剤化される。外因性抗原発現EHCは、非経口、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、皮内、経皮、直腸、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内；筋肉内経路によるか又は吸入薬として投与することができ

50

る。外因性抗原発現 E H C は、任意選択で、外因性抗原発現 E H C が対象とする疾患、障害又は病態の治療に少なくとも部分的に有効な他の治療剤と併用して投与することができる。

#### 【 0 3 8 5 】

非経口、皮内、又は皮下適用に用いられる溶液又は懸濁液は、以下の成分を含み得る：注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール類、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗細菌化合物；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（E D T A）などのキレート化合物；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝剤、及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの張性調整化合物。p H は、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整することができる。非経口製剤は、ガラス製又はプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ又は複数用量バイアルに封入することができる。

10

#### 【 0 3 8 6 】

注射剤としての使用に好適な医薬組成物は、滅菌注射用溶液又は分散液を即時調合するための滅菌水溶液（水溶性の場合）又は分散液及び滅菌粉末を含む。静脈内投与に関して、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parsippany, N. J.）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が挙げられる。いずれの場合にも、組成物は無菌でなければならず、且つ容易な通針性が存在する程度に流体でなければならない。組成物は製造及び貯蔵条件下で安定していなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びこれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用し、分散液の場合には要求される粒度を維持し、及び界面活性剤を使用することによって維持し得る。微生物作用の防止は、様々な抗細菌及び抗真菌化合物、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって実現し得る。多くの場合、組成物中に等張化合物、例えば、糖類、多価アルコール類、例えばマニトール（mannitol）、ソルビトール、塩化ナトリウムなどを含めることが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる化合物、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中に含めることによってもたらされ得る。

20

30

#### 【 0 3 8 7 】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて本明細書に列挙される成分の1つ又は組み合わせと共に適切な溶媒中に有効量の外因性抗原発現 E H C を配合することによって調製し得る。概して、塩基性分散媒及び他の任意の所望の成分を含有する無菌媒体中に外因性抗原発現 E H C を配合することにより、分散液が調製される。滅菌注射用溶液の調製用滅菌粉末の場合、調製方法は真空乾燥及び凍結乾燥であり、活性成分に任意の追加的な所望の成分が加わった粉末が、その予め滅菌ろ過した溶液から生じる。外因性抗原発現 E H C は、外因性抗原発現 E H C、その1つ又は複数の外因性抗原及び/又はその任意選択の1つ又は複数のペイロードの持続放出又はパルス放出が可能となるように製剤化し得るデポー注射又は植込み製剤の形態で投与することができる。

40

#### 【 0 3 8 8 】

経口組成物は、概して不活性希釈剤又は食用担体を含む。経口組成物はゼラチンカプセルに封入してもよく、又は錠剤に圧縮してもよい。経口治療薬の投与には、外因性抗原発現 E H C は賦形剤と配合して、錠剤、トローチ、又はカプセルの形態で使用することができる。経口組成物はまた、洗口剤としての使用向けに流体担体を使用して調製することもでき、ここで流体担体中の化合物は口内に適用され、うがいされて吐き出されるか、又は飲み込まれる。組成物の一部として、薬剤適合性を有する結合化合物、及び/又は補助材料を含めることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、以下の成分の任意のもの、又は類似した性質の化合物を含有し得る：微結晶性セルロース、トラガカントゴム

50

又はゼラチンなどの結合剤；デンプン又はラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、プリモゲル（Primogel）、又はコーンスターチなどの崩壊化合物；ステアリン酸マグネシウム又はステロテス（Sterotes）などの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの滑剤；スクロース又はサッカリンなどの甘味化合物；又はペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ香料などの香味化合物。

【0389】

吸入による投与には、外因性抗原発現 EHC は、好適な噴射剤、例えば二酸化炭素などのガスを含む加圧容器若しくはディスペンサー、又はネブライザーからエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0390】

外因性抗原発現 EHC を含む組成物の全身投与もまた、経粘膜的又は経皮的手段によることができる。経粘膜又は経皮投与については、製剤中に、透過を図る関門に適切な浸透剤が使用される。かかる浸透剤は概して当該技術分野において公知であり、例えば経粘膜投与に関して、デタージェント、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は鼻腔内スプレー又は坐薬を使用して達成することができる。経皮投与には、修飾赤血球は概して当該技術分野において公知のとおり軟膏（ointment）、軟膏（salve）、ゲル、又はクリームに製剤化される。

【0391】

外因性抗原発現 EHC はまた、直腸送達用の坐薬（例えば、ココアバター及び他のグリセリド類などの従来の坐剤基剤を含む）又は停留浣腸の形態の医薬組成物として調製することもできる。

【0392】

一部の実施形態において、外因性抗原発現 EHC は、外因性抗原発現 EHC が対象の体から排出される速度を低下させ得る担体と共に調製される。例えば、インプラント及びマイクロカプセル化送達システムを含め、制御放出製剤が好適である。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル類、及びポリ乳酸など、生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。かかる製剤の調製方法は、当業者には明らかであろう。材料はまた、Alza Corporation 及び Nova Pharmaceuticals, Inc. から市販品を入手することもできる。

【0393】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC を含む医薬組成物は、その医薬組成物の利益を受け得る対象に静脈内投与される。他の実施形態において、本組成物は、例えばリンパ内注射、又は節内注射（例えば、Senti et al., 2008 PNAS 105(46):17908 を参照）、又は筋肉内注射、皮下投与、胸腺内若しくは肝臓内への直接の注射によってリンパ系に投与される。

【0394】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC を含む医薬組成物は液体懸濁物として投与される。一実施形態において、本医薬組成物は、投与後にデポーを形成する能力を有し、且つ好ましい実施形態では外因性抗原発現 EHC を循環中にゆっくりと放出するか、又は好ましい実施形態ではデポー形態のまま留まる凝固製剤（coagulated formulation）として投与される。

【0395】

一実施形態において、外因性抗原発現 EHC を含む医薬組成物は、外因性抗原発現 EHC の生存能を維持可能な方法及び緩衝組成物を用いて保存される。例えば、嫌気状態を維持するための保存前の酸素除去、pH の操作、代謝前駆体の補充、浸透圧平衡の操作、懸濁媒の容積の増量、及び / 又は保護分子を加えることによる酸化的ストレスの低減を用いて、外因性抗原発現 EHC の生存能を維持することができる。これらの戦略の組み合わせを用いた幾つかの研究において、赤血球の生存能の維持によって 6 週間を超える保存の延長が可能となったことが報告されている（例えば、Yoshida and Shevkoplyas, Blood Transfus 2010 8:220 を参照）。

10

20

30

40

50

## 【0396】

本明細書に記載される外因性抗原発現 EHC の送達には、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤が用いられ得る。賦形剤とは、希釈剤又は媒体として使用される不活性物質を指す。薬学的に許容可能な担体は、一般には、化合物を治療に有用なもの又は製品として有用なものにするため化合物と共に使用される。一般に、任意の物質について、薬学的に許容可能な担体は、対象に送達する物質と組み合わせられる材料である。従来の医薬担体、水性、粉末状又は油性基剤、増粘剤などが、必要なもの又は望ましいものであり得る。ある場合には、担体は、例えば不溶性化合物を液体送達用に可溶化するため送達に不可欠である；その活性が保たれるように物質の pH を制御する緩衝剤；又は保存容器内における物質の損失を防ぐ希釈剤。しかしながら、他の場合には、担体は利便性を図るものであり、例えば、投与の利便性を高める液体である。本明細書に記載される化合物の薬学的に許容可能な塩は、当業者に公知の方法に従い合成し得る。

10

## 【0397】

典型的には、薬学的に許容可能な組成物は夾雑物を含まないように高度に精製され、生体適合性且つ非毒性であり、及び対象への投与に適している。水が担体の一構成成分である場合、その水は、夾雑物、例えばエンドトキシンを含まないように高度な精製及び処理を受ける。

## 【0398】

薬学的に許容可能な担体は、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシ安息香酸プロピル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、及び / 又は鉱油であり得るが、これらに限定されない。本医薬組成物は、潤滑剤、湿潤剤、甘味料、香味増強剤、乳化剤、懸濁剤、及び / 又は保存剤をさらに含み得る。

20

## 【0399】

有効レベルの外因性抗原を有する外因性抗原発現 EHC を含有する医薬組成物が提供される。かかる組成物は、複数の外因性抗原発現 EHC、例えば、 $1 \times 10^3$  個の EHC、又は  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$  個、又は  $1 \times 10^{12}$  個超の EHC を含有する。具体的な例では、EHC から作成される外因性抗原発現 EHC は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は 90% 超の質量対体積比 (% m / v) の濃度の生理食塩水中の濃厚赤血球として投与することができる。患者への投与時間は 10 分 ~ 4 時間の範囲であるか、又はそれを上回ってもよい。

30

## 【0400】

具体的な例では、EHC から作成される外因性抗原発現 EHC は、適切な緩衝液、例えば、抗凝固クエン酸デキストロース A (ACD - A)、クエン酸リン酸デキストロース (CPD)、クエン酸リン酸デキストロースデキストロース (CP2D)、又はクエン酸リン酸デキストロースアデニン (CPDA - 1) などの FDA 承認済みの抗凝固保存溶液中に保存することができる。本組成物は最長 21 日間保存し得る。

40

## 【0401】

或いは、EHC から作成される外因性抗原発現 EHC は、認可された添加剤溶液、例えば、AS - 1 (Adsol)、AS - 3 (Nutricel)、AS - 5 (Optisol)、又は AS - 7 (SOLX) 中に保存することができる。

## 【0402】

或いは、EHC から作成される外因性抗原発現 EHC は、グリセロール凍結保護溶液中に保存することができる。組成物は凍結して最長 10 年間保存し得る。凍結細胞は使用前に解凍し、例えば 0.9% 塩化ナトリウムによる連続洗浄ステップによって脱グリセロール化し得る。

## 【0403】

50



本明細書には、外因性抗原を含む複数の培養EHCを含む組成物及び医薬組成物が提供される。本組成物及び医薬組成物は、例えば抗凝固クエン酸デキストロースAなどの適切な保存緩衝剤の溶液を含み得る。外因性抗原を含む複数の培養EHCを含む組成物及び医薬組成物は、例えばAdsolなどの認可された添加剤をさらに含み得る。外因性抗原を含む複数の培養EHCを含む組成物及び医薬組成物は、凍結保存用にグリセロール凍結保護溶液をさらに含み得る。

【0404】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCは、別の外因性抗原発現EHCと多複合体凝集物、例えば、二量体、三量体、多量体を形成することが可能である。

【0405】

一実施形態において、外因性抗原発現EHCは、循環系の構成要素、例えば、赤血球、網赤血球、血小板、マクロファージ、リンパ球、T細胞、B細胞、肥満細胞と多複合体凝集物、例えば、二量体、三量体、多量体を形成することが可能である。

【0406】

外因性抗原発現EHC及びその医薬組成物の投与の投薬量及び頻度は、疾患の重症度、患者の年齢、性別及び食事、任意の炎症の重症度、投与時間、及び他の臨床学的要因など、様々な要因に基づき主治医が決定し得る。一例において、静脈内投与は最低限有効な用量で開始し、好ましい効果が観察されるまで、予め選択された時間経過にわたり用量を増加させる。続いて、現れ得る任意の有害作用を考慮しながら、対応する効果の増加が生じるレベルに限定して投薬量を漸増させる。

【0407】

好適な投薬量の非限定的な例は、例えば、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{13}$ 、又は $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{12}$ 個の外因性抗原発現EHCの範囲であり得る。具体的な例としては、約 $1 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $4 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $6 \times 10^3$ 、 $7 \times 10^3$ 、 $8 \times 10^3$ 、 $9 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $4 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $6 \times 10^4$ 、 $7 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^4$ 、 $9 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $4 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^5$ 、 $7 \times 10^5$ 、 $8 \times 10^5$ 、 $9 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $6 \times 10^6$ 、 $7 \times 10^6$ 、 $8 \times 10^6$ 、 $9 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $4 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $6 \times 10^7$ 、 $7 \times 10^7$ 、 $8 \times 10^7$ 、 $9 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $2 \times 10^{11}$ 、 $3 \times 10^{11}$ 、 $4 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $6 \times 10^{11}$ 、 $7 \times 10^{11}$ 、 $8 \times 10^{11}$ 、 $9 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 個、又はそれを超える外因性抗原発現EHCが挙げられる。外因性抗原発現EHCの各用量は、1日1回、週1回、週2回、月1回、又は月2回などの間隔で投与することができる。各EHCは、例えば、約 $100 \sim 10^7$ 、又は約 $10^3 \sim 10^6$ 個の、様々な範囲の抗原分子を発現し得る。具体的な例としては、EHC当たり約1000、3000、5000、 $1 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 個、又はそれを超える外因性抗原分子が挙げられる。

【0408】

「EHC基準の比例投薬量」は、循環実体の天然に存在する量に対する相対的な用量として投与される外因性抗原発現EHCの数である。循環実体は、細胞、例えば、赤血球、網赤血球、又はリンパ球、又は標的、例えば、抗原、抗体、ウイルス、毒素、サイトカイン等であり得る。単位は循環実体当たりの外因性抗原発現EHC、即ちSCMRC/CEとして定義される。この投薬量単位には、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$ 、1

10

20

30

40

50

$10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 、1、 $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ が含まれ得る。

【0409】

本明細書に記載される医薬組成物は、外因性抗原発現 EHC と任意選択で薬学的に活性な薬剤又は治療剤とを含む。治療剤は、生物学的薬剤、小分子薬剤、又は核酸薬剤であり得る。

【0410】

本明細書に記載される外因性抗原発現 EHC を含む医薬組成物を含む剤形が提供される。一部の実施形態において、剤形は静脈内注射用の液体懸濁物として製剤化される。

【0411】

本明細書に記載される外因性抗原発現 EHC を含む医薬組成物を保持する容器と対象への医薬組成物の静脈内注射用のアプリケーターとを含む医療器具が提供される。

【0412】

本明細書に記載される外因性抗原発現 EHC を含む医薬組成物と対象への医薬組成物の静脈内注射用の医療器具とを含む医療用キットが提供される。

【0413】

外因性抗原発現 EHC の薬学的に許容可能な懸濁液は、好ましくは約 10 ~ 約 250 ml の容積で包装される。包装材料はシリンジ又は輸液に好適な IV バッグであってもよい。懸濁液の投与は、任意選択で IV バッグなどからの点滴を使用して例えば静脈内又は動脈内注入によって行われる。投与は典型的には腕に又は中枢カテーテルを介して静脈内に行われる。50 ml を超える投与には、点滴の使用が好ましい。

【0414】

疾患の治療

免疫トレランスを誘導する方法が提供される。本方法は、免疫トレランスの誘導を必要としている対象に対し、本明細書に提供される目的の外因性抗原を含む赤血球細胞の医薬組成物を、対象において免疫トレランスを誘導するのに十分な量及び/又は投与頻度で投与するステップを含む。

【0415】

本発明の医薬組成物は、免疫トレランスを促進又は増強するのに有用である、目的の外因性抗原を含む赤血球細胞を提供する。免疫トレランスを用いて、免疫活性化に関連する疾患、障害、又は病態を治療するか、予防するか、又はその重症度を低減し得る。

【0416】

免疫活性化疾患には、自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、1型糖尿病、関節リウマチ、及び膜性腎炎など、及び表 F に列挙されるものも含まれる。免疫活性化疾患にはまた、炎症性疾患、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、又は他の特発性炎症性腸疾患など、及び表 G に列挙されるものも含まれる。免疫活性化疾患にはまた、アレルギー性疾患、例えば、喘息、ピーナッツアレルギー、甲殻類アレルギー、花粉アレルギー、乳タンパク質アレルギー、虫刺されアレルギー、及びラテックスアレルギーなど、及び表 H に列挙されるものも含まれる。免疫活性化疾患にはまた、原発疾患の治療のために投与される治療用タンパク質に応答した、治療用タンパク質、例えば、血友病 A における第 VII 凝固因子、血友病 B における第 IX 凝固因子、関節リウマチ及び他の炎症性疾患における抗腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ) 抗体、ゴースェ病におけるグルコセレブロシダーゼ、又は急性リンパ性白血病 (ALL) におけるアスパラギナーゼ、並びに表 I、表 J、表 5、及び表 7 に列挙されるものの有効性を低下させる免疫活性化も含まれる。

【0417】

さらに、免疫活性化疾患の治療方法が提供される。本方法は、治療の誘導を必要としている対象に対し、本明細書に提供される目的の外因性抗原を含む赤血球細胞の医薬組成物を免疫活性化疾患の治療に十分な量で投与するステップを含む。例えば、自己免疫疾患、炎症性疾患又はアレルギー性疾患などの免疫活性化疾患に罹っているか、又はそれに罹っている疑いがある対象には、提供される本治療方法が有効であり得る。

10

20

30

40

50

## 【0418】

一部の実施形態において、患者は自己免疫疾患若しくは病態又は自己抗体媒介性疾患若しくは病態に罹患しており、ここでは患者の免疫系が内因性分子、例えばタンパク質抗原に対して活性化し、従って免疫系が内因性分子を攻撃し、炎症を生じさせ、組織に損傷を与え、及び他に自己免疫又は自己抗体疾患又は病態の症状を引き起こす。免疫反応は内因性分子に結合する抗体によって駆動され得るか、又は内因性分子を発現する細胞を攻撃する過活性のT細胞によって駆動され得るか、又は調節性T細胞、NK細胞、NKT細胞、又はB細胞などの他の免疫細胞によって駆動され得る。これらの実施形態において、抗原タンパク質又はその断片は本発明の除核造血細胞上で発現し得る。これらの細胞の集団は、こうした疾患又は病態に罹患している患者に1回又はそれを超えて投与するとき、抗原タンパク質に対するトレランスを誘導してもはや免疫系の活性化が生じないようにするのに十分であり、ひいては根底にある疾患又は病態の症状が治療又は改善され得る。

10

## 【0419】

例えば、後天性血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)に罹患している患者は異常な自己抗体媒介性疾患を有し、ここでは内因性ADAMTS13タンパク質に対する抗体が産生されて、ADAMTS13がそのフォン・ヴィレブランド因子切断活性を発揮できなくなり、それにより血管系全体にわたって微小血栓が形成される結果、血小板減少症が起こる。この実施形態では、ADAMTS13抗原が除核造血細胞上で発現し、TTPに罹患している患者に対し、ADAMTS13に対するトレランスを誘導するのに十分な有効な量で投与され、従って循環中にある阻害性抗ADAMTS13自己抗体の量が減少し、フォン・ヴィレブランド因子を切断する体の能力が回復するため、従って疾患の症状が低減する。好ましい実施形態では、ADAMTS13の抗原断片のみが除核造血細胞上で発現する。好ましい実施形態では、完全長ADAMTS13が除核造血細胞上で発現する。好ましい実施形態では、完全長ADAMTS13が除核造血細胞上で発現し、酵素的に活性であり、従って投与された細胞生成物は、トレランスの誘導と、またフォン・ヴィレブランド因子の治療的切断との両方を行うことが可能である。

20

## 【0420】

別の例では、非典型溶血性貧血症候群(aHUS)に罹患している患者は、内因性タンパク質補体因子H(CFH)に対する異常な自己抗体反応を有し、CFHがその補体調節機能を果たすことができない。結果として、血管系において補体の過剰な活性化が起こり、血管内溶血につながる。この実施形態では、CFH抗原が除核造血細胞上で発現し、aHUSに罹患している患者に対し、CFHに対するトレランスを誘導するのに有効な量で投与され、従って循環中の阻害性抗CFH自己抗体の量が減少し、補体を阻害する体の能力が回復するため、従って疾患の症状が低減する。好ましい実施形態では、CFHの抗原断片のみが除核造血細胞上で発現する。好ましい実施形態では、完全長CFHが除核造血細胞上で発現する。好ましい実施形態では、完全長CFHが除核造血細胞上で発現し、治療的に活性であり、従って投与された細胞生成物は、トレランスの誘導と、また補体調節の治療的促進との両方を行うことが可能である。

30

## 【0421】

別の例では、多発性硬化症(MS)に罹患している患者は、ニューロンを包むポリペプチドミエリンに対する自己免疫反応を有する。結果として、T細胞がミエリンを攻撃し、それによって生じる炎症が神経線維の脱髄を引き起こし、神経に沿って電気信号が送られる能力が障害され、多発性硬化症の症状につながる。この実施形態では、ミエリン抗原が除核造血細胞上で発現し、MSに罹患している患者に対し、ミエリン抗原に対するトレランスを誘導するのに有効な量で投与され、従って抗ミエリン免疫反応が減少し、有髄神経線維へと電気インパルスを送る体の能力が回復するため、従って疾患の症状が低減する。好ましい実施形態では、ミエリンの1つ以上の抗原断片のみが除核造血細胞上で発現する。好ましい実施形態では、完全長ミエリンタンパク質が除核造血細胞上で発現する。

40

## 【0422】

別の例では、1型糖尿病(T1D)に罹患している患者は、膵臓の膵島細胞に対する

50

自己免疫反応を有する。結果として、T細胞が膵島細胞を死滅させ、インスリンを産生して分泌する膵臓の能力が低下又は消失することで、T1Dの症状及び病理学につながる。この実施形態では、細胞抗原が除核造血細胞上で発現し、T1Dに罹患している患者に対し、細胞抗原に対するトレランスを誘導するのに有効な量で投与され、従って抗細胞免疫反応が減少し、インスリンを産生して分泌する膵臓の能力が回復するため、従って疾患の症状が低減する。好ましい実施形態では、細胞抗原の1つ以上の抗原断片のみが除核造血細胞上で発現する。好ましい実施形態では、完全長細胞タンパク質が除核造血細胞上で発現する。

#### 【0423】

さらに、治療用タンパク質治療レジメンに応答した免疫活性化を低減又は軽減する方法が提供される。本方法は、治療用タンパク質治療レジメンに応答した免疫活性化の低減又は軽減を必要としている対象に対し、本明細書に提供される目的の外因性抗原を含む赤血球細胞の医薬組成物を、治療用タンパク質治療レジメンに応答した免疫活性化を低減又は軽減するのに十分な量で投与するステップを含む。

10

#### 【0424】

一部の実施形態では、患者は、疾患又は病態の症状を治療又は改善するために治療用タンパク質を投与し得る疾患又は病態に罹患しているが、その治療用タンパク質が免疫原性であるため、患者が治療用タンパク質に対して免疫反応を生じ、治療用タンパク質がもはや原疾患の治療又は改善に有効ではなくなる。例えば、免疫原性治療用タンパク質は、非ヒト供給源、例えば、ウシ、ブタ、又は非ヒト霊長類に由来するか、又は非哺乳類供給源に由来し、例えば、細菌、真菌、又は植物由来であってもよく、又は免疫原性治療用タンパク質はヒト供給源に由来してもよく、但し反復曝露及び投与が免疫原性の誘導に十分となり得るものである。免疫反応は、免疫原性治療用タンパク質に結合してその機能を阻害する抗体（中和抗体）又は免疫原性治療用タンパク質に結合して他の免疫細胞によるそのクリアランスを惹起する抗体（オプソニン化抗体）によって駆動され得る。これらの実施形態では、免疫原性治療用タンパク質又はその抗原断片が本発明の除核造血細胞上で発現し得る。これらの細胞の集団は、疾患に罹患している患者に1回又はそれを超えて投与されるとき、もはや免疫系によって中和又はオプソニン化されないように免疫原性治療用タンパク質に対するトレランスを誘導するのに十分であり得る。好ましい一実施形態において、本発明の除核造血細胞の表面上で発現する免疫原性治療用タンパク質は、循環中の細胞上で治療的に活性であり、従って細胞及びタンパク質の組成物は、患者への投与時にトレランスの誘導と、根底にある疾患又は病態の症状の治療又は改善との両方を行うことが可能である。別の好ましい実施形態において、本発明の除核造血細胞の表面上で発現する免疫原性治療用タンパク質の抗原断片は循環中の細胞上で治療活性を有さず、従って細胞及びタンパク質の組成物は患者への投与時にトレランスを誘導することが可能であり、しかし根底にある疾患又は病態の症状の治療又は改善には免疫原性治療用タンパク質の別個の製剤が投与される。

20

30

#### 【0425】

例えば、血友病Aに罹患している患者は、適切な凝固を回復するため第VII凝固因子（FVII）を輸注する必要がある。しかしながら、FVIIがヒト由来であるにも関わらず、多くの患者がFVIIに対する中和抗体を生じ、それにより治療が無効となり、生命を脅かす出血リスクにつながり得る。一実施形態では、血友病Aに罹患している患者に対し、外因性FVIIを発現する除核造血細胞が投与され、それにより（1）循環活性FVIIレベルが症状の改善及び制御されない重度の出血の予防に必要なレベルまで回復され、及び（2）FVIIに対するトレランスが誘導される。

40

#### 【0426】

別の例では、関節リウマチに罹患している患者は、その疾患に関連する炎症を低減するため抗TNF $\alpha$ 抗体を注射する必要がある。しかしながら、患者は抗TNF $\alpha$ 抗体に対する中和抗体を生じ、それにより治療用抗体が無効となり得る。この場合、患者は典型的には症状の悪化を起し、抗TNF $\alpha$ 抗体の用量を増加しなければならないか、又は別のア

50

ミノ酸コード配列を有する別の抗TNF $\alpha$ 抗体に切り換えなければならないかのいずれかである。この実施形態では、抗TNF $\alpha$ 抗体に対する中和抗体を生じた関節リウマチ患者に、抗TNF $\alpha$ の抗原断片を発現する除核造血細胞が投与される。組成物は、抗TNF $\alpha$ 抗体に対するトレランスを誘導するのに十分な用量で投与され、循環TNF $\alpha$ レベルを低減し、ひいては患者における関節リウマチの症状を低減するための抗TNF $\alpha$ の有効な投与が可能となる。

【0427】

別の例では、フェニルケトン尿症(PKU)に罹患している患者は、非ヒト酵素のペグ化フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)で治療される。この患者は、この治療用タンパク質の投与時にアレルギー反応もまた誘発するPALに対してオプソニン化抗体及び中和抗体を生じる。この免疫反応はPALを無効にするのみならず、患者の健康もまた脅かす。一実施形態において、PKUに罹患している患者に対し、PALに対するトレランスを誘導するのに十分な量で外因性PALを発現する除核造血細胞が投与される。好ましい実施形態では、細胞が発現するPALは細胞上で活性であり、組成物は、PALに対する危険な免疫反応を予防することに加えて、循環フェニルアラニンレベルを低減し、フェニルケトン尿症の症状を治療又は改善することが可能である。別の好ましい実施形態では、PALの抗原断片が除核造血細胞上で発現し、この細胞発現断片は治療活性を有さず、そのため、フェニルケトン尿症の症状を治療又は改善するため患者に別個のPAL製剤が投与される。トレランスを誘導する細胞組成物は、PAL治療製剤を投与する前に投与することができ、又はトレランスを誘導する細胞組成物は、PAL治療製剤の投与と同時に投与することができる。

【0428】

一部の実施形態では、患者は、アレルギー性疾患、例えば、動物の鱗屑、クログルミ、ブラジルナッツ、カシューナッツ、クリ、チリダニ、卵、ペルシャグルミ、魚、ヘーゼルナッツ、昆虫毒、ラテックス、牛乳、カビ、ピーナッツ類、花粉、草、甲殻類、大豆、堅果類、又はコムギに対するアレルギーに罹患している。アレルギーに罹患している患者は、例えば食事、皮膚接触、注射、又は環境曝露によるアレルゲンの抗原断片との接触時に免疫反応を生じ得る。免疫反応には、IgE抗体、感作肥満細胞、脱顆粒、ヒスタミン遊離、及びアナフィラキシー、並びにT細胞、B細胞、樹状細胞、調節性T細胞、NK細胞、好中球、及びNK細胞などのカノニカルな免疫細胞が関わり得る。アレルギー反応は不快感を引き起こすこともあれば、又は死亡を引き起こすほど重症であることもあり、従って患者側でも、並びにその患者の家族及び介護者側でも常に警戒する必要がある。これらの実施形態では、抗原タンパク質又はその断片が本発明の除核造血細胞上で発現し得る。これらの細胞の集団は、アレルギー性疾患又は病態に罹患している患者に1回又はそれを超えて投与されるとき、抗原タンパク質に対するトレランスを誘導してもはや曝露時の免疫系の活性化が誘導されないようにするのに十分であり得ると共に、ひいては根底にあるアレルギー性疾患又は病態の症状を治療又は改善し得る。

【0429】

一例において、ピーナッツアレルギーに罹患している患者は、ピーナッツ抗原AraH1に曝露すると免疫反応を有する。この実施形態では、AraH1が除核造血細胞上で発現し、ピーナッツアレルギーに罹患している患者に対し、AraH1抗原に対するトレランスを誘導するのに有効な量で投与され、従ってアレルギー性免疫反応が減少し、ピーナッツを安全に摂取する個体の能力が回復するため、従って疾患の症状が低減する。好ましい実施形態では、AraH1の1つ以上の抗原断片のみが発現する。好ましい実施形態では、完全長AraH1タンパク質が発現する。

【0430】

本発明の特定の態様は、ヒト白血球抗原(HLA)不適合媒介性疾患、例えば、移植片対宿主病又は移植臓器拒絶反応などにおいて免疫細胞によって認識される抗原を含むEHCに関する。

【0431】

一部の実施形態において、患者は、ヒト白血球抗原（HLA）不適合の疾患又は病態に罹患しており、ここでは組織上のHLA抗原に対して免疫細胞が活性化され、その組織を攻撃する。これは完全には適合しないドナーからの臓器又は組織の同種移植後によく起こり、移植片拒絶反応の医学的状態につながり、ここでは患者の免疫系が外来性組織又は臓器を攻撃し、移植臓器又は組織の死を引き起こす。別のよく見られるHLA不適合病態は移植片対宿主病（GVHD）であり、ここで患者は完全には適合しないドナーから同種骨髄移植を受けており、移植免疫細胞（移植片）が活性化して、外来性と認識されるレシピエント臓器（宿主）を攻撃するため、宿主組織及び臓器に損傷が引き起こされ、死亡を含めた重篤な結果につながる。HLA不適合免疫活性化は、典型的にはT細胞によって媒介されるが、調節性T細胞、NK細胞、NKT細胞、B細胞、抗体、樹状細胞、単球、マクロファージ、及び好中球もまた関わり得る。これらの実施形態では、抗原性HLA分子又はその断片が本発明の除核造血細胞上で発現し得る。これらの細胞の集団は、HLA不適合疾患又は病態に罹患している患者に1回又はそれを超えて投与されるとき、抗原性HLA分子に対するトランスを誘導し、もはや免疫系の活性化が誘導されないようにするのに十分であり、従って根底にあるHLA不適合疾患又は病態の症状、例えば移植臓器の生存又は患者の生存が治療又は改善され得る。好ましい実施形態では、細胞の表面上で発現するHLA分子はまた、HLA分子に負荷されたペプチドも含有する。

10

## 【0432】

本明細書に記載される方法に使用される外因性抗原を含む赤血球細胞は自己由来、即ち同じ対象に由来してもよく、又は同種由来、即ち異なる細胞ドナーに由来してもよい。

20

## 【0433】

医薬組成物は、例えば静脈内輸液又は筋肉内注射によって対象に投与され得る。

## 【0434】

他の実施形態

本発明は特定の方法、試薬、化合物、組成物又は生物学的システムに限定されず、それらは当然ながら異なり得ることが理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語法は特定の態様を説明することを目的にしているに過ぎず、限定する意図はないことも理解されるべきである。

## 【0435】

本明細書に開示される全ての特徴は、任意の組み合わせで組み合わせることができる。本明細書に開示される各々の特徴は、同じ、均等な、又は類似した目的を果たす代替的な特徴に置き換えることができる。従って、特に明示的に述べられない限り、開示される各々の特徴は、一般的な一連の均等な又は類似した特徴の一例に過ぎない。

30

## 【0436】

一部の実施形態において、CR1外因性抗原を含む外因性抗原発現EHCはマウスでは作成されず、及び/又はマウス赤血球系細胞からは作成されない。一部の実施形態において、CR1外因性抗原を含む外因性抗原発現EHCは実験動物では作成されず、及び/又は実験動物に由来する赤血球系細胞からは作成されない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは巨核球又は血小板から作成される。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、赤血球系細胞、例えば赤血球又は網赤血球から作成される。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、好中球、好酸球、又は好塩基球からは作成されない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、単球又はマクロファージからは作成されない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、CD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>造血幹細胞又はCD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>又はCD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>細胞がエンリッチされた細胞集団からは作成されない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、HIV共受容体の細胞外ドメインを含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、ウイルスとの結合能を有する外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、CD4を含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、HIV共受容体を含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、CXCR4、C

40

50

C R 5、C C R 1、C C R 2、C C R 3、C C R 4、C C R 8、C X C R 1、C X C R 2、C X C R 3、C X C R 6、G P R 1 5、A P J、C M K L R 1、又はC X 3 C R 1又はそれらの任意の組み合わせを含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、アデノシンデアミナーゼ外因性抗原をコードする外因性核酸を含有しない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、アデノシンデアミナーゼ ( A D A ) を含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、癌遺伝子をコードする外因性核酸を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、癌遺伝子を含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、c d x 1、c d x 2、又はc d x 4をコードする外因性核酸を含有しない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、c d x 1、c d x 2、又はc d x 4、又はそれらの任意の組み合わせを含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、リガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドを含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、リガンドとの結合能を有するSドメインを含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、C D 3、C D 3、I L - 2 受容体、I L - 3 受容体、I L - 4 受容体、I L - 7 受容体、I L - 1 1 受容体、I L - 1 3 受容体、G M - C S F 受容体、L I F 受容体、C N T F 受容体、オンコスタチンM受容体、T G F - 受容体、E G F 受容体、A T R 2 / n e u、H E R 2 / n e u、H E R 3 / c - e r b B - 3、X m r k、インスリン受容体、I G F - 1 受容体、I R R、P D G F 受容体、C S F - 1 受容体、c - k i t、S T K - 1 / f l k - 2、F G F 受容体、f l g、b e k、N G F 受容体、R o r 1 及びR o r 2 又はそれらの任意の組み合わせを含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、ヒトパピローマウイルスのE 6 又はE 7 遺伝子を含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、腫瘍抗原を含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、グルコセレブロシダーゼを含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、アスパラギナーゼを含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、アルギニンデアミナーゼを含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、i ) 外因性抗原とは異なる標的細胞、及び / 又はi i ) 外因性抗原とは無関係に機能する標的細胞 (ここで外因性抗原は標的との相互作用能を有する) と外因性抗原発現 E H C との融合を促進する能力を有する融合分子を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、シンシチン - 1 を含む外因性抗原を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、例えば光子又は消光性化合物によって活性化され得る化合物などの感光性合成化合物を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、検出可能な反応を生じる能力を有する活性化可能分子検出剤を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は診断用化合物を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C はウイルス又は細菌を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は自己C D 3 4 + 細胞からは作成されず、又はそれを含まない。一部の実施形態において、本明細書に記載される赤血球系細胞から作成される外因性抗原発現 E H C を使用した治療及び予防方法は、インピボで例えば赤血球系細胞と会合した検出剤によって赤血球系細胞を検出するステップを含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C はヒトドナー多能性造血幹細胞からは作成されない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C の集団はバイオリアクターでは拡大されない。一部の実施形態において、拡大及び / 又は分化後の外因性抗原発現 E H C の集団は、分化したヒト血液細胞の単一の種を含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、分化した成熟ヒト血液細胞ではない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、万能ドナー、例えば血液型O、Rh 因子陰性に由来する血液細胞からは作成されない。一部の実施形態において、外因性 A D A ポリペプチド抗原発現 E H C は重症複合型免疫不全症 ( A D A - S C I D ) の治療には使用されない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C を拡大し及び分化させる方法は、骨髄増殖性受容体 ( m y e l o p r o l i f e r a t i v e r e c e p t o

10

20

30

40

50

r : m p l ) リガンドを含む培地で外因性抗原発現 E H C を培養することを含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、合成三リン酸化ヌクレオシド類似体を含むペイロードを含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、2' , 3' - ジデオキシシチジン - 5' - 三リン酸 ( d d C T P ) 及び / 又は 3' - アジド - 3' - デオキシチミジン - 5' - 三リン酸 ( A Z T - T P ) を含むペイロードを含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、ビスホスホネートを含むペイロードを含まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、細胞を溶解させたり及び再密閉したりすることなく赤血球系細胞を外因性抗原及び任意選択でペイロードと接触させて外因性抗原及び / 又はペイロードを取り込ませることにより作成される。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、赤血球系細胞を外因性抗原及び任意選択でペイロードと接触させることにより作成され、ここで接触には低張透析は含まれない。一部の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、赤血球系細胞を外因性抗原及び任意選択でペイロードと接触させることにより作成され、ここで接触には、赤血球系細胞内又はその上に外因性抗原及び / 又はペイロードを負荷することは含まれない。一部の実施形態において、外因性抗原は、接触させる赤血球系細胞でない実体に作成され、及び / 又は外因性抗原は、接触させる赤血球系細胞を含まない試料から単離される。例えば、ポリペプチド外因性抗原について、好適な実体には、細胞株、インビトロ発現系、細菌発現系等が含まれる。

10

## 【 0 4 3 7 】

一部の実施形態において、E H C が発現する外因性抗原ポリペプチドは E H C の表面上に存在するが、E H C の表面に非共有結合的に結合はしていない。一部の実施形態において、E H C の表面に対する抗原の非共有結合は、抗体、抗体断片、抗体様ポリペプチド、又は非抗体ポリペプチド結合足場によっては媒介されない。一部の実施形態において、E H C の表面に対する外因性抗原の非共有結合は、赤血球系細胞抗原、例えば、バンド 3 ( C D 2 3 3 )、アクアポリン - 1、G l u t - 1、キッド抗原、R h A g / R h 5 0 ( C D 2 4 1 )、R h ( C D 2 4 0 )、R h 3 0 C E ( C D 2 4 0 C E )、R h 3 0 D ( C D 2 4 0 D )、K x、グリコホリン B ( C D 2 3 5 b )、グリコホリン C ( C D 2 3 5 c )、グリコホリン D ( C D 2 3 5 d )、ケル ( C D 2 3 8 )、ダッフィ / D A R C i ( C D 2 3 4 )、C R 1 ( C D 3 5 )、D A F ( C D 5 5 )、グロボシド、C D 4 4、I C A M - 4 ( C D 2 4 2 )、L u / B - C A M ( C D 2 3 9 )、X G 1 / X G 2 ( C D 9 9 )、E M M P R I N / ニューロテリン ( C D 1 4 7 )、J M H、グリコシルトランスフェラーゼ、カートライト ( C a r t w r i g h t )、ドンブロック、C 4 A / C A B、シアンナ ( S c i a n n a )、M E R 2、ストマチン、B A - 1 ( C D 2 4 )、G P I V ( C D 3 6 )、C D 1 0 8、C D 1 3 9、及び H 抗原 ( C D 1 7 3 )、又は別の赤血球結合部分を対象とするものではない。

20

30

## 【 0 4 3 8 】

一部の実施形態において、外因性抗原ポリペプチドは、E H C と別に作成されて次に E H C にコンジュゲートされるものではない。一部の実施形態において、外因性抗原ポリペプチドは、例えばトランスペプチダーゼ、ソルターゼ、及び / 又はイソペプチダーゼによって行われるような、例えば自己触媒イソペプチド結合形成反応を介して酵素的にコンジュゲートされるものではない。一実施形態において、外因性抗原ポリペプチドは、ソルターゼを使用して酵素的にコンジュゲートされるものではない。

40

## 【 0 4 3 9 】

一部の実施形態において、外因性抗原ポリペプチドは、例えばカルボジイミド (ソルターゼ 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド ( E D C ) を含む ) などの架橋剤を介して化学的にコンジュゲートされるものではない。

## 【 0 4 4 0 】

一実施形態において、外因性抗原は、E H C と別に作成されて次に E H C に封入されるものではない。一実施形態において、外因性抗原の封入は、外因性抗原の存在下における E H C の低張透析によって媒介されるものではない。

50



## 【0441】

前述の説明及び関連する図面に提供される教示を利用して、これらの発明が関係する技術分野の当業者には、本明細書に示される発明の多くの変形形態及び他の実施形態が容易に想起されるであろう。従って、本発明は開示される具体的な実施形態に限定されないこと、並びに変形形態及び他の実施形態が添付の特許請求の範囲内に含まれるものと意図されることが理解されるべきである。本明細書では特定の用語が用いられているが、それらは一般的且つ説明的な意味で用いられているに過ぎず、限定を目的とするものではない。

## 【0442】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、内容上特に明確に指示されない限り複数形の参照を含む。

10

## 【0443】

選択肢(例えば、「又は」)の使用は、それらの選択肢の一方、両方、又はそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味するものと理解されなければならない。

## 【0444】

用語「約」は、本明細書で使用されるとき、量、時間的な持続期間などの計測可能な値を参照する場合に、指定された値から $\pm 20\%$ 又は $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 1\%$ 、及びなおもより好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を包含するように意図され、従って変動は本開示の方法を実施するのに妥当である。

## 【0445】

20

本明細書で使用されるとき、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比範囲、又は整数範囲は、特に指示されない限り、記載される範囲内にある任意の整数の値、及び適切な場合にはその分率(整数の10分の1及び100分の1)を含むものと理解されるべきである。

## 【0446】

「~を含む(comprise)」、「~を含んでいる(comprising)」、及び「~を含む(comprises)」及び「~を含む(compri sed of)」は、本明細書で使用されるとき、「~を備える(include)」、「~を備えている(including)」、「~を備える(includes)」又は「~を含有する(contains)」、「~を含有している(containing)」、「~を含有する(contains)」と同義語であり、次に続くもの、例えば構成要素の存在を特定し、且つ当該技術分野において公知の又はそこに開示されている追加的な記載されていない構成要素、特徴、要素、メンバー、ステップの存在を排除又は除外しない包括的な又はオープンエンド形式の用語である。

30

## 【0447】

本明細書で使用されるとき、用語「など」、「例えば」等は、例示的实施形態を指し、本開示の範囲を限定しないことが意図される。

## 【0448】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本発明が関係する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。本発明を試験するための実施においては、本明細書に記載されるものと同様の又は均等な任意の方法及び材料を使用し得るが、本明細書には好ましい材料及び方法が記載される。

40

## 【0449】

本明細書に引用される全ての刊行物及び特許出願は、個別の刊行物又は特許出願がそれぞれあらゆる目的で参照によって援用されることが具体的且つ個別的に示されたものとして、本明細書においてあらゆる目的で全体として参照により援用される。本明細書で考察される刊行物は、本願の出願日より前のそれらの開示についてのみ提供される。本明細書のいかなる事項も、先行発明であることに基づき又は任意の他の理由で本明細書に記載される本発明者らにかかる開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されてはならない。

50

## 【0450】

## 定義

「投与」、「投与する」及びそれらの変形は、組成物、例えば外因性抗原発現 EHC、又は薬剤を対象に導入することを意味し、組成物又は薬剤の同時の及び逐次的な導入が含まれる。対象への組成物又は薬剤の導入は、経口、経肺、鼻腔内、非経口（静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下）、経直腸、リンパ内、又は局所を含めた任意の好適な経路による。投与には、自己投与及び他人による投与が含まれる。投与経路が好適であれば、組成物又は薬剤はその意図された機能を果たすことができる。例えば、好適な経路が静脈内である場合、対象の静脈中に組成物又は薬剤を導入することによって組成物が投与される。投与は任意の好適な経路によって実施することができる。

10

## 【0451】

「アンカー」又は「アンカードメイン」又は「Aドメイン」は、融合又はキメラ外因性抗原ポリペプチドを含めた外因性抗原ポリペプチドのうち、EHCの細胞膜と接触している一部分を指して使用される。外因性抗原ポリペプチドは、リン脂質テール挿入、脂質層構成物との共有結合、イオン結合、水素結合を介するか、或いは脂質細胞膜層の1つ以上を通過する1回又は複数回膜貫通ポリペプチドドメインを介して脂質細胞膜層と相互作用し得る。

## 【0452】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、天然か、それとも一部若しくは全てが合成的に産生されるかに関わらず、免疫グロブリン、及びその断片を包含する。この用語はまた、免疫グロブリン結合ドメインに相同な結合ドメインを有する任意のタンパク質も含む。これらのタンパク質は天然の供給源に由来してもよく、又は一部若しくは全てが合成的に産生されてもよい。「抗体」には、抗原に特異的に結合してそれを認識する免疫グロブリン遺伝子由来のフレームワーク領域を含むポリペプチド又はその断片がさらに含まれる。抗体という用語の使用は、全抗体、ポリクローナル、モノクローナル及び組換え抗体、それらの断片を含み、さらに、一本鎖抗体、ヒト化抗体；マウス抗体；キメラ、マウス-ヒト、マウス-霊長類、霊長類-ヒトモノクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、抗体断片、例えば、scFv、(scFv)<sub>2</sub>、Fab、Fab'、及びF(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>1</sub>、Fv、dAb、及びFd断片など、ダイアボディ、及び抗体関連ポリペプチドを含むことが意図される。抗体には、所望の生物学的活性又は機能を呈する限りにおいて二重特異性抗体及び多重特異性抗体が含まれる。

20

30

## 【0453】

本明細書で使用される用語「抗原結合断片」は、インタクトな免疫グロブリンの断片、及び抗原との特異的結合能を有する抗原結合領域を含むポリペプチドの任意の一部を指す。例えば、抗原結合断片は、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fab'断片、Fab断片、Fv断片、又はscFv断片であってもよく、しかしこれらに限定されるものではない。Fab断片は1つの抗原結合部位を有し、軽鎖及び重鎖の可変領域、軽鎖の定常領域、並びに重鎖の第1定常領域CH1を含む。Fab'断片はFab断片と比べて、Fab'断片が重鎖CH1領域のC末端にある少なくとも1つのシステイン残基を含む重鎖のヒンジ領域をさらに含む点で異なる。F(ab')<sub>2</sub>断片は、Fab'断片のシステイン残基がヒンジ領域でジスルフィド結合によってつなぎ合わされて作製される。Fv断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のみを有する最小抗体断片であり、Fv断片を作製する組換え技術は当該技術分野において周知されている。二重鎖Fv断片は、重鎖可変領域が軽鎖可変領域と非共有結合によって連結された構造を有し得る。単鎖Fv(scFv)断片は概して二重鎖Fv断片にあるような二量体構造を有し、ここでは重鎖可変領域がペプチドリンカーを介して軽鎖可変領域に共有結合的に結合しているか、又は重鎖及び軽鎖可変領域がそれらのC末端で互いに直接連結している。抗原結合断片はプロテアーゼを使用して得られてもよく（例えば、全抗体がパパイニンで消化されることによりFab断片が得られ、及びペプシンで消化されることによりF(ab')<sub>2</sub>断片が得られる）、及び遺伝子組換え技術によって調製されてもよい。dAb断片はVHドメインからなる。一本鎖抗体分子は複数の

40

50

個別分子を含むポリマー、例えば、二量体、三量体又は他のポリマーを含み得る。

【0454】

「アプリケーション」は、対象につなぐために使用される任意の装置を指す。これには、例えば、針、カニューレ、カテーテル、及びチュービングが含まれる。

【0455】

「～と会合する」は、複数の化合物又は分子の間の関係を記載するために使用されるとき、例えば、外因性抗原と標的との間又は外因性抗原発現 EHC と標的との間の任意の相互作用などを包含する。これには、酵素的相互作用、イオン結合、共有結合、非共有結合、水素結合、ロンドン力、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、親油性相互作用、磁気相互作用、静電相互作用などが含まれる。

10

【0456】

「～に関連する」は、標的、実体、化合物、薬剤、又は分子と、疾患、障害、病態、症状又は表現型との間の関係を記載するために使用されるとき、疾患、障害、病態、症状又は表現型の原因となるか否かに関わらず、因果的関連付け、又は統計的に有意な関連付け、実験的に確立された関連付け、示唆される関連付けを含めた、それらの間に妥当に設けられ得る任意の関連付けである。

【0457】

「自己免疫障害」は、概して、対象の免疫系が体自体の細胞を攻撃して組織破壊を引き起こす病態である。自己免疫障害は、血液検査、脳脊髄液分析、筋電図（筋機能を計測する）、及び脳の磁気共鳴画像法を用いて診断することができ、しかし血中の自己抗体（self-antibody）（又は自己抗体（auto-antibody））についての抗体検査が特に有用である。通常、自己免疫疾患には IgG クラス抗体が関連する。

20

【0458】

「結合する」は、化合物又は分子の間、例えば、外因性抗原と標的との間又は外因性抗原発現 EHC と標的との間の、イオン結合、静電相互作用、水素結合、ロンドン力、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、親油性相互作用などを含めた共有結合又は非共有結合によって生じる相互作用を表す。

【0459】

「ポリペプチドの生物学的活性」は、ポリペプチド、例えば外因性抗原ポリペプチドによって生じる任意の分子活性又は表現型（例えば、結合、シグナル伝達、触媒等）を指す。

30

【0460】

本明細書で使用されるとき、用語「生物学的試料」は、例えば、DNA、RNA、脂質、炭水化物、及びタンパク質を含めた、対象から単離された生物学的起源の任意のタイプの材料を指す。用語「生物学的試料」には、対象から単離された組織、細胞及び生物学的流体が含まれる。生物学的試料には、例えば、限定はされないが、全血、血漿、血清、精液、唾液、涙、尿、糞便物質、汗、口腔液、皮膚、脳脊髄液、骨髄、胆汁、毛髪、筋肉生検、臓器組織又は当業者に公知の生物学的起源の他の材料が含まれる。生物学的試料は、例えば内臓器官の生検から、又は癌から得ることができる。生物学的試料は診断若しくは研究用に対象から得ることができ、又は対照として若しくは基礎研究のため、健常対象から得ることができる。

40

【0461】

「クリアランス速度」は、本明細書で使用されるとき、例えば、対象の循環系に残る外因性抗原、標的 - 外因性抗原、又は外因性抗原発現 EHC の量又は濃度を経時的に計測することによって計算される。例えば、第 1 の試料中に検出される標的の 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は 99% が、1 時間、5 時間、10 時間、24 時間、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、2 週間、3 週間、4 週間、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、5 ヶ月、6 ヶ月、7 ヶ月、8 ヶ月、9 ヶ月、10 ヶ月、11 ヶ月、12 ヶ月、2 年、3 年、4 年、又は 5 年後に採取した第 2 の試料中になおも検出され得る。クリアランス速度は、或

50

いは単位時間当たり（例えば1日当たり）の実体（例えば、標的/外因性抗原）の数として表されてもよい。クリアランス速度の増加は、未治療の又は健常な好適な対照対象で示された速度を上回る速度である。クリアランス速度の低下は、未治療の又は健常な好適な対照対象で示された速度未満の速度である。この増加又は低下は、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、500%、1000%であってもよく、又は1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、又は1000倍であってもよい。

#### 【0462】

「開裂する」は、本明細書で使用されるとき、標的、例えばポリペプチド又は核に存在する結合相互作用を分断させるプロセスであって、例えばそれにより、開裂後に互いに分離し得る2つ以上の実体が生じるプロセスである。分離には、例えば、イオン結合、共有結合、極性共有結合、非極性共有結合、又は金属結合を分断させることが関与し得る。開裂がポリペプチド標的に適用されるとき、開裂には、1つ以上のペプチド結合の破壊が関与し得る。開裂が小分子標的に適用されるとき、開裂には、1つ以上の炭素結合又はスルフィド結合の破壊が関与し得る。開裂がヌクレオチド配列に適用されるとき、開裂には、1つ以上のリン酸ジエステル結合の破壊が関与し得る。開裂が微生物、例えば、細菌、真菌、又はウイルスに適用されるとき、開裂には、膜又はカプシド構造の溶解が関与し得る。開裂は、酵素、例えば触媒活性外因性抗原ポリペプチドによって行われ得る。外因性抗原は、例えば、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、又はプロテアーゼ活性を含み得る。

#### 【0463】

「対象の循環系」は、本明細書で使用されるとき、血漿及び全ての循環細胞及び分子を含め、ヒトにおいて全血及び任意選択でリンパ系によって占有される、且つあらゆる組織の動脈、静脈、毛細血管、及びリンパ管全体にわたって分布する空間を包含する。「循環濃度」は、循環系として定義される空間にある標的、例えば、細胞、ポリペプチド（抗体、病原性抗原など）、治療剤、小分子、代謝産物又は他の実体、外因性抗原又は外因性抗原発現EHCの濃度である。特定の実施形態において、濃度は、所与の容積中にある遊離（未結合）実体の数として定義され得る。他の実施形態において、濃度は、所与の容積中にある実体の総数として定義され得る。

#### 【0464】

本明細書で使用される用語「相補性決定領域（CDR）」は、免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の変領域に見られるアミノ酸配列を指す。CDRは抗体の特異性を決定し、抗原の特定のエピトープに結合するための接触残基を提供し得る。重鎖及び軽鎖は、それぞれ3つのCDR（CDRH1、CDRH2、及びCDRH3、並びにCDRL1、CDRL2、及びCDRL3）を含み得る。CDRと比べてより高度に保存されたアミノ酸配列を有する4つのフレームワーク領域が、VH又はVLにおいてCDR領域を分けている。

#### 【0465】

「複合体」は、本明細書で使用されるとき、2つ以上の実体が結び付いたものを含む。複合体は、1つ以上のポリペプチド、核酸、脂質、炭水化物、無機化合物、有機化合物などを含み得る。複合体は機能性（マルチユニットポリペプチド）又は非機能性（例えば、凝集物又は沈殿物）であってもよく、有益又は有害な特性を有し得る（例えば、免疫複合体）。複合体は天然に存在するものであってもよく、又は人工若しくは合成のものであってもよい。合成複合体には、それが合成化合物又は分子を含む場合には、高次の実体、例えば細胞内構造及び細胞が含まれる。

#### 【0466】

アミノ酸配列に関して、コード配列における単一のアミノ酸又はごく一部のアミノ酸を改変するか、付加するか、又は欠失させる核酸、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質配列に対する個々の置換、欠失又は付加は、改変が化学的に同様のアミノ酸によるアミノ酸置換をもたらす場合に「保存的に修飾された変異体」であることは、当業者であれば

10

20

30

40

50

認識するであろう。本明細書で使用されるとき、用語「保存的アミノ酸置換」は、以下の群の各々の範囲内におけるアミノ酸間の置換によって例示される：(1)グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、(2)フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、(3)セリン及びスレオニン、(4)アスパラギン酸及びグルタミン酸、(5)グルタミン及びアスパラギン、及び(6)リジン、アルギニン及びヒスチジン。

【0467】

「低下する」は、治療される疾患、障害又は病態の症状との関連では、症状として現れる疾患又は病態に関連する計測可能又は伝達可能なパラメータの減少を指す。計測可能なパラメータの例は、対象の体温の減少、対象から採取された試料中の標的濃度の減少、炎症の強度又は炎症範囲のサイズの減少、浸潤細胞数の減少、疾患、障害又は病態に関連するエピソード数の減少、臓器サイズの増加/低下、体重増加/減少等である。伝達可能なパラメータの例は、例えば、対象によるウェルビーイング及びクオリティオブライフの自己評価である。例えば、自己抗体媒介性疾患について、低下は以下のパラメータの1つ、又はそれらの組み合わせとして定量化され得る：炎症減少、突然の再発の減少、疲労減少、血液凝固減少、腫脹減少、エネルギー増加、又は発毛増加等。定量化され得るパラメータは、治療下の特定の疾患、障害又は病態を評価するのに適切なものである。遅延は、治療される疾患、障害又は病態の症状との関連では、本来増悪するようになり得る管理可能な健康状態を治療を用いて大幅に延長することを指す。

10

【0468】

「分解する」は、標的が直接、或いは間接的に、減少し、不活性化され、分割され、解体され、溶解され、溶け、壊れ、少なくなり、損なわれ、弱まり、劣化し、小さくなり、又は分配されるプロセスとして定義される。

20

【0469】

「異なるポリペプチド由来」は、ポリペプチドをコードする遺伝子配列、ポリペプチド、又はその一部分の供給源となる生物又は種を指す。特定の実施形態において、異なるポリペプチド由来のポリペプチドを含む融合物は、ヒトアデノシンデアミナーゼの遺伝子配列及びクロモバクテリウム・ビオラセウム (*chromobacterium violaceum*) 由来のフェニルアラニンヒドロキシラーゼの遺伝子配列によってコードされる外因性抗原ポリペプチドを含み得る。

30

【0470】

「ドメイン」は、ポリペプチド、例えば外因性抗原ポリペプチドのうちの、概して三次元構造を有し、且つ個別的な活性、機能、例えば、触媒的、酵素的、構造的役割、又は結合機能を呈し得る一部である。

【0471】

「濃厚細胞集団」とは、実質的に特定の目的細胞を含む細胞の集団を意味する。濃厚集団では、集団中の細胞の50%以上、例えば、集団中の細胞の50%、60%、70%、通例では80%、85%、90%、より通例では92%、95%、96%、97%、98%、又は99%、ときには100%が目的細胞である。細胞の複合混合物又は不均一培養物からの目的細胞の分離は、当該技術分野において公知の任意の好都合な手段、例えば、アフィニティー試薬でコーティングされた磁気ビーズを使用する磁気分離、アフィニティークロマトグラフィー、又は固体マトリックス、例えばプレートに付着させたアフィニティー試薬による「パニング」などのアフィニティー分離技術、又は他の好都合な技術によって行われ得る。正確な分離を提供する他の技術としては、マルチカラーチャンネル、小角及び鈍角光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネル等、精巧さの程度が様々であり得る蛍光活性化セルソーターが挙げられる。細胞は、死細胞に関連する色素を用いることにより、死細胞に対して選択され得る。所望の細胞の生存能に過度に有害でない任意の技術が用いられ得る。

40

【0472】

「除核」は、核の不活性化又は除去のいずれかによって細胞を非複製状態にすることである。

50

## 【0473】

「エピトープ」は、抗体又は他のリガンド又は結合分子が結合する抗原上の任意のセグメントを含む。エピトープは、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、通常、特定の三次元構造特性、並びに特定の電荷特性を有し得る。一部の実施形態において、外因性抗原は特定のエピトープを含む。一部の実施形態において、標的は特定のエピトープを含む。

## 【0474】

「赤血球系細胞」は、本明細書で使用されるとき、有核赤血球、赤血球前駆体、及び除核赤血球並びに表A1に列挙されるものを含む。例えば、赤血球系細胞は、臍帯血幹細胞、CD34+細胞、造血幹細胞(HSC)、脾臓コロニー形成(CFU-S)細胞、骨髓球系共通前駆(CMP)細胞、未分化胚芽細胞コロニー形成細胞、赤芽球バースト形成細胞(BFU-E)、巨核球-赤芽球系前駆(MEP)細胞、赤芽球コロニー形成細胞(CFU-E)、網赤血球、赤血球、人工多能性幹細胞(iPSC)、間葉系幹細胞(MSC)、多染性正赤芽球、正染性正赤芽球、又はそれらの組み合わせである。一部の実施形態において、赤血球系細胞は不死細胞又は不死化細胞である。例えば、不死化赤芽球細胞は、CD34+造血前駆細胞のレトロウイルス形質導入によりOct4、Sox2、Klf4、cMycを発現させ、及びTP53を抑制することにより作成し得る(例えば、Huang et al., Mol Ther 2013, epub ahead of print September 3に記載されるとおり)。加えて、細胞は自己使用が意図され、又は同種血輸血源を提供し得る。赤血球系細胞を外因性抗原と接触させることにより外因性抗原発現EHCを作成することができる。外因性抗原を含む赤血球系細胞は、外因性抗原発現EHCの一例である。一部の実施形態では、赤血球系細胞は培養される。一部の実施形態では、赤血球系前駆細胞を外因性抗原と接触させることにより外因性抗原発現EHCが作成される。

## 【0475】

本明細書で使用されるとき、用語「血小板系細胞」は、例えば巨核球及び血小板を含めた幹細胞-巨核球-血小板系統の細胞、又はトロンボポエチンによって分化が誘導される細胞、又はこの系統に関連する表面マーカー、例えば、CD41(GPIIb/IIIa)、CD42a(GPIX)、CD42b(GPIb)、及びCD61(avb3、ピトロネクチン受容体)、PAC-1(活性化IIb/IIIa)、CD62P(P-セレクチン)、CD31(PECAM)及びCD63を発現する細胞を指す。

## 【0476】

本明細書で使用されるとき、用語「除核造血細胞」(EHC)は、本明細書に定義するとおり除核されるか又は除核された状態にされているヒト又は非ヒト造血細胞を指す。この定義は、本明細書に定義するとおりの「赤血球系細胞」及び「血小板系細胞」の両方を包含する。

## 【0477】

本明細書で使用されるとき、用語「賦形剤」は、化合物の投与をさらに促進するため医薬組成物に加えられる不活性物質を指す。賦形剤の例としては、限定はされないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖類及び各種デンプン、セルロース誘導體、ゼラチン、植物油、抗凝固薬、及びポリエチレングリコールが挙げられる。

## 【0478】

用語「外因性」は、本明細書で使用されるとき、天然では細胞内に見られない炭水化物、多糖、脂質、オリゴヌクレオチド又はポリペプチドによって生じる細胞成分又は機能、或いは例えば外因性ポリペプチド抗原と内因性タンパク質又はその機能断片とを含む融合タンパク質を含めた、細胞にとって内因性の細胞成分又は機能の増強又は操作を意味する。外因性抗原は、外因性抗原ポリペプチドを含め、「外因性」又は「異種」であり、従って外因性抗原は、異なるポリペプチド又は種由来のドメインを含む融合物又はキメラなど、天然に存在しないものであり得るか、非修飾赤血球又は血小板など、天然に存在する細胞中に天然に存在しないものであり得るか、天然に存在するポリペプチドが機能するのと

10

20

30

40

50

同じようには機能しないものであり得るか、或いは、例えば非修飾細胞における天然に存在するポリペプチドの発現と比較したとき外因性抗原が過剰発現する実施形態において、外因性抗原ポリペプチドが存在する量では天然に存在しないものであり得る。一部の実施形態において、ポリペプチド外因性抗原は外因性核酸から発現する。一部の実施形態において、外因性抗原は供給源から単離され、外因性抗原発現 EHC に負荷されるか、又はそれとコンジュゲートされる。用語「外因性」は、核酸との関連で使用されるとき、トランス遺伝子及び組換え核酸を含む。

【0479】

本明細書で使用されるとき、用語「発現」又は「発現する」は、転写及び翻訳を含めた、ポリペプチド、例えば外因性抗原ポリペプチドが産生されるプロセスを指す。発現は、例えば、ポリペプチドをコードする遺伝子の数を増加させること、遺伝子の転写を（遺伝子を構成的プロモーターの制御下に置くなどして）増加させること、遺伝子の翻訳を増加させること、競合遺伝子をノックアウトすること、又はこれらの組み合わせ及び/又は他の手法を含め、幾つかの手法によって増加させ得る。用語「発現」又は「発現する」にはまた、一度 EHC によって活性に発現されたが、それ以降、活性発現（転写及び翻訳として定義される）が止んでいる外因性ポリペプチドを含む EHC も含まれる。例えば、外因性抗原ポリペプチドは、除核イベントの前に EHC によって活性に発現した（即ち転写及び翻訳された）と共に、除核後も抗原ポリペプチドが EHC によって保持されているが、例えばコード核酸を欠くため、もはや活性に発現することはない。例えば、EHC は、外因性核酸によってコードされる外因性抗原ポリペプチドを含み得る。除核中、外因性抗原ポリペプチドは EHC によって保持され、一方、外因性核酸は保持されず、かかる EHC は、抗原ポリペプチドの活性発現（転写及び翻訳）が事実上終了し、及び/又は EHC が実質的な量の複製核酸を含まない場合であっても、「抗原発現の」又は「抗原を発現する」と言われる。

【0480】

「機能性」外因性抗原又は外因性抗原発現 EHC は、酵素活性、触媒活性又は代謝活性、構造的完全性、免疫原性の補完性、標的結合、及び正しい局在化を含めた所望の又は指定の活性又は特性を呈するか、或いは所望の又は指定の効果又は表現型を促進する能力を有する。

【0481】

「融合物又はキメラ」は、天然では一緒に見られることのない2つ以上の配列の組み合わせから誘導されるポリペプチド配列、又は対応するコードヌクレオチド配列である。これは、同じゲノム内の別個の遺伝子に由来するか、又は明確に異なる種のゲノムに由来する異種遺伝子に由来する別個の配列の組み合わせであり得る。

【0482】

「遺伝物質」は、遺伝子をコードする能力を有するアデノシン、チミン、ウラシル、シトシン、及びグアニンのヌクレオチド配列を有する核酸分子を指す。

【0483】

本明細書で使用される用語「重鎖」は、抗原に対する特異性を決定するアミノ酸配列を有する可変領域（VH）と、3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）を有する定常領域とを含む完全長重鎖、及びその断片を含むものと理解される。加えて、本明細書で使用される用語「軽鎖」は、抗原に対する特異性を決定するアミノ酸配列を有する可変領域（VL）と定常領域（CL）とを含む完全長軽鎖、及びその断片を含むものと理解される。

【0484】

用語「相同体」は、その一次、二次又は三次構造において対応する位置に同じ又は保存された残基を有する外因性抗原ポリペプチドを含めたポリペプチドを示す。機能的相同体には、同様の機能及び/又は（例えば特定の標的に対する）特異性を呈する外因性抗原及び他のポリペプチドが含まれる。

【0485】

天然に存在するインタクトな抗体、又は免疫グロブリンは、4つのポリペプチド、即ち2つの完全長軽鎖及び2つの完全長重鎖を含み、ここで各軽鎖はジスルフィド結合によって重鎖と連結している。各重鎖は定常領域と可変領域とを有する。同様に、各軽鎖が定常領域と可変領域とを有する。5つの重鎖クラス(アイソタイプ)、即ちガンマ( )、ミュー(μ)、アルファ( )、デルタ( )、又はイプシロン( )があり、さらに幾つかのサブクラス、ガンマ1( 1)、ガンマ2( 2)、ガンマ3( 3)、ガンマ4( 4)、アルファ1( 1)、及びアルファ2( 2)がある。軽鎖定常領域はカッパ( )型又はラムダ( )型のいずれかであり得る。可変領域は抗体間で配列が異なり、所与の抗体の、その特定の抗原に対する結合及び特異性に用いられる。

【0486】

10

本明細書で使用されるとき、用語「増加させる」、「増強する」、「刺激する」、及び/又は「誘導する」(及び類似の用語)は、概して、天然、予想、若しくは平均と比べて、又は対照条件と比べて濃度、レベル、機能、活性、又は挙動を直接的又は間接的に改善するか、又は増加させる行為を指す。

【0487】

本明細書で使用されるとき、用語「阻害する」、「抑制する」、「低下させる」、「妨害する」、及び/又は「低減する」(及び類似の用語)は、概して、天然、予想、若しくは平均と比べて、又は対照条件と比べて濃度、レベル、機能、活性、又は挙動を直接、或いは間接的に低減する行為を指す。

【0488】

20

「ライブラリ」は、本明細書で使用されるとき、多様な核酸配列を有する核酸分子(例えば、DNA、RNA)のコレクション、遺伝的に多様なクローンコレクション、多様なポリペプチドのコレクション、EHCなどの細胞の多様なコレクション等を含む。

【0489】

本明細書で使用されるとき、「哺乳類対象」には、あらゆる哺乳動物、例えば限定されることなく、ヒト、家畜(例えば、イヌ、ネコなど)、農業動物(例えば、雌ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど)及び実験動物(例えば、サル、ラット、マウス、ウサギ、モルモットなど)が含まれる。用語「個体」、「対象」、「宿主」、及び「患者」は、本明細書では同義的に使用され、診断、処置、又は治療が所望される任意の哺乳類対象、特にヒトを指す。本明細書に記載される方法はヒト治療及び獣医学適用の両方に適用可能である。一部の実施形態において、対象は哺乳動物であり、他の実施形態では対象はヒトである。

30

【0490】

「医療器具」は、所定量の外因性抗原発現EHC及び/又は治療剤の送達に用いられる任意の装置、器具又は機械を指す。これには、容器、ボトル、バイアル、シリンジ、バッグ、カートリッジ、カセット、マガジン、シリンダ、又はキャニスターが含まれる。

【0491】

「医療用キット」は、医療器具又はアプリケーション、任意選択で治療剤を含む外因性抗原発現EHCの適切な投薬量、並びに関連する表示及び説明書を含む包装されたユニットを指す。

【0492】

40

本明細書で使用されるとき、用語「モジュレートする」、「モジュレートしている」、「修飾する」、及び/又は「モジュレーター」は、概して、特定の濃度、レベル、発現、機能又は挙動を増加又は低下により、例えば、直接又は間接的に促進/刺激/上方制御するか、又は妨害/阻害/下方制御することにより改変する能力、例えば拮抗薬又は作動薬として作用する能力を指す。場合によっては、モジュレーターは、対照と比べて、又は一般に予想され得る平均活性レベルと比べて、又は対照活性レベルと比べて特定の濃度、レベル、活性又は機能を増加及び/又は低下させ得る。

【0493】

「膜」は、本明細書で使用されるとき、1つ以上の生物学的化合物、典型的には脂質と、任意選択でポリペプチドとを含む、内部空間を外部空間と分ける境界層である。膜は脂

50



質二重層であってもよい。特定の実施形態において、膜は、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジリエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、又はホスファチジン酸の1つ以上を含む。一部の実施形態において、膜は、アンキリン及び補酵素Q10などの1つ以上のポリペプチドを含む。膜の定義には、例えばリン脂質二重層及び細胞膜結合ポリペプチドを含む細胞膜が含まれる。

【0494】

語句「核酸分子」は、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の一本鎖又は二本鎖ポリマーを指す。核酸分子には、組換えであってもよい、且つ核酸が細胞に導入されたときにそこから外因性ポリペプチドが発現し得る染色体DNA及び自己複製プラスミド、ベクター、mRNA、tRNA、siRNA等が含まれる。

10

【0495】

オルソログは、共通の先祖遺伝子から種分化によって進化した異なる種の遺伝子として定義される。

【0496】

用語「薬学的に許容可能な」及びその文法上の変化形は、組成物の投与が禁忌となり得る程の望ましくない生理学的作用を生じることのない、対象に対して又は対象上に投与可能な組成物、担体、希釈剤及び試薬を指す。例えば、「薬学的に許容可能な賦形剤」には、概して安全で非毒性の、且つ望ましい医薬組成物の調製において有用な賦形剤が含まれ、及び動物への使用並びにヒト医薬品への使用が許容される賦形剤が含まれる。かかる賦形剤は、固体、液体、半固体、又はエアロゾル組成物の場合には気体であり得る。

20

【0497】

本明細書で使用されるとき、用語「薬学的に許容可能な担体」は、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、エマルション、例えば油/水又は水/油、及び各種の湿潤剤などの任意の標準医薬担体を含む。この用語はまた、ヒトを含む動物での使用に関して米国連邦政府の規制当局によって承認されているか又は米国薬局方に掲載されている任意の薬剤、並びに対象に重大な刺激作用を引き起こさず、且つ投与化合物の生物学的活性及び特性を消失させることのない任意の担体又は希釈剤も包含する。

【0498】

一部の薬剤は、例えば無機酸及び有機酸から調製される「薬学的に許容可能な塩」として投与され得る。無機酸から誘導される塩には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などが含まれる。有機酸から誘導される塩には、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などが含まれる。塩はまた、無機塩基及び有機塩基から調製することもできる。無機塩基から誘導される塩には、単に例として、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩及びマグネシウム塩が含まれる。有機塩基から誘導される塩には、限定はされないが、第一級、第二級及び第三級アミンの塩が含まれる。当業者であれば、過度の実験を行うことなく、本発明の実施に適した薬学的に許容可能な担体、その薬学的に許容可能な塩をどのように選択するべきかは分かるであろう。

30

40

【0499】

本明細書で使用されるとき、用語「医薬組成物」は、例えば、1つ以上の他の化学成分、例えば生理学的に許容可能な担体及び賦形剤と混合されるか若しくは混ぜ合わされるか、又はそれに懸濁される外因性抗原発現EHCなどの、本明細書に記載される化合物の1つ以上を指す。医薬組成物の1つの目的は、対象への化合物の投与を促進することである。

【0500】

特定の実施形態は、所望の機能又は活性に関連する配列を有する様々なポリペプチド分子、例えば外因性抗原ポリペプチドを提供する。ポリペプチドは、翻訳後修飾(例えば、

50

リン酸化又はグリコシル化)及び/又はさらなるポリペプチドとの複合体形成、核酸及び/又は炭水化物、又は他の分子とのマルチサブユニット複合体への合成に関わらず、アミノ酸残基の鎖を指す用語である。従ってプロテオグリカンもまた、本明細書ではポリペプチドと称される。特定の実施形態において、外因性抗原発現 E H C はポリペプチド外因性抗原を含む。特定の実施形態において、外因性抗原発現 E H C は、任意選択で膜結合性の、1つ以上の非外因性抗原ポリペプチドを含む。

#### 【0501】

用語「薬学的に活性な薬剤」又は「医薬品」は、対象への投与時に対象に対して計測可能又は伝達可能な効果を有する任意の化合物、例えば、小分子薬物、又は生物製剤(例えば、ポリペプチド薬物又は核酸薬物)として定義され、例えばそれは、疾患、障害又は病態の症状を緩和又は軽減する。一部の実施形態において、医薬品は外因性抗原発現 E H C の送達前に、その送達と組み合わせて、又はその送達後に投与され得る。一部の実施形態において、薬学的に活性な薬剤は外因性抗原発現 E H C との相乗的治療効果を及ぼす。一部の実施形態において、薬学的に活性な薬剤は外因性抗原発現 E H C との相加的治療効果を及ぼす。

#### 【0502】

「プロモーター」は、作動可能に連結された核酸の転写を指図する一連の核酸制御配列として定義される。プロモーターには転写開始部位近傍の必須核酸配列が含まれる。プロモーターにはまた、任意選択で、遠位エンハンサー又はリプレッサーエレメントも含まれる。「構成的」プロモーターは、ほとんどの環境及び発生条件下で活性を有するプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、環境又は発生調節下で活性を有するプロモーターである。用語「作動可能に連結された」は、核酸発現制御配列(プロモーター、又は一連の転写因子結合部位など)と第2の核酸配列との間の機能的連結を指し、ここで発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写を指図する。

#### 【0503】

「外因性抗原」は、本明細書で使用されるとき、標的との相互作用能を有して、例えば標的と会合するか、又はそれに結合する実体である。外因性抗原はポリペプチドを含むか、又は本質的にポリペプチドからなり得る。一部の実施形態において、外因性抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、小分子、又はそれらの組み合わせを含む。外因性抗原が天然に存在する化合物又は分子である実施形態において、その抗原は、E H C におけるその存在に関してそれが外因性又は異種化合物又は分子であるという意味において「外因性」である。他の実施形態では、抗原は、それが人工化合物又は分子、例えば融合物又はキメラ、天然に存在しないポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、又はそれらの組み合わせ、又は人工小分子又は他の治療剤であるという意味において「外因性」である。例えば、外因性抗原は、Sドメイン、Aドメイン及びUドメインのうちの1つ以上を含む融合物又はキメラを含み得る。Sドメインは、対象の循環系など、E H C の周りの環境に露出した表面ドメインである。Aドメインは、SドメインをE H C の細胞膜に取り付けるアンカードメインである。UドメインはE H C の非露出側に向いているか、又はその中(即ちその細胞内空間)に位置している。いかなるドメインとも無関係に、外因性抗原は外因性抗原発現 E H C の表面上に位置してもよく、又はE H C 内に位置してもよい。外因性抗原は外因性抗原発現 E H C の膜と会合してもよく、例えば外因性抗原は膜にアンカリングするか、コンジュゲートするか、又は他の方法で結合する。一部の実施形態において、外因性抗原は化学的又は酵素的コンジュゲーションによって外因性抗原発現 E H C の膜にコンジュゲートし得る。他の実施形態において、外因性抗原は膜にコンジュゲートしない。一部の実施形態において、外因性抗原は外因性抗原発現 E H C の膜と会合せず、E H C の膜に囲まれた細胞内空間内に位置する。一部の実施形態において、E H C の細胞内空間内に位置する外因性抗原は実質的にE H C から拡散して出ることなく、及び/又は膜を透過しないこともある。他の実施形態において、外因性抗原は実質的にE H C から拡散して出ることあり、及び/又は膜を透過することもある。一部の実施形態において、外因性抗原はE H C に負荷され、例えばそれに導入されるか、又はそこに置かれる。負荷される外

10

20

30

40

50

因性抗原は外因性抗原発現 E H C によって生物学的に合成されるものではない。負荷に好適な外因性抗原は、例えば、細胞ベースの発現系において産生されるか、生物学的試料から単離されるか、又は化学的若しくは酵素的に合成され、次に E H C 内に、又はその上に負荷され得る。一部の実施形態において、外因性抗原は負荷後に外因性抗原発現 E H C によってさらに修飾され得る。他の実施形態において、外因性抗原は負荷後に修飾されない。一部の実施形態において、外因性抗原ポリペプチドは E H C 上又はその中に負荷されない。一部の実施形態において、外因性抗原は外因性抗原発現 E H C によって作られ、例えば生物学的に合成される。典型的には、外因性抗原ポリペプチドは、E H C に導入された外因性核酸分子（例えば、DNA 又は mRNA）から外因性抗原発現 E H C によって発現される。外因性抗原は、E H C 上で抗原が発現したときにも保持される生物学的機能を有し得る。外因性抗原は標的に結合し、及び/又は標的を隔絶し得る。それに代えて又は加えて、外因性抗原は標的に対して触媒活性を呈してもよく、例えば外因性抗原は標的を変換若しくは修飾してもよく、又は標的を分解してもよい。次には任意選択で外因性抗原から産物が放出され得る。

10

**【0504】**

外因性抗原発現 E H C の「滞留性」は、それが生理学的位置で費やす期間を指す。外因性抗原発現 E H C の具体的な位置は、その寿命中に変化することもあり、「滞留性」は、血管循環、末梢組織、毛細血管、消化器系、肺系統、鼻組織、表皮表面、及び間質組織を含めた様々な環境で費やされる期間に適用される。具体的な実施形態において、外因性抗原発現 E H C は対象の循環系に滞留する。

20

**【0505】**

「複製核酸」は、DNA のコピー数を増加させることに特化した酵素によってコピーされることが可能なデオキシリボ核酸 (DNA) を指す。通常、DNA 複製は、1 つの元の DNA 分子から 2 つの同一の複製物の産生をもたらす。DNA 複製は、鋳型鎖に適合する DNA ポリメラーゼによってリン酸ジエステル結合の作成を介して成長する DNA 鎖にヌクレオチドが 1 つずつ取り込まれることを含む。

**【0506】**

「隔絶する」は、標的を閉じ込めること、塞ぐこと、分離すること、隔離すること、隠すこと、遮断すること、又は孤立させること、及び標的がその環境と自由に相互作用するのを阻止することとして定義される。

30

**【0507】**

「特異的に結合する」又は「特異的に相互作用する」は、本明細書で使用される時、これらの用語が化学及び生化学技術分野の当業者によって理解されるとおり、可飽和であり、多くの場合に可逆的であり、従って競合的である、2 つの実体（例えば、標的と外因性抗原、例えば、抗体と抗原、受容体とリガンド、酵素と基質、ピオチンとアビジン等）の間の任意の相互作用を記載する。例えば、生体分子、例えばタンパク質、ペプチド及び核酸などが関与する特異的結合は、結合対の一方のメンバーが、その部位とのコグネイトリガンドの相互作用が有利なエネルギー論（即ち、負の結合自由エネルギー）によって特徴付けられるような荷電、極性、又は疎水性部分の形状及び分布を備える部位を有するときに起こる。相互作用の特異性は結合定数 ( $K_d$ ) として計測又は表現され得る。 $K_d$  は、 $pM$  範囲、 $\mu M$  範囲及び  $nM$  範囲を含め、 $mM$  範囲 ~  $fM$  範囲の範囲であってもよい。典型的な  $K_d$  値は、約  $10^{-6} M$  未満、約  $10^{-7} M$  未満、約  $10^{-8} M$  未満、及び一部の実施形態では約  $10^{-9} M$  未満である。

40

**【0508】**

本明細書で使用される時、用語「実質的に」又は「実質的な」は、例えば、特定の空間にある実体の存在、レベル、又は濃度、1 つの実体がもう 1 つの実体に及ぼす効果、又は治療の効果を指す。例えば、実体の活性、レベル又は濃度は、増加がベースラインと比べて 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、50 倍、100 倍、又は 1000 倍である場合に実質的に増加する。実体の活性、レベル又は濃度はまた、増加がベースラインと比べて 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、10

50

0%、200%、又は500%である場合に実質的に増加する。実体は、それを当該技術分野において公知の方法によって検出することができる場合に特定の空間に実質的に存在し得る。実体は、それが当該技術分野において公知のアッセイ及び方法の検出限界未満のレベルで存在する場合、特定の空間に実質的に存在しないとし得る。一部の実施形態において、実体は、それがほとんど検出不能であるが、表現型を生じさせたり又はそれを変化させたりすることのない非機能的な量又は微量であれば検出可能である場合、特定の空間に実質的に存在しないとし得る。他の実施形態において、実体は、それが集団を構成する構成成分の少数、例えば、集団の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満又は1%、0.5%、0.1%未満の構成成分のみに存在し、検出することができる場合、特定の集団に実質的に存在しないとし得る。例えば、外因性核酸は除核時に保持されないこともあり、細胞が非複製にされ、及び除核細胞は、その外因性核酸によってコードされる外因性抗原ポリペプチドを継続的に発現する能力を有しない。細胞が外因性ポリペプチドを有意に翻訳し続ける能力を失うと、タンパク質発現は「事実上終結する」。特定の実施形態において、外因性抗原発現EHCは、実質的に自己複製能、例えば核酸の複製能を有しない。例えば、外因性抗原発現EHCは、取込みアッセイで標識ヌクレオシド、例えばチミジンと接触させた場合に実質的にヌクレオシドを取り込まない。一部の実施形態において、外因性抗原発現EHCは実質的な量の自己複製核酸を含まない。ポリヌクレオチド又は核酸配列の「実質的な同一性」という用語は、ポリヌクレオチドが、少なくとも25%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。或いは、同一性パーセントは25%~100%の任意の整数であり得る。より好ましい実施形態は、本明細書に記載されるプログラム、好ましくは標準的なパラメータを用いるBLASTを使用して参照配列と比較して少なくとも：25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%を含む。

10

20

#### 【0509】

「合成」は、人工の、或いは天然に存在しない化合物又は分子、又はそれが天然に存在する場合、自然には存在しないコンテキスト又は位置に置かれているか、又はそれがそのコンテキスト又は位置に自然に存在する場合、自然にはそのコンテキスト又は位置に存在しない純度状態であるか、又はそのような量、濃度又は数で存在する化合物又は分子を指す。合成実体は、任意選択でその自然状態から化学的又は酵素的に修飾されている単離又は精製化合物、外因性核酸、外因性(異種)外因性抗原などであってもよい。本明細書に定義するとおりの、任意の実体における合成化合物又は分子の存在は、実体全体を「合成」にする。例えば、外因性抗原を含む細胞は、合成細胞である。

30

#### 【0510】

「標的」は、本明細書で使用されるとき、外因性抗原との相互作用能を有して、例えば外因性抗原と会合するか、又はそれに結合する実体である。「標的」には、限定はされないが、ポリペプチド(例えば、抗体又は抗体関連ポリペプチド、補体構成成分、アミロイドタンパク質、病原体、毒素、プリオン)、分子(例えば、代謝産物、ステロイド、ホルモン、炭水化物;オリゴ糖;化学物質;多糖、DNA;RNA;脂質、アミノ酸、エレメント、毒素又は病原体)、複合体(例えば、免疫複合体)、又は細胞(例えば、癌細胞、マクロファージ、細菌、真菌、ウイルス、又は寄生虫)が含まれる。標的は、本明細書に提供される方法によって検出されるか、診断されるか、損なわれるか、破壊されるか、又は改変される(例えば、機能的に補完される)ことが意図される。特定の標的は遊離して存在してもよく、又は対象の循環系における他の実体と会合している。

40

#### 【0511】

「標的自己抗体」は、本明細書で使用されるとき、自己免疫疾患に関連する自己抗体である。かかる自己抗体は、対象の抗体を対象自体の組織、通常は甲状腺、胃、肝臓、及び腎臓組織の試料と接触させることを含む抗体結合試験を用いて検出及び分析され得る。「自己」組織(自己抗原を含む)に結合する抗体は、自己免疫障害の指標である。

#### 【0512】

50

「トランス遺伝子」又は「外因性核酸」は、EHCに導入される外来性又は天然ヌクレオチド配列を指す。トランス遺伝子と外因性核酸とは本明細書では同義的に使用され、組換え核酸を包含する。

【0513】

本明細書で使用されるとき、「治療する」、「治療している」、及び/又は「治療」は、有益な又は所望の臨床結果、薬理的及び/又は生理的效果、例えば、症状の緩和を達成し、前記症状を予防又は解消するための手法であり、特定の疾患、障害又は病態の療法的治療及び予防的 (prophylactic) 又は予防的 (preventative) 治療の両方を指す。有益な又は所望の臨床結果、薬理的及び/又は生理的效果としては、限定はされないが、疾患、障害又は病態に罹り易いこともあるが、未だ疾患の症状を起こしていない又は呈していない対象における疾患、障害又は病態の発生の防止 (予防的治療)、疾患、障害又は病態の症状の緩和、疾患、障害又は病態の程度の縮小、疾患、障害又は病態の安定化 (即ち、悪化させないこと)、疾患、障害又は病態が広がることの防止、疾患、障害又は病態の進行の遅延又は緩徐化、疾患、障害又は病態の改善又は寛解、及びそれらの組み合わせ、並びに治療を受けない場合の予想生存時間と比較した生存時間の延長が挙げられる。

10

【0514】

「治療剤」又は「治療用分子」は、化合物又は分子であって、有効量で存在するとき、それを必要としている対象に所望の治療効果、薬理的及び/又は生理的效果を生じる化合物又は分子を含む。

20

【0515】

用語「治療有効量」又は「有効量」は、有益な又は所望の臨床結果、薬理的及び/又は生理的效果を生じさせるのに十分である、対象に投与される薬剤の量である。有効量は1回以上の投与で投与することができる。有効量は、典型的には、病状の進行を緩和するか、改善するか、安定化させるか、逆転させるか、緩徐化するか、又は遅延させるのに十分である。従って有効量とは、所望の治療的及び/又は予防的效果を妥当に実現するのに十分な薬剤の量又は薬剤の特定の量の投与頻度を指す。例えば、有効量は、治療下の疾患又は病態、例えば、免疫トランスが望ましい自己免疫反応、過活性の免疫活性化、又は阻害抗体産生に関連する疾患又は医学的状態、又は標的ポリペプチドに関連する疾患又は医学的病態に関連する症状の予防、治療、又は低下をもたらす量を含み得る。対象に投与される治療組成物の量は、疾患のタイプ及び重症度並びに個体の特徴、例えば、全般的な健康、病状、食事、年齢、性別、体重及び薬物に対する忍容性に依存し得る。その量はまた、疾患の程度、重症度及びタイプにも依存し得る。さらに、有効量は、用いられる製剤化及び投与方法、例えば、投与時間、投与経路、排泄速度、及び反応感受性に依存し得る。当業者は、これら及び他の要因に応じて適切な投薬量を決定することができるであろう。組成物はまた、1つ以上のさらなる治療化合物と組み合わせて投与することもできる。医薬組成物の望ましい投薬量は、成人について約  $0.001 \sim 100 \text{ mg/kg}$  の範囲であり得る。一例において、静脈内投与は最低限有効な用量で開始し、好ましい効果が観察されるまで、予め選択された時間経過にわたり用量を増加させる。続いて、現れ得る任意の有害作用を考慮しながら、対応する効果の増加が生じるレベルに限定して投薬量を漸増させる。好適な投薬量の非限定的な例は、例えば、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{13}$ 、又は  $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{12}$  個の本発明の外因性抗原発現 EHC の範囲であり得る。具体的な例としては、約  $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $2 \times 10^{11}$ 、 $3 \times 10^{11}$ 、 $4 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $6 \times 10^{11}$ 、 $7 \times 10^{11}$ 、 $8 \times 10^{11}$ 、 $9 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$  個、又はそれを超える本発明の外因性抗原発現 EHC が挙げられる。外因性抗原発現 EHC の各用量は、1日1回、週1回、週2回、月1回、又は月2回などの間隔で投与することができる。

30

40

【0516】

「未結合」は、外因性抗原が相互作用することが可能な標的の状態を指す。未結合標的

50

は、別の実体又は外因性抗原と会合していない。未結合外因性抗原は別の実体又は標的と会合していない。標的は、それが外因性抗原又は別の実体と会合した時点で「結合している」と見なされる。未結合標的は、循環中の可溶性形態の標的を含む。結合標的は、循環又は末梢組織中の実体に埋め込まれるか、それと会合するか、それに連結するか、又は他にそれと相互作用している標的を含む。標的が相互作用し得る実体には、循環細胞、末梢内皮組織、免疫複合体、糖脂質、微生物、免疫グロブリン、血清アルブミン、凝固因子、リポタンパク質、及び電解質が含まれる。

【0517】

「変異体」は、1つ以上のアミノ酸置換、欠失、挿入、又は他の修飾だけ元のタンパク質と異なるポリペプチドである。これらの修飾は、元のタンパク質の生物学的活性を大きく変化させることはない。多くの場合に、変異体は元のタンパク質の生物学的活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%を保持している。変異体の生物学的活性はまた、元のタンパク質より高くてもよい。変異体は、アレル変異又は多型などによる天然に存在するものであってもよく、又は意図的に操作されてもよい。

10

【0518】

変異体のアミノ酸配列は元のタンパク質と実質的に同一である。多くの実施形態において、変異体は元のタンパク質と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%、又はそれを超える大域的配列同一性又は類似性を共有する。配列同一性又は類似性は、ベーシックローカルアライメントツール(BLAST)、ドットマトリクス解析、又は動的計画法などの、当該技術分野において公知の様々な方法を用いて決定することができる。一例において、配列同一性又は類似性は、ジェネティクスコンピュータグループ(GCG)プログラムGAP(ニードルマン-ブッシュアルゴリズム)を使用して決定される。変異体及び元のタンパク質のアミノ酸配列は1つ以上の範囲で実質的に同一であり、しかし他の領域では相違があり得る。

20

【0519】

本明細書で使用されるとき、用語「ベクター」は、挿入された核酸分子、例えばトランス遺伝子又は外因性核酸を宿主細胞に及び/又はそれらの間で移動させ及び/又は複製する核酸分子、好ましくは自己複製核酸分子である。ベクターには、そのゲノムに組換えDNAの断片が挿入された、且つEHCへの組換えDNA又はトランス遺伝子の導入に用いられるプラスミド又はウイルス染色体が含まれる。

30

【実施例】

【0520】

以下の例は限定としてではなく、例示として提供される。

【0521】

実施例1：異種遺伝子発現を有する赤血球系細胞の培養

Mini-MACSカラム(Miltenyi Biotec; 94% ± 3%純度)の使用による超磁気マイクロビーズ選択法により、末梢血からCD34細胞を単離する。細胞は、安定化グルタミン、330 µg/mLホロヒトトランスフェリン、10 µg/mL組換えヒトインスリン、2 IU/mLヘパリン、及び5%溶剤/界面活性剤ウイルス不活化血漿を補充したIMDMをベースとする赤血球分化培地(EDM)で培養する。拡大手順には3つのステップが含まれる。第1のステップでは(0日目~7日目)、EDM中、1 µMヒドロコルチゾン、100 ng/mL SCF、5 ng/mL IL-3、及び3 IU/mL Epoの存在下で10<sup>4</sup>個/mLのCD34細胞を培養する。4日目に、SCF、IL-3、Epo、及びヒドロコルチゾンを含む4容積の新鮮培地中に1容積の細胞培養物を希釈する。第2のステップでは(7日目~11日目)、SCF及びEpoを補充したEDM中に10<sup>5</sup>個/mLで細胞を再懸濁する。第3のステップでは(11日目~18日目)、Epoのみを補充したEDM中で細胞を培養する。細胞数は11日目及び15日目にそれぞれ7.5 × 10<sup>5</sup> ~ 1 × 10<sup>6</sup>及び5 ~ 10 × 10<sup>6</sup>細胞/mLとなるように調整する。18日目を過ぎたら、Epoを含む培養培地を週2回取り替える

40

50

。培養物は5%CO<sub>2</sub>の空气中37℃に維持する。

【0522】

目的の抗原のコード配列を赤血球特異的プロモーター、例えばGATA-1の制御下に置き、ポリ-Aテールを末端とする(例えば、Repik et al., Clin Exp Immunol 2005, 140:230を参照)。この配列はレンチウイルスベクター(例えばEF1, System Biosciences, Inc.)にコードされる。このベクターは293T細胞から標準方法によって作製する。レンチウイルスベクターは、例えばChang et al., Nat Biotechnol 2006, 24:1017により記載されるとおり、培養1~4日目の間にヒト造血前駆細胞、例えばCD34+細胞又は不死化赤芽球又はiPS細胞に形質導入する。続く拡大及び分化段階は上記に記載したとおり行う。

10

【0523】

実施例2:低張/高張サイクルによる赤血球系細胞へのタンパク質の負荷

抗原、この場合OVAを、70%のヘマトクリット(Hct)として0.5又は5mg/mlの最終濃度でRBC懸濁液に加える。低張透析プロセス(50mOsmol/kg)の後、高張液(1900mOsmol/kg)を37℃で30分間加えることによりRBCを遊離させる。OVAが負荷されたRBCを0.9%NaCl+0.2%グルコース溶液で4回洗浄し、1000×g、4℃で10分間遠心し、血漿又は緩衝液で50%のHctに調整する。

【0524】

20

実施例3:ヘテロ二官能性クロスリンカーによる細胞表面標識

5mM TCEPと共にインキュベートすることにより、露出した還元チオール基を有する抗原(抗原-SH)を調製する。サイズ排除クロマトグラフィーによって還元剤を取り除いた後、コンジュゲーションを行う。細胞をマレイミド-PEG-NHSクロスリンカー、例えばSM(PEG)<sub>x</sub>(Thermo Scientific)と共に30分間インキュベートする。NHS基が細胞表面抗原上の遊離アミン基と反応する。反応した細胞をPBS中で洗浄して過剰なクロスリンカーを取り除く。細胞+クロスリンカー溶液に抗原-SH溶液を導入し、マレイミド-SH反応を30分間進行させる。細胞をペレット化し、洗浄して未結合の抗原を取り除く。

【0525】

30

実施例4:ソルターゼによる細胞表面標識

50mMトリス-Cl、pH7.5、150mM NaCl、1mM CaCl<sub>2</sub>からなる反応緩衝液中において、ソルターゼAアクセプター配列、LPXTGを含有する表面タンパク質を発現する細胞を100µMソルターゼAと共に37℃で4時間インキュベートする。10倍モル過剰の求核剤、GGG-抗原を導入し、反応を室温で一晩進行させる。この反応後、細胞をペレット化して洗浄することにより、過剰のソルターゼ及び未反応の求核剤を取り除く。

【0526】

実施例5:クリックケミストリーによる細胞表面標識

製造者の指示に従い(例えばGlen Research)、細胞をアルキン-NHSエステルと反応させて、アルキン基を細胞表面上の露出した第一級アミンとコンジュゲートする。細胞をペレット化して洗浄することにより、過剰なアルキン-NHSエステルを取り除く。製造者の指示に従い(例えばThermo Scientific)、抗原をアジド-NHSエステルと反応させて、アジド基を抗原上の露出した第一級アミンとコンジュゲートする。サイズ排除クロマトグラフィーによって過剰なアジド-NHSエステルを取り除く。室温での銅触媒付加環化によってアルキン-細胞及びアジド-抗原を反応させる。

40

【0527】

実施例6:マウスにおけるT細胞増殖の計測

CD8磁気ビーズネガティブ選択キット(Miltenyi Biotec)を製造者

50

の指示どおり使用して、OTI (CD45<sup>+</sup>2<sup>+</sup>) マウス脾臓からCD8<sup>+</sup> T細胞を単離する。新鮮に単離したCD8<sup>+</sup> OTI細胞をPBS中に再懸濁し、1 μM CFSE (Invitrogen) によって室温で6分間標識し、10% (vol/vol) FBS (Gibco) を含有する等容積のイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM) で反応を1分間クエンチする。細胞を洗浄し、カウントし、純粋IMDM中に再懸濁した後、注射する。合計  $3 \times 10^6$  個のCFSE標識CD8<sup>+</sup> OTI細胞をレシピエントCD45<sup>+</sup>1<sup>+</sup> マウスの尾静脈に静脈内注射する。短期増殖研究のため、養子移入24時間後にOVAを含む赤血球系細胞を注射する。抗原投与5日後に脾細胞を回収し、フローサイトメトリーによる分析用に染色する。

#### 【0528】

10

実施例7：マウスにおけるOVA抗原チャレンジモデル

合計  $3 \times 10^5$  個のCFSE標識OTI CD8<sup>+</sup> T細胞を上記に記載したとおりCD45<sup>+</sup>1<sup>+</sup> レシピエントマウスに注射する。養子移入の1日後及び6日後、マウスの尾静脈にOVAを含む赤血球系細胞100 μLを静脈内投与する。養子移入の15日後、マウスの各後肢足蹠に25 μLの生理食塩水中5 μgのOVA及び25 ngの超高純度大腸菌 (E. coli) LPS (InvivoGen) を皮内注射して攻撃誘発する (ホック (Hock) 法：総用量10 μgのOVA及び50 ngのLPS)。抗原特異的B及びT細胞及び血清抗体力価の定量化は以下に記載する。

#### 【0529】

実施例8：マウスにおける抗原特異的B及びT細胞の定量化

20

上記に記載したOVAチャレンジの4日後にマウスを殺処分し、再刺激用に脾臓及び流入領域リンパ節細胞を単離する。細胞内サイトカインのフローサイトメトリー解析のため、1 mg/mL OVA又は1 μg/mL SIINFELKLPепチド (Genscript) の存在下で細胞を3時間再刺激する。プレフェルジン-A (5 μg/mL; Sigma) を加えて再刺激をさらに3時間再開した後、染色及びフローサイトメトリー解析を行う。分泌された因子のELISA計測のため、100 μg/mL OVA又は1 μg/mL SIINFELKLPепチドの存在下で細胞を4日間再刺激する。細胞をスピンス、IFN- 及びIL-10 Ready-Set-Goキット (eBioscience) を製造者の指示どおり使用したELISA分析用に培地を回収する。

#### 【0530】

30

実施例9：循環抗体力価の定量化

OVAをコーティングしたプレート上で種々の希釈度のマウス血清をインキュベートし、続いてヤギ抗マウスIgG-HRP (Southern Biotech) と共に最終インキュベーションを行うことにより、OVA特異的血清IgGを検出する。

#### 【0531】

実施例10：細胞外SpyTag-SpyCatcherトランス誘導

ケル及びSpyTagのコード配列を含有する発現カセットを合成し、レンチウイルスベクターEF1に挿入する。CD34<sup>+</sup>細胞の集団をこのベクターで形質転換する。ケル-SpyTag融合タンパク質の発現はFACSによって定量化する。次に、ケル-SpyTagを細胞外発現する細胞を、SpyCatcher配列及びcMycタグと融合したArah(1-6)ペプチドの溶液中に置く。インキュベーション後、FACSを使用して細胞を選別し、ケル-SpyTagとSpyCatcher-ArahX-cMycとの共有結合性のイソペプチドコンジュゲーションを定量化する。細胞はまた、低張溶解させて、ケル-SpyTag-SpyCatcher-ArahX-cMycの存在をウエスタンブロットによって定量化する。

40

#### 【0532】

実施例11：遺伝子アセンブリ

以下の遺伝子をコードするDNA-グリコホリンA (Uniprot番号P02724)、Kell (Uniprot番号P23276)、B型肝炎表面抗原に対する抗体scFv (Bose et al. 2003 Mol Immunol 40(9):617

50



、GenBank番号AJ549501.1)、アデノシンデアミナーゼ(Uniprot番号P00813)、クロモバクテリウム・ビオラセウム(*Chromobacterium violaceum*)由来のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ(GenBank番号AF146711.1)、補体受容体1(Uniprot番号P17927)、CD46(GenBank:BA A12224.1)、CD55(Uniprot番号P08174)、CD59(Uniprot番号P13987)、緑色蛍光タンパク質(Uniprot番号P42212)、チミジンホスホリラーゼ(Uniprot番号P19971)、グルコセレブロシダーゼ(Uniprot番号P04062)、2グリコプロテイン1(Uniprot番号P02749)、ホスホリパーゼa2受容体(Uniprot番号Q13018)、コラーゲン3(IV)(Uniprot番号Q01955)、血清アミロイドP(Uniprot番号P02743)、リポタンパク質リパーゼ(Uniprot番号P06858)、アスパラギナーゼ(Uniprot番号P00805)、第IX因子(Uniprot番号F2RM35)、ADAMTS13(Uniprot番号Q76LX8)-をcDNAとしてDharmacon(GE Life Sciences)から購入するか、又はDNA2.0及びGenscriptでデノボ合成した。

10

### 【0533】

#### 1. 単一遺伝子クローニング(CR1)

当該技術分野において公知の標準的な分子生物学的方法によって遺伝子をアセンブルし、発現ベクターにした。補体受容体1(CR1)の遺伝子は商業的供給業者(DNA2.0)によって合成され、標準クローニングベクター(pJ系列)として供給された。このpJベクターから、非相同末端配列を有するオリゴを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって遺伝子を増幅し、哺乳類発現ベクター(System Biosciences、pM系列)への挿入用に調製した：上流オリゴは、上流pM挿入部位に相同の25ntとCR1の始端に相同の25ntとからなった；下流オリゴは、下流pM挿入部位に相同の25ntとCR1の終端に相同の25ntとからなった。増幅産物はゲル電気泳動(Qiagen)によって精製した。上流及び下流挿入部位に相同の尾-尾型オリゴによるPCRでpMベクターを線状化し、PCR精製(Qiagen)によって精製した。Gibson 2011, *Methods Enzymology* Vol 498, p. 394に詳説されるギブソンアセンブリにより、CR1アンプリコンを線状化pMベクターにライゲートした。配列はサンガー塩基配列決定法で確認した。

20

30

### 【0534】

#### 2. 2つの遺伝子の融合(膜Kell-scFv)

Kellの遺伝子はcDNAとして購入し、標準クローニングベクター(pJ系列)として供給された。B型肝炎表面抗原に特異的な抗体scFvの遺伝子(scFv、Bose 2003, *Molecular Immunology* 40:617に記載される)は商業的供給業者(DNA2.0)によって合成され、標準クローニングベクター(pJ系列)として供給された。これらのpJベクターから、非相同末端配列を有するオリゴを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって遺伝子を増幅し、哺乳類発現ベクター(System Biosciences、pM系列)への挿入用に調製した。Kellは、上流pM挿入部位に相同の25ntとKellの5'末端に相同の25ntとからなる上流オリゴ、及びscFvの5'末端に相同の25ntとKellの3'末端に相同の25ntとからなる下流オリゴで増幅した。scFvは、Kell挿入部位の3'末端に相同の25ntとscFvの5'末端に相同の25ntとからなる上流オリゴ、及び下流pM挿入部位に相同の25ntとscFvの3'末端に相同の25ntとからなる下流オリゴで増幅した。増幅産物はゲル電気泳動(Qiagen)によって精製した。上流及び下流挿入部位に相同の尾-尾型オリゴによるPCRでpMベクターを線状化し、PCR精製(Qiagen)によって精製した。Gibson 2011, *Methods Enzymology* Vol 498, p. 394に詳説されるワンポットギブソンアセンブリにより、Kell及びscFvアンプリコンを線状化pMベクターにライゲートし

40

50

た。配列はサンガー塩基配列決定法で確認した。

【0535】

3. 遺伝子間のリンカーアセンブリ (Kell - scfv)

Kellの遺伝子はcDNAとして購入し、標準クローニングベクター(pJ系列)として供給された。B型肝炎表面抗原に特異的な抗体scFvの遺伝子(scFv、Bose 2003, Molecular Immunology 40:617に記載される)は商業的供給業者(DNA2.0)によって合成され、標準クローニングベクター(pJ系列)として供給された。これらのpJベクターから、非相同末端配列を有するオリゴを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって遺伝子を増幅し、哺乳類発現ベクター(System Biosciences, pM系列)への挿入用に調製した。Kellは、上流pM挿入部位に相同の25ntとKellの5'末端に相同の25ntとからなる上流オリゴ;及びscFvの5'末端に相同の25ntと(GlyGlyGlySer)x2スペーサーをコードする24ntとKellの3'末端に相同の25ntとからなる下流オリゴで増幅した。scFvは、Kell挿入部位の3'末端に相同の25ntと(GlyGlyGlySer)x2スペーサーをコードする24ntとscFvの5'末端に相同の25ntとからなる上流オリゴ;及び下流pM挿入部位に相同の25ntとscFvの3'末端に相同の25ntとからなる下流オリゴで増幅した。増幅産物はゲル電気泳動(Qiagen)によって精製した。上流及び下流挿入部位に相同の尾-尾型オリゴによるPCRでpMベクターを線状化し、PCR精製(Qiagen)によって精製した。Gibson 2011, Methods Enzymology Vol 498, p.394に詳説されるワンポットギブソンアセンブリにより、Kell及びscFvアンプリコンを線状化pMベクターにライゲートした。配列はサンガー塩基配列決定法で確認した。

10

20

【0536】

4. エピトープタグの付加 (Kell - scFv)

Kellの遺伝子はcDNAとして購入し、標準クローニングベクター(pJ系列)として供給された。B型肝炎表面抗原に特異的な抗体scFvの遺伝子(scFv、Bose 2003, Molecular Immunology 40:617に記載される)は商業的供給業者(DNA2.0)によって合成され、標準クローニングベクター(pJ系列)として供給された。これらのpJベクターから、非相同末端配列を有するオリゴを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって遺伝子を増幅し、哺乳類発現ベクター(System Biosciences, pM系列)への挿入用に調製した。Kellは、上流pM挿入部位に相同の25ntとKellの5'末端に相同の25ntとからなる上流オリゴ;及びscFvの5'末端に相同の25ntと(GlyGlyGlySer)x2スペーサーをコードする24ntとKellの3'末端に相同の25ntとからなる下流オリゴで増幅した。scFvは、Kell挿入部位の3'末端に相同の25ntと(GlyGlyGlySer)x2スペーサーをコードする24ntとscFvの5'末端に相同の25ntとからなる上流オリゴ;及び下流pM挿入部位に相同の25ntとHAエピトープタグをコードする27nt配列taccctatgacgtgccgactatgcc(配列番号8)とscFvの3'末端に相同の25ntとからなる下流オリゴで増幅した。増幅産物はゲル電気泳動(Qiagen)によって精製した。上流及び下流挿入部位に相同の尾-尾型オリゴによるPCRでpMベクターを線状化した。下流プライマーには、HAエピトープタグをコードする27nt配列taccctatgacgtgccgactatgcc(配列番号8)がさらに含まれた。線状化したベクターをPCR精製(Qiagen)によって精製した。Gibson 2011, Methods Enzymology Vol 498, p.394に詳説されるワンポットギブソンアセンブリにより、Kell及びscFvアンプリコンを線状化pMベクターにライゲートした。配列はサンガー塩基配列決定法で確認した。

30

40

【0537】

5. 2つの遺伝子の融合(レポーターアセンブリ)(GPA-HA)

50

補体受容体1 (CR1) 及び緑色蛍光タンパク質 (GFP) の遺伝子は商業的供給業者 (DNA 2.0) によって合成され、標準クローニングベクター (pJ 系列) として供給された。このpJベクターから、非相同末端配列を有するオリゴを使用するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によってCR1遺伝子を増幅し、哺乳類発現ベクター (System Biosciences, pM 系列) への挿入用に調製した：上流オリゴは上流pM挿入部位に相同の25ntとCR1の始端に相同の25ntとからなった；下流オリゴはウイルス由来のT2A配列gagggcagaggaagtcttctaacaatgctggtgacgtggaggs gssstcccggccct (配列番号7) に相同の54ntからなった。pJベクターから、非相同末端配列を有するオリゴを使用するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によってGFP遺伝子を増幅し、哺乳類発現ベクター (System Biosciences, pM 系列) への挿入用に調製した：上流オリゴは、ウイルス由来のT2A配列gagggcagaggaagtcttctaacaatgctggtgacgtggaggs gssstcccggccct (配列番号7) に相同の54ntとGFPの始端に相同の25ntとからなった；下流オリゴは、下流pM挿入部位に相同の25ntとGFPの終端に相同の25ntとからなった。増幅産物はゲル電気泳動 (Qiagen) によって精製した。上流及び下流挿入部位に相同の尾-尾型オリゴによるPCRでpMベクターを線状化し、PCR精製 (Qiagen) によって精製した。Gibson 2011, Methods Enzymology Vol 498, p. 394 に詳説されるギブソンアセンブリにより、CR1及びGFPアンプリコンを共に線状化pMベクターにライゲートした。配列はサンガー塩基配列決定法で確認した。

【0538】

実施例12：mRNAアセンブリ

標準的な分子生物学的方法を用いて目的の遺伝子をpSP64ベクター (Promega) の多重クローニング部位にクローニングする。ベクターをEcoRI (NEB) で消化して、SP6プロモーターと目的の遺伝子と30ヌクレオチド長のポリAテールとを含む線状化dsDNAベクターを作成する。SP6 RNAポリメラーゼ (Promega) との反応によって、キャップ付加mRNA転写物を合成するための5'キャップ類似体 (ARCA) の推奨濃度を含めて製造者の指示に従いmRNAを合成する。次に反応混合物をDNアーゼで処理して鋳型ベクター (Promegaのリボプローブ (Riboprobe)) を消化し、EZNA MicroElute RNAクリーンアップキット (Omega) を使用してmRNAを精製する。

【0539】

実施例13：細胞培養

1. ヒト赤血球 (RBC)

Mini-MACSカラム (Miltenyi Biotec; 94% ± 3% 純度) の使用による超磁気マイクロビーズ選択法により、末梢血からCD34細胞を単離する。細胞は、安定化グルタミン、330 µg/mL ホロヒトトランスフェリン、10 µg/mL 組換えヒトインスリン、2 IU/mL ヘパリン、及び5% 溶剤/界面活性剤ウイルス不活化血漿を補充したIMDMをベースとする赤血球分化培地 (EDM) で培養する。拡大手順には3つのステップが含まれる。第1のステップでは (0日目~7日目)、EDM中、1 µM ヒドロコルチゾン、100 ng/mL SCF、5 ng/mL IL-3、及び3 IU/mL EPOの存在下で10<sup>4</sup> 個/mLのCD34+細胞を培養する。4日目に、SCF、IL-3、EPO、及びヒドロコルチゾンを含有する4容積の新鮮培地中に1容積の細胞培養物を希釈する。第2のステップでは (7日目~11日目)、SCF及びEPOを補充したEDM中に10<sup>5</sup> 個/mLで細胞を再懸濁する。第3のステップでは (11日目~18日目)、EPOのみを補充したEDM中で細胞を培養する。細胞数は11日目及び15日目にそれぞれ7.5 × 10<sup>5</sup> ~ 1 × 10<sup>6</sup> 及び5 ~ 10 × 10<sup>6</sup> 細胞/mLに調整する。18日目を過ぎたら、EPOを含有する培養培地を週2回取り替える。培養物は5% CO<sub>2</sub> の空气中37 °Cに維持する。

【0540】

10

20

30

40

50

## 2. マウス赤血球

マウス胎仔肝赤血球前駆体からマウス赤血球系細胞を培養する方法は当該技術分野において公知であり、例えば、Shi et al. 2014, PNAS 2014 111 (28): 10131を参照されたい。

### 【0541】

胎仔肝からマウス赤血球前駆体を単離する。胎仔肝はCharles River Labsから購入する。肝臓を氷上の1ml PBS中に入れる。ピペットを上下させて単一細胞懸濁液を得て、70umストレーナー(BD Falcon 35-2235)に通す。そのメッシュを1mlのPBSでリンスする。素通り画分を合わせる(1つの胚当たり1ml)。細胞を1.5k RPM、5分間でペレット化し、赤血球溶解緩衝液(Stemcellの塩化アンモニウム溶液)で再懸濁し、及び氷上で10分間インキュベートする。細胞を1.5k RPM、5分間でペレット化し、溶解緩衝液を除去し、及び10ml PBS-2% FBSで再懸濁する。chromPure Rat IgG(Jackson ImmunoResearch、#012-000-003)を50ul/マウスで加え、4で5分間インキュベートする。ビオチン化抗マウスTER119(BD Pharmingen、#553672)を(1ul/1x10<sup>6</sup>細胞)で加え、4で15分間インキュベートする。細胞にMs Lineage Panel(Fisher Scientific(Thermo Fisher Scientific)#BDB559971)を(2ul/1x10<sup>6</sup>細胞)で加え、4で15分間インキュベートする。10倍容積のPBSで1回洗浄し、細胞を4、1.5k RPMで5分間スピンさせる。ストレプトアビジン粒子Plus-DM(磁気ビーズ)(BD Pharmingen、#557812)(5ul/1x10<sup>6</sup>細胞)を加え、4で30分間インキュベートする。磁気ホルダ上に2~4本のFACSチューブを準備する。2mlの細胞のアリコートを各チューブに取り分け(合計4ml)、磁気スティックビーズを破壊しないようにしながらチューブから細胞を慎重に取り出して反対側にある他方のチューブに入れる。同じ手順を繰り返し、Ter119陰性細胞及びリンケージ陰性細胞を新しいチューブに取る。細胞を濃縮し、それらの細胞を50~100ul PBS(2% FBS)で再懸濁する。

### 【0542】

精製した赤血球前駆体は、(40mlに対して): IMDM: 29ml、FBS(幹細胞): 6ml(最終15%)、IMDM中10% BSA(幹細胞): 4ml(最終1%)、10mg/ml ホロトランスフェリン: 2000ul(最終: 500ug/ml)、100xL-グルタミン: 400ul、100xペニシリンストレプトマイシン: 400ul、10U/ml Epo: 2ul(最終: 0.5U/ml)、10mg/ml インスリン: 40ul(最終: 10ug/ml)を含む分化培地で培養する。2x10<sup>5</sup>細胞/mlを24ウェルプレートの分化培地中37で培養する。合計44~48時間培養した後、例えば本明細書で実施されるとおりフローサイトメトリーによって分析を実施する。分化プロファイル分析のため、(ヘキスト染色)を使用して除核赤血球をゲーティングする。培養が成功すれば、16倍の増加が得られる。

### 【0543】

## 3. 血小板

Fred Hutchinson Cancer Research Centerから、提供されたCD34+細胞を入手する。CD34+濃縮細胞を2~4x10<sup>4</sup>細胞/mlで無血清培地にプレATINGし、4日目に等容積の培地を加えて培地のリフレッシュを行う。6日目、細胞をカウントして分析する: 1.5x10<sup>5</sup>細胞を洗浄し、TPO 30ng/ml、SCF 1ng/ml、インターロイキン(IL)-6 7.5ng/ml及びIL-9 13.5ng/mlからなるサイトカインカクテルを補充した1mlの同じ培地に入れて巨核球分化を誘導する。10日目に1/2~1/4の浮遊培養液を新鮮培地に交換する。サイトカインは全て、Peprotechから購入する。加湿雰囲気中(10%CO<sub>2</sub>)、培養の最初の6日間は37で及び最後の8日間は37で培

10

20

30

40

50

養物をインキュベートする。血球計算器(0.4%トリパンプルー; Invitrogen、Burlington, ON, カナダ)で生存有核細胞をカウントする。

【0544】

骨髄CPCについてはMethoCult H4436及び巨核球コロニー形成細胞(CFU-Mk)についてはMegaCult-Cを使用して、製造者の指示(StemCell Technologies、Vancouver, BC, カナダ)に従いクローン原性前駆細胞(CPC)をアッセイする。分化を評価するため、FACS-Calibur(Becton Dickinson)を使用したフローサイトメトリーにより、CD61m CD42b、CD41、CD61、及びCD49bに対する抗体で細胞を染色する。細胞周期分析のため、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)でリンスし、ホルムアルデヒド2%(Sigma、St Louis, MO, USA)で5分間固定し、0.1%のTriton X-100(Bio-Rad、Hercules, CA, USA)で透過処理する。次に細胞をmAb-Ki-67-FITC(BD Bioscience、San Jose, CA, USA)で標識し、洗浄し、製造者の指示(BD Biosciences)に従い0.5mL PBS-1%ウシ胎仔血清(FBS)-0.01%アジド7-アミノ-アクチノマイシンD(7-AAD)中に再懸濁する。

10

【0545】

実施例14: 細胞単離

1. 初代RBC

無菌法を用いて、低分子量ヘパリン、ダルテパリンナトリウム(9単位/mL血液)が入ったチューブに全血を収集する。血液を5000×gで5分間遠心し、血漿及びパフィーコートを除去した後(両方とも後に使用するため取り置かれ得る)、赤血球を冷(4)リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で遠心して2回洗浄する。得られた赤血球集団は、長期保存のためにCPDA-1抗凝固剤又はグリセロール溶液中4で保存する。

20

【0546】

2. 初代血小板

適切なIRBプロトコルに基づき健常人から全血(40mL)を3.8%クエン酸ナトリウム(1:9クエン酸塩対血液vol/vol)中に収集する。血液を200gで15分間遠心して多血小板血漿(PRP)を単離する。次に、1µMプロスタグランジンI2の存在下、変性タイロード緩衝液(138mM NaCl、5.5mM デキストロース、12mM NaHCO<sub>3</sub>、0.8mM CaCl<sub>2</sub>、0.4mM MgCl<sub>2</sub>、2.9mM KCl<sub>2</sub>、0.36mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>及び20mM HEPES含有、pH7.4)中で血小板を洗浄し、同じ緩衝液に再懸濁する。

30

【0547】

実施例15: 初代細胞又は培養細胞の照射

外因性抗原発現EHCの集団の照射を実施して、それらが複製不能であることを確実にし得る。かかるプロトコルは、細胞、例えば初代赤血球の照射について当該技術分野で公知のものと同様である。簡潔に言えば、1単位(350mL)の全血を取り、各175mLの2つのアリコートに分け、従ってかかる10単位を20のアリコートに分ける。各単位血液の一方のアリコート(175mL)を、自蔵式ガンマ線細胞照射器(GammaCell 1000、Theratronics)によって25Gyの、但し50Gy以下の線照射に供する。次に血液を従来の血液貯蔵条件下に4で保存する。これらの10個の照射済み血液バッグ及び10個の非照射血液バッグから、0、7、14、及び21日にサンプリングサイトカプラー(Fenwal、USA)を用いてサンプリングを行う。潜在的な有糸分裂能を定量化するチミジン取込みアッセイを含め、細胞増殖試験を実施する。遊離ヘモグロビンに関しては吸光度分光法、及び遊離乳酸デヒドロゲナーゼに関しては比色アッセイ(Pierce)で上清をアッセイし、細胞溶解レベルを評価する。

40

【0548】

実施例16: 赤血球系細胞の除核

コラーゲンでコーティングした直径12mmのカバーガラス上で、100単位/miの

50

ペニシリン及び100単位/mlのストレプトマイシンを補充したIMDM培地中において赤血球系細胞をセミコンフルエンス(1~4×10<sup>4</sup>細胞毎cm<sup>2</sup>)になるまで成長させる。コラーゲンは、遠心中に全細胞がカバーガラスから落ちることを防止するために必要である。細胞を同じ培地中か又は10%仔ウシ血清含有ダルベッコ変法イーグル培地中においてカバーガラス上に単層(5×10<sup>4</sup>細胞毎cm<sup>2</sup>)に成長させる。この細胞カバーガラスをコラーゲンでコーティングする必要はない。細胞を除核するため、カバーガラスを反転させ(細胞側を下にして)、10g/mlのサイトカラシンBを含む2~5mlの培地が入った15ml Corex遠心管の底に置く。このカバーガラスが入った遠心管を直ちに、(SS 34)ローターをヘッドを所定位置にして10,000rpmで約1時間スピンさせることにより37に加温したSorvall RC-2遠心機に置く(温度調節装置は37~39度に設定)。遠心の時間の長さ及び速度は除核の成功に重大な要素である。細胞を37±20で9000rpmで1時間スピンし、及び細胞を37±20で6500rpmで50分間スピンする。遠心後、遠心機からカバーガラスを取り出し、3mlのサイトカラシンB不含培地が入った35mm(Falcon)組織培養皿(Biolquest)に細胞側を上にして置く。370で30~60分以内に細胞は形態学的に正常となり、90~99%が核を欠く。トリプシン-EDTA(Grand Island Biological Co.)で処理することによりカバーガラスから除核細胞を取り外し、通常の培地に細胞を懸濁する。次に35mm組織培養皿に保持した22mm<sup>2</sup>カバーガラスに除核細胞を小滴で再度プレーティングし、インキュベーターに置く。再度プレーティングした後時間間隔を置いてスライド(12)上にカバーガラスをマウントし、Zeiss位相コントラスト、偏光、及びノマルスキー光学系で除核物の観察を行う。

10

20

## 【0549】

## 実施例17:細胞の接触

## 1.核酸 - トランスフェクション

目的の核酸をスケールアップして、負荷する10<sup>5</sup>個のEHC、例えば細胞、赤血球系細胞、血小板、又は造血前駆細胞当たり約5ugの核酸を提供する。核酸はOpti-MEM培地(Life Technologies)中に1ug対50uL培地の比で希釈する。次に希釈した核をトランスフェクション試薬(DNAについてはTrans-IT、mRNAについてはTrans-IT mRNA、siRNAについてはTrans-IT siRNA、Mirus Bio)と1:1容積比で合わせ、室温で5分間複合体を形成させる。この核酸複合体を細胞に12~24時間加える。任意選択で、この時間が経った後、トランスフェクション試薬がもはや存在することのないよう、培地を新鮮培地に交換してもよい。

30

## 【0550】

## 2.核酸 - ウイルス形質導入

目的の遺伝子をSystem BiosciencesのMSCVプロモーター配列と共にレンチウイルスベクターpCDHの多重クローニング部位にクローニングする。

## 【0551】

レンチウイルスは、293T細胞にリポフェクタミン(lipofectamine)をトランスフェクトすることにより293T細胞で産生される。トランスフェクションの前日に5×10<sup>6</sup>個の293T細胞(Lenti-X 293T細胞株、Clontechカタログ番号632180)をP10ペトリ皿にプレーティングする。細胞コンフルエンスは約70%でなければならない。1つのコンストラクトにつき1つのプレートをトランスフェクトする。20μl(10μg)pPACKH1(System Biosciences)プラスミドミックス+2μgレンチコンストラクト+20μl Plus試薬(Life Technologies、カタログ番号11514-015)を400μl Optimem中に合わせ、室温で15分間インキュベートする。30μlのLF2000(Life Technologies、カタログ番号11668-019)を400μl Optimem中に希釈し、DNA混合物に滴下して加え、室温で15分間イ

40

50

ンキュベートする。DNA混合物を細胞に加える（細胞は9mlのOptiMEM中にある）。細胞を6時間インキュベートし、次に培地をDMEM/10%FBSに交換する。トランスフェクション後48時間に1,500rpmで5分間遠心してウイルス上清を回収する。この上清を回収し、1mlアリコートとして-80で凍結する。

#### 【0552】

本明細書に記載される培養プロセスの3~7日目に標的細胞を形質導入する。5×10<sup>5</sup>個の培養細胞を24ウェルプレート中の20μg/mlポリブレンを含有する500μLの培地にプレATINGする。細胞は各ウイルスにつきトリプレートのウェルで形質導入する。ウイルス上清を別の500μLの培地に加え、ピペティングによって試料を混合する。感染は、プレートを室温、2000rpmで90分間スピンする遠心接種によって達成する。遠心接種後、細胞を37で一晚インキュベートし、翌日、適切なサイトカインを含有する1mlの新鮮IMDM培地を加える。

10

#### 【0553】

##### 3. 核酸 - カチオン性ポリマー

目的のトランス遺伝子をコードする、且つ上流プロモーター配列及び下流ポリAテールを含むmRNAは、複数の商業的供給業者（例えば、IDT-DNA、Coralville IA）から購入することができる。RNAトランスフェクションは、RNAiMax（Invitrogen、Carlsbad、Calif.）又はTRANSIT-mRNA（Mims Bio、Madison, Wis.）カチオン性脂質送達媒体を使用して行う。RNA及び試薬は、初めにOpti-MEM基本培地（Invitrogen、Carlsbad、Calif.）に希釈する。100ng/μL RNAを5倍希釈し、RNA1μg当たり5μLのRNAiMaxを10倍希釈する。希釈した構成成分をプールし、室温で15分間インキュベートした後、それらを培養培地に分注する。TRANSIT-mRNAトランスフェクションについては、100ng/μL RNAをOpti-MEM中に10倍希釈し、ブースト試薬を（RNA1μg当たり2μLの濃度で）加え、TRANSIT-mRNAを（RNA1μg当たり2μLの濃度で）加え、次に、室温で2分間インキュベートした後、このRNA-脂質複合体を培養培地に供給する。RNAトランスフェクションは、Nutristem異物不含hES培地（STEMGENT（登録商標）、Cambridge, Mass.）又は2%FBS含有Opti-MEMで実施する。宿主細胞へのmRNA転写物の導入の成功は、蛍光標識又はレポータータンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質（GFP）など、様々な公知の方法を用いてモニターすることができる。修飾mRNAのトランスフェクションの成功はまた、標的ポリペプチドのタンパク質発現レベルを例えばウエスタンブロットング又は免疫細胞化学で計測することによっても判断し得る。同様のRNA-脂質複合体比に従うマルチリットル（5~10,000L）培養フォーマットへの大容積スケールアップについても、同様の方法に従い得る。

20

30

#### 【0554】

##### 4. 核酸 - 電気穿孔

目的のトランス遺伝子をコードする、且つ上流プロモーター配列及び下流ポリAテールを含むmRNAは、複数の商業的供給業者（例えば、IDT-DNA、Coralville IA）から購入することができる。赤血球系統細胞をmRNA転写物でトランスフェクトし、及び外因性転写物を特異的に検出するように設計されたプライマーによる定量的RT-PCRによってトランスフェクション効率を計測することにより、電気穿孔パラメータを最適化する。ある種の細胞の調製には、2mm間隙の標準電気穿孔キュベット内において50μlのOpti-MEM（Invitrogen、Carlsbad、Calif.）中に懸濁した2.5×10<sup>6</sup>細胞に150μFキャパシタンスを放電することが、検量線法を用いて判断するとき、高い生存能（>70%）を維持しながら1細胞当たり10,000コピーを上回る修飾mRNA転写物を繰り返し送達するのに十分である。細胞密度は1×10<sup>6</sup>細胞/50μl~2.5×10<sup>6</sup>細胞/500の密度で様々であり、1細胞当たりの転写物コピー数で計測して同程度の効率で細胞をトランスフェクトする

40

50

ためには110V～145Vが必要である。上述の制約を伴い記載される方法と同様の大容量積流動電気穿孔戦略と同様に、大量マルチリットル(5～10,000L)電気穿孔を実施し得る(Liet al., 2002; Geng et al., 2010)。

【0555】

#### 5. ポリペプチド - リボソーム

細胞は、初代最終分化細胞、例えば赤血球を含め、その表面上及びその細胞質に外因性タンパク質を負荷することができる。タンパク質の負荷はリボソームを使用して実施することができる。

【0556】

有機溶媒中の脂質(Pro-Ject試薬、Pierce)をガラスシンチレーションバイアルにおいて窒素下で乾燥させて薄膜にした。10<sup>5</sup>細胞につき約2uLの脂質を使用した。ポリクローナルマウスIgG(Abcam)をDyLight-650(Pierce)で製造者の指示に従い標識した。この乾燥脂質混合物にPBS中0.1mg/mLのタンパク質溶液を加えた。この溶液を数回ピペティングし、室温で5分間インキュベートし、次に激しくボルテックスして封入リボソームを作成した。無血清培地を加えて総容積を10<sup>5</sup>細胞当たり500uLにした。次にこのリボソーム混合物を細胞と共に37で3～4時間インキュベートした。

【0557】

図1は、リボソームによる初代赤血球への外因性タンパク質、この場合には蛍光標識IgGの負荷を示す。負荷はフローサイトメトリーによって計測される。リボソームがない場合には細胞の0.06%が蛍光であり、低リボソーム用量では細胞の約60%が蛍光であり、及び高リボソーム用量では細胞の約85%が蛍光であるとおり、負荷は用量依存性である。図1のデータは、リボソームで外因性タンパク質を赤血球系細胞に負荷し得ることの強力な証拠である。

【0558】

#### 6. ポリペプチド - 機械的破壊

細胞は、1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、10μm幅のチャネルを含むマイクロ流体装置を使用して負荷してもよく、チャネルが細胞を一過性に穿孔して、細胞がそのシステムに押し通されるときにペイロードが侵入することを可能にする。

【0559】

マサチューセッツ工科大学(Massachusetts Institute of Technology)の微細加工施設において、フォトリソグラフィ及び深掘り反応性イオンエッチング技法を用いてシリコンベースの装置を作製する。このプロセスでは、450μm厚の6インチシリコンウエハをヘキサメチルジシラザンで処理し、フォトレジスト(OCG934; FujiFilm)によって3,000rpmで60秒間スピニングし、狭窄チャネル設計を有するクロムマスクを通じて紫外光(EV1; EVG)に露光し、及びAZ405(AZ Electronic Materials)溶液で100秒間現像する。90で20分間焼成した後、ウエハを深掘り反応性イオンエッチング(SPTS Technologies)によって所望の深さ(典型的には15μm)にエッチングする。このプロセスをウエハの反対側(即ち、エッチングされたチャネルを有しない側)で別のマスク(これはアクセスホールパターンを含む)を使用して、且つより厚いフォトレジストAZ9260(AZ Electronic Materials)を使用して繰り返す。次に湿式酸化を用いて100～200nmの酸化ケイ素を成長させた後、そのウエハをPyrex(登録商標)ウエハに陽極接合し、個々の装置にダイスカットする。各実験前に装置は目視検査し、入口及び出口リザーバを備えるホルダに取り付ける(全てインハウスで設計され、Firstcutによって製造される)。これらのリザーバはブナNORリング(McMaster-Carr)を使用して装置と接合し、適切な封止を設ける。材料を装置に押し通すのに必要な推進力が提供されるように、入口リザーバはTeflonチュービングを用いて自家製圧力調整システムに接続する。初めに赤血球系細胞の集団を所望の送達緩衝液[成長培地、PBS、又は3%FBS及び1

10

20

30

40

50



% F - 6 8 Pluronic s (Sigma) を補充した P B S ] に懸濁し、所望の送達材料と混合して、装置の入り口リザーバに置く。このリザーバは、調整器によって制御される圧縮空気ラインに接続し、選択圧力 ( 0 ~ 7 0 p s i ) を用いて装置中に流体が押し進められる。次に処理された細胞を出口リザーバから回収する。細胞は処理後に送達溶液中室温で 5 ~ 2 0 分間インキュベートして孔を確実に塞いだ後、任意のさらなる処理に供する。蛍光標識フェニルアラニンアンモニアヒドロキシラーゼ ( P A H ) を送達するため、送達緩衝液が 0 . 1 ~ 0 . 3 m g / m L の P A H を含有したように上記に記載したとおり実験を行う。G F P ノックダウンは、未処理対照と比べた細胞集団の平均蛍光強度の低下パーセンテージとして計測する。

【 0 5 6 0 】

#### 7 . ポリペプチド - 表面コンジュゲーション

細胞表面をトラウト試薬 ( 2 - イミノチオラン H C l , P i e r c e ) で処理して第一級アミンをチオール化する。E D T A 含有トリス緩衝液 p H 8 にトラウト試薬を溶解し、スルフヒドリルの酸化を防止する。約 1 p m o l のトラウト試薬を使用して  $10^6$  細胞を処理する。トラウト試薬を細胞と共に室温で 1 時間インキュベートする。過剰の又は未反応の試薬を遠心によって除去して細胞を洗浄する。利用可能なスルフヒドリル基の数は、エルマン試薬を使用して計測することができる。その一方で、好適な外因性抗原ポリペプチドを S M C C ( P i e r c e ) などのアミン - スルフヒドリルクロスリンカーで製造者の指示に従い処理する。過剰の架橋結合試薬を脱塩によって除去する。次にマレイミド官能化タンパク質をチオール化した細胞と共に数時間インキュベートする。コンジュゲート細胞から遠心及び洗浄によって未反応のタンパク質を分離する。

【 0 5 6 1 】

#### 8 . ポリペプチド - 非共有結合性表面付加

哺乳類発現ベクター ( G e n l a n t i s ) において、B 型肝炎表面抗原に対する抗体 s c F v の遺伝子 ( s c F v , B o s e 2 0 0 3 , M o l e c u l a r I m m u n o l o g y 4 0 : 6 1 7 に記載される ) を 6 - ヒスチジンアフィニティータグと、マウスグリコホリン A に結合するポリペプチド配列、H W M V L P W L P G T L D G G S G C R G をコードする遺伝子とに融合する。標準方法を使用した H E K - 2 9 3 T 細胞の一過性のトランスフェクションによって完全融合タンパク質を作製し、製造者の指示に従い N i - N T A アフィニティー樹脂 ( P i e r c e ) で精製する。精製した融合タンパク質を 1 0 0 n M 超の濃度のマウス赤血球と共にインキュベートし、迅速な平衡化及びペプチドとグリコホリン A の結合を可能にする。

【 0 5 6 2 】

#### 9 . ポリペプチド - 膜への脂質挿入

製造者のプロトコルに従いトラウト試薬 ( T h e r m o F i s h e r ) を使用してアミン含有の好適な外因性抗原ポリペプチド分子にスルフヒドリル基を作成する。反応混合物を振盪機において室温 ( R T ) で 1 時間インキュベートし、製造者の指示に従いスピン脱塩カラム ( Z e b a , M W C O 7 K , T h e r m o S c i e n t i f i c ) に通して洗浄して未反応のトラウト試薬を除去する。修飾ポリペプチドへのスルフヒドリル基の作成は、製造者のプロトコルに基づきエルマン試薬 ( P i e r c e ) を使用して定量化する。

【 0 5 6 3 】

脱塩したポリペプチド溶液に D S P E - P E G <sub>3 4 0 0</sub> - m a l ( P B S , 4  $\mu$  L 中  $1 \times 10^{-3}$  M 、脂質 : ポリペプチドモル比 = 1 : 1 ) ( 全ての脂質は A v a n t i P o l a r L i p i d s から購入し、アルゴン下 - 2 0 でクロロホルム溶液として保存する ) を加え、振盪機において R T でインキュベートする。1 時間後、遠心ろ過装置 ( M i c r o c o n , M i l l i p o r e C o . ) を使用して試料溶液を 4 、 1 4 0 0 0 g で 1 5 分間ろ過することにより小分子を除去し、6 0 0  $\mu$  L P B S ( 1 m g / m L ポリペプチド ) に懸濁する。

【 0 5 6 4 】

10

20

30

40

50

200  $\mu$ Lの全血を1000  $\mu$ L PBS中に懸濁して1500gで30秒間スピンド、これを4回繰り返す。最後に、RBCを800  $\mu$ L PBS中に懸濁する。RBC/D SPE - PEG - ポリペプチドのコンジュゲーションは、上記のRBC懸濁液及び様々な量のD SPE - PEG - ポリペプチド溶液(1mg/mL)を混合した後、続いて37で15~30分間インキュベートすることにより調製する。混合物を室温に5分間置いておき、次にPBSで3回洗浄し、 $5 \times 10^8$ 個/mLの最終RBC濃度となるように再懸濁する。自動細胞計数器(Countess, Invitrogen)を使用して細胞濃度を計測する。

#### 【0565】

##### 10. ポリペプチド - 低張負荷

好適な外因性抗原ポリペプチド、この場合マウスIgGをAbcamから購入し、70%のヘマトクリット(Hct)の等張液中のRBC懸濁液に0.25mg/mLで加えた。この懸濁液を10mMリン酸ナトリウムpH7.4、10mM重炭酸ナトリウム、及び20mMグルコースを含有する250mLの低張液に透析し、4、15rpmで1時間攪拌した。次に、5mMアデニン、100mMイノシン、100mMピルビン酸ナトリウム、100mMリン酸ナトリウム、100mMグルコース、12%(w/v)NaClを含むpH7.4の1/10容積の再密閉溶液を加えることにより、細胞を等張的に再密閉した。次に細胞を37で30分間インキュベートした。

#### 【0566】

##### 11. ポリペプチド - 細胞透過性ペプチド

プロタミンコンジュゲートポリペプチドの製造は当該技術分野において公知である。例えば、Kwon et al. 2009 J Contr Rel 139(3):182を参照されたい。50mM HEPES緩衝液(pH8)中5mg/mLの低分子量プロタミン(LMWP)をヘテロ二官能性架橋剤3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミド(SPDP, Sigma-Aldrich)と1:10モル比でDMSO中に混合し、室温で1時間振盪する。次にこの反応混合物を50mMジチオスレイトール(DTT, Sigma-Aldrich)で処理し、チオール化したLMWPをヘパリンアフィニティーカラムでのHPLCによって精製する。生成物を限外ろ過によって回収し、凍結乾燥し、後に使用するまで-20で保存する。

#### 【0567】

コンジュゲーションのため、5mg/mLの好適な外因性抗原ポリペプチドをリン酸緩衝液中のSPDP(1mLタンパク質溶液に対してエタノール中40 $\mu$ Lの0.1M SPDP)と混合し、室温で1時間攪拌する。急速な脱塩及び0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)でのFPLCによる緩衝液交換によって未反応SPDPを除去する。次に活性化ポリペプチドを10倍モル過剰の上記で調製したLMWP-SHと4で24時間コンジュゲートする。ヘパリンアフィニティーカラムを使用したイオン交換クロマトグラフィーと、続く5ラウンドの遠心ろ過(分子量カットオフ:5,000Da)によってLMWP-ポリペプチドコンジュゲートを単離する。プールされたLMWP-ポリペプチドコンジュゲートを濃縮し、コンジュゲーションの程度をMALDI-TOF質量分析によって決定する。

#### 【0568】

取込み実験のため、新鮮ヒツジ赤血球(MP Biomedicals, Solon, OH)をハンクス平衡塩類溶液(HBSS)に $5 \times 10^8$ 細胞/mLの密度で懸濁し、次にLMWP-ポリペプチドコンジュゲートの0.5mg/mL溶液と共に穏やかに攪拌しながら室温で30分間インキュベートする。次にRBCをHBSSで洗浄し、2~8で保存する。

#### 【0569】

##### 12. ポリペプチド - 化学的透過性

$3 \times 10^8$ 個のRBCをリンゲル溶液中200 $\mu$ Mのクロルプロマジン(Sigma Aldrich)と共に30分間ブレインキュベートした。その後、好適な外因性抗原

10

20

30

40

50

リペプチドをリンゲル溶液に(1~4 μM)最終容積が400 μlとなるように加え、穏やかな攪拌下、室温で30分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を2回洗浄し、リンゲルに再懸濁し、分析用に回収した。

【0570】

### 13. ポリペプチド - 酵素的コンジュゲーション

ソルターゼによる酵素的細胞表面コンジュゲーションは当該技術分野において公知である。例えば、Shi et al PNAS 2014 111(28):10131を参照されたい。GPA N末端をポリペプチドで標識するため、30 μLの500 μM黄色ブドウ球菌(S aureus)ソルターゼ及びC末端にLPETGGを有する1 mMポリペプチドを50 mMトリス、pH7.5、150 mM NaCl中、氷上で15分間

10

プレインキュベートし、DMEM中 $5 \times 10^7$ 個のRBCに加える。このソルターゼと細胞との混合物を時折穏やかに混合しながら氷上で30分間インキュベートし、次に4、500 × gで2分間スピンドして緩衝液/DMEMを除去し、次に1 mLの氷冷PBSで3回洗浄する。

【0571】

実施例18: ポリペプチドの存在の評価

#### 1. 蛍光トランス遺伝子

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。C末端上のHAタグがウイルス性T2Aペプチドの介在を伴いGFPに融合したグリコホリンAをコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築した。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。形質導入の2日後、細胞を回収し、PBS緩衝液で洗浄し、及びフローサイトメーター(Attune、Life Technologies)で分析した。形質導入効率は、集団中におけるGFP陽性細胞の割合として評価した。

20

【0572】

#### 2. 細胞表面タンパク質

細胞表面タンパク質について、タンパク質発現レベルは、タンパク質又は共発現するエピトープタグに特異的な抗体によるフローサイトメトリーによって、早くもトランスフェクションの2日後には検出することができる。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。N末端にHAタグを有するグリコホリンAをコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築した。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。形質導入の2日後、細胞を回収し、PBS緩衝液で洗浄し、及びマウス抗HA抗体(Abcam)の1:50希釈物で1時間染色した。細胞を洗浄し、次にalexa 488標識ヤギ抗マウス二次抗体(Life Technologies)の1:100希釈物によって氷上で30分間染色した。細胞を洗浄し、フローサイトメーター(Attune、Life Technologies)で分析した。形質導入効率は、集団中におけるalexa 488陽性細胞の割合として評価した。

30

【0573】

#### 3. 細胞内タンパク質

細胞内タンパク質について、タンパク質発現レベルは、ウエスタンブロットによって早くもトランスフェクションの8~12時間後には検出することができる。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。C末端にHAタグを有するアデノシンデアミナーゼをコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築した。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。形質導入の2日後、細胞を回収し、PBS緩衝液で洗浄し、及びRIPA細胞溶解緩衝液(Pierce)中で溶解させた。細胞溶解物を100 mM DTT中で煮沸することにより変性させ、次にNuPage SDS-PAGEプレキャストゲル上にロードした。電気泳動及びニトロセルロース膜への転写後、マウス抗HA抗体(Abcam)の1:5000希釈物、続いてヤギ抗マウスHRP(Pi

40

50

er ce) の 1 : 5 0 0 0 希釈物で染色することによりタンパク質バンドを発色させ、続いてHRP基質 ( Super Signal、Pierce ) で処理した。Amersham イメージャ ( GE healthcare ) を使用して画像を取得した。

#### 【 0 5 7 4 】

実施例 19 : 細胞を化学修飾剤と接触させる

抗原提示細胞の食作用を増加させ、且つ肝臓ターゲティングを促進するため、本明細書に記載する細胞組成物を 37 °C で 0 . 1 5 μ M のカルシウムイオノフォア A 2 3 1 8 7 ( Sigma Aldrich、Saint Quentin Fallavier、フランス) によるか、又は室温 ( RT ) で 5 m M の B S 3 ( Fischer Bioblock Scientific、Illkirch、フランス) によって 3 0 分間処理する。この処理後、最終生成物は好適な緩衝液中に 2 ~ 8 °C で保存する。

10

#### 【 0 5 7 5 】

実施例 20 : 発現及び活性の評価

培養細胞内及びその上での外因性タンパク質の発現は、フローサイトメトリーによるか ( タンパク質が表面上で発現する場合 ) 又はウエスタンブロットによって ( 細胞質内で発現するタンパク質用 )、定量的に評価することができる。

#### 【 0 5 7 6 】

1 . 定量的フローサイトメトリー

抗マウス Fc 結合定量的フローサイトメトリービーズ ( Simply Cellular Calibration ) は Bangs Labs から購入した。関連性のある細胞表面受容体 - グリコホリン A、C k i t、及びトランスフェリン受容体 - に対する蛍光標識マウス抗体は BioLegend から購入した。HA エピトープタグに対する蛍光標識マウス抗体は Life Technologies から購入した。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。N 末端に HA タグを有するグリコホリン A をコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築した。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。形質導入の少なくとも 2 日後、 $2 \times 10^5$  細胞を回収し、PBS 緩衝液で洗浄し、及び上記に挙げた抗体のうちの 1 つの 1 : 1 0 0 希釈物で 1 時間染色した。細胞を洗浄し、フローサイトメーター ( Attune、Life Technologies ) で分析した。上記に挙げる 4 つの抗体の各々について、このプロトコルを繰り返した。製造者の指示に従い定量化を実施した。簡潔に言えば、5 つのビーズ試料の各々の一滴を、上記に挙げた抗体の 1 : 1 0 0 希釈物とインキュベートした。ビーズを 1 時間インキュベートし、PBS 中で洗浄し、及びフローサイトメーター ( Attune、Life Technologies ) で分析した。上記に挙げる 4 つの抗体の各々について、このプロトコルを繰り返した。製造者提供の excel スプレッドシートを使用して検量線をフィットし、そこから細胞ベースシグナルの蛍光強度の定量化を導出した。

20

30

#### 【 0 5 7 7 】

2 . 定量的ウエスタンブロット

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。C 末端に HA タグを有するアデノシンデアミナーゼをコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築した。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。形質導入の 2 日後、細胞を回収し、PBS 緩衝液で洗浄し、及び R I P A 細胞溶解緩衝液 ( Pierce ) に溶解させた。

40

#### 【 0 5 7 8 】

リポフェクタミン 2 0 0 0 ( lipofectamine 2 0 0 0 ) ( Life technologies ) を使用した一過性トランスフェクションにより、HEK 2 9 3 T 細胞にトランス遺伝子を導入した。細胞を 1 週間培養し、上清を回収した。組換えタンパク質を HA アフィニティーカラム ( Pierce ) で製造者の指示に従い精製した。2 8 0 n m の吸光度によってタンパク質濃度を評価した。

50

## 【0579】

本明細書に記載されるとおりウエスタンブロッティングを実施した。細胞溶解物試料に加え、同じゲル上で既知量の組換えアデノシンデアミナーゼのランを行った。画像収集後、組換えバンドの強度を使用して検量線を作成し、細胞試料中に存在するタンパク質の量を定量化した。

## 【0580】

トランス遺伝子の高レベルでのロバストな発現は、最終的な細胞集団の治療能力にとって重要な意味を有する。図2は、分化の指標となる3つの表面タンパク質及び1つの外因性トランス遺伝子の発現を定量的フローサイトメトリーによって定量化し、トランス遺伝子が高レベルでロバストに発現することを実証する。

10

## 【0581】

培養下の赤血球系細胞を四段階インビトロ分化プロセスの間に7時点で採取した。最初の時点(「拡大 D6」)で細胞は有核造血前駆体である。最後の時点(「分化3 D8」)までに細胞は主として除核赤血球系細胞になる。赤血球系細胞の標準マーカーであるGPA(塗り潰した三角形)は、前駆細胞では低値で始まり、急激に1細胞当たり $> 1 \times 10^6$ コピーに達する。幹細胞因子の受容体であるCKIT(破線上の四角形)は高値で始まり、次に分化が続いて起こるに従い1細胞当たり $< 1 \times 10^4$ コピーに下がる。赤血球系細胞への鉄の輸送に必要なTR(点線上の菱形)は、最初は増加し、次に1細胞当たり $< 1 \times 10^5$ コピーまで徐々に低下する。第2の分化段階(「分化1」)の終わりにトランス遺伝子(白色の丸)が導入され、これは分化全体を通して1細胞当たり約 $1 \times 10^5$ コピーで一定に発現する。上記のデータは、培養細胞でトランス遺伝子がロバストに発現することを実証している。

20

## 【0582】

培養細胞内及びその上での外因性タンパク質の発現は、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによるか(タンパク質が表面上で発現する場合)又は本明細書に記載されるとおりウエスタンブロットによって(細胞質内で発現するタンパク質用)、評価することができる。下流蛍光レポータータンパク質を含む単一の転写物コンストラクト内に外因性遺伝子がある例では、レポータータンパク質の蛍光を上流遺伝子の発現の代用として使用し、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって評価することができる。

30

## 【0583】

図3A~図3Sは、除核培養赤血球系細胞における表面タンパク質及び細胞質タンパク質の外因性発現を示す。上記のデータは、複数のタンパク質クラスが(過剰発現し、及びデノボ発現する、I型膜タンパク質との細胞質の、表面の、インタクトな融合物、II型膜タンパク質との融合物、GPI結合型膜タンパク質との融合物、細胞内融合物を含めて)、培養除核赤血球系細胞、培養有核赤血球系前駆細胞、及びK562赤白血病細胞を含む複数の細胞型で発現し得ることを決定的に実証している。

## 【0584】

図3B及び図3Fは、除核培養細胞における2つの外因性タンパク質の同時発現を実証する。

40

## 【0585】

図3Bでは、本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。グリコホリンAシグナル配列、HAエピトープタグ、グリコホリンAコード配列、ウイルスT2A切断可能配列及びGFPをコードするトランス遺伝子コンストラクトを、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによってアセンブルした。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。この細胞を本明細書に記載されるとおり培養して最終分化させた。両方のトランス遺伝子の発現を検出するため蛍光抗HA抗体及びGFP蛍光を使用して、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって細胞を分析した。

## 【0586】

50

図3Fでは、本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。グリコホリンAシグナル配列、B型肝炎表面抗原に特異的な抗体scFv、HAエピトープタグ、グリコホリンAコード配列、ウイルスT2A切断可能配列及びGFPをコードするトランス遺伝子コンストラクトを、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによってアセンブルした。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。この細胞を本明細書に記載されるとおり培養して最終分化させた。両方のトランス遺伝子の発現を検出するため蛍光抗HA抗体及びGFP蛍光を使用して、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって細胞を分析した。

【0587】

実施例21：血小板におけるmRNAからのタンパク質の発現

10

外因性トランスフェクトmRNAから翻訳される外因性タンパク質の血小板における発現を、フローサイトメトリーによって計測した。端的には、多血小板血清を190gで15分間遠心して赤血球及び白血球を除去した。次に上清を2500gでさらに5分間スピンドルして血小板をペレット化した。血小板を5mLの1 $\mu$ Mプロスタグランジン含有タイロード緩衝液に再懸濁し、洗浄し、750 $\mu$ Lの1 $\mu$ Mプロスタグランジン含有タイロード緩衝液に再懸濁した。目的の遺伝子、この例ではGFPをコードするmRNAを、リポフェクタミンと1:1mg/mL比で混合した。この混合物を5分間インキュベートし、次に洗浄した血小板集団に加えた。この混合物をゆっくりと揺らしながら室温で24時間インキュベートした。トランス遺伝子の血小板発現を、フローサイトメトリーによってGFP蛍光を計測してアッセイした。表面タンパク質もまたフローサイトメトリーによってアッセイすることができる。細胞質タンパク質又は他の細胞内発現したタンパク質はまた、ウエスタンブロットによってもアッセイすることができる。

20

【0588】

外因性タンパク質を血小板中及びその上に導入することには、治療上意味がある。血小板は核又はRNA転写機構を有しないため、DNAトランスフェクションは、血小板に外因性タンパク質発現を導入する実行可能な手段ではない。しかしながら、mRNAトランスフェクション及び翻訳は、外因性タンパク質を細胞に導入する一方法である。血小板はmRNA翻訳機構を含むと考えられているが、しかしこれまで、血小板が外因性mRNAを受け入れてタンパク質に翻訳することが可能かどうかは分からなかった。

【0589】

30

図4は、トランス遺伝子、この場合GFPをコードする外因性mRNAの、血小板による翻訳を実証する一連のフローサイトメトリープロットである。GFPは、488nmレーザーで励起した後のFL1チャンネル内の蛍光によって検出される。(4A)非トランスフェクト血小板(1.7%GFP+)。(4B)3 $\mu$ g GFP mRNAをトランスフェクトした血小板(8.6%GFP+)。(4C)6.8 $\mu$ g GFP mRNAをトランスフェクトした血小板(3.3%GFP+)。

【0590】

これらのデータは、初めて、血小板により外因性mRNAが外因性タンパク質に翻訳されることを決定的に実証している。

【0591】

40

実施例22：酵素の活性

図5は、赤血球系細胞に含まれる酵素の活性を実証する。分化の過程にわたるタンパク質の保持について、細胞質酵素の生化学的活性をウエスタンブロットによって評価した。細胞質酵素の生物学的活性はインビトロ酵素活性アッセイによって評価した。

【0592】

図5は、培養赤血球系細胞で発現する2つの異なる細胞内酵素の活性を示す。

【0593】

1. アデノシンデアミナーゼ

C末端にHAタグを有するアデノシンデアミナーゼをコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築した。このトランス遺伝子を

50

、本明細書に記載されるとおりリポフェクタミントランスフェクション (Life Technologies) によって HEK-293T 細胞に導入した。酵素活性は、Helenius 2012, Biochim Biophys Acta 1823 (10) : 1967 に基づくプロトコルを用いてアッセイされ、このプロトコルでは、特定の酵素混合物がプリンを尿酸及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に変換した後、続いて生成された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を蛍光定量的に検出する。端的には、トランスフェクションの2日後、細胞を回収し、培地を吸引し、細胞にクレブス・リンゲルリン酸グルコース (KRP G; 含有物: 145 mM NaCl、5.7 mM リン酸ナトリウム、4.86 mM KCl、0.54 mM CaCl<sub>2</sub>、1.22 mM MgSO<sub>4</sub>、及び 5.5 mM グルコース; pH 7.35) を 2 × 10<sup>5</sup> 細胞/mL で加えた。アデノシンを 50 μM で加えた。6 時間反応させた後、上清を回収し、60 で 5 分間熱失活させた。上清のアリコート、0.25 U/mL 細菌性プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) 及び 0.15 U/mL 微生物性キサンチンオキシダーゼ (XO) (いずれも Sigma から) が入った白色 96 ウェルマイクロプレートのウェルに移した。室温で 20 分間インキュベートした後、マイクロウェルに HRP (最終濃度 1 U/mL、Sigma) 及び Amplex Red 試薬 (60 μM、Invitrogen、Molecular Probes) を含有する 30 μL の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 検出混合物を加え、続いてそれぞれ 545 及び 590 nm の発光波長及び励起波長で蛍光強度を計測した (Tecan Infinite M200)。

【0594】

## 2. フェニルアラニンヒドロキシラーゼ

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。C 末端に HA タグを有するフェニルアラニンヒドロキシラーゼをコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築した。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。形質導入の2日後、細胞を回収し、PBS 緩衝液で洗浄し、及び RIPA 細胞溶解緩衝液 (Pierce) に溶解させた。細胞溶解物 (64 μg 総タンパク質) を、100 mM トリス-HCl、pH 7.5、4 mM DTT、4 mM フェニルアラニン、33 μg カタラーゼ、及び 0.4 mM DMPH4 (全て Sigma) を含有する 1 mL 反応緩衝液に加えた。反応を 37 で一晩実行した。インキュベーション後、試料を Amicon Ultra-4 遠心フィルタ 10 KD (Millipore UFC801024) において 3700 rpm で 10 分間スピンさせて遠心ろ過することにより脱タンパク質化した。試料を回収し、チロシン濃度に関して 540 nm の吸光度によってアッセイした。

【0595】

これらの外因性タンパク質は両方とも最終分化の終わりまで保持されたが、当該技術分野では、赤血球系細胞が基本機能に不要なタンパク質の厳しい除去プログラムを受けることが周知である点を考えれば、これは軽視できない成果である (Liu J et al. (2010) Blood 115 (10) : 2021-2027, Lodish HF et al. (1975) Developmental Biology 47 (1) : 59)。図 5A においては、有核前駆細胞 (「分化 I D5」) から除核赤血球系細胞 (「分化 I II D8」) に至るまでの分化の過程にわたる種々の時点で、外因的に過剰発現したタンパク質アデノシンデアミナーゼが抗 HA ウエスタンブロットによって検出される。図 5C においては、有核前駆細胞 (「分化 I D5」) から除核赤血球系細胞 (「分化 I II D8」) に至るまでの分化の過程にわたる種々の時点で、外因的に発現した微生物タンパク質フェニルアラニンヒドロキシラーゼが抗 HA ウエスタンブロットによって検出される。

【0596】

加えて、これらの酵素はいずれも、基質を産物に酵素的に変換するそれらの能力を維持した。図 5B は、インタクトなアデノシンデアミナーゼ発現 293T 細胞によるアデノシンからイノシンへの酵素変換を示す。図 5D は、培養フェニルアラニンヒドロキシラーゼ発現除核赤血球系細胞のライセートによるフェニルアラニンからチロシンへの酵素変換を

示す。

【0597】

これらのデータは、培養プロセス全体を通して赤血球系細胞で外因性酵素が保持されること、及びそれらの外因性酵素が赤血球系細胞において酵素的に活性であることを決定的に実証しており、これは治療上、深い意味を有する。

【0598】

実施例23：CR1の活性

図6は、培養赤血球系細胞の表面上で過剰発現した補体受容体1（CR1）の生化学的活性及び生物学的活性の両方を示す。CR1の生化学的活性は、免疫複合体との結合に関してフローサイトメトリーによって評価した。CR1の生物学的活性は、共培養アッセイにおけるマクロファージへの免疫複合体のトランスファーによって評価した。

10

【0599】

1. CR1発現細胞の免疫複合体結合

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。補体受容体1（CR1）をコードするトランス遺伝子コンストラクトを、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築した。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。トランス遺伝子発現レベルは、抗CR1抗体（Abcam）を使用して本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって評価した。この細胞を本明細書に記載されるとおり培養して最終分化させた。

【0600】

Dylight 650 標識ウシ血清アルブミン（BSA-650）を、抗体過剰のポリクローナルウサギ抗BSA（Abcam）と共に室温で30分間インキュベートした。次にこの複合体をヒト血清と1：1容積比で37で30分間混合した。対照複合体は、ヒト血清と混合しないか、又は熱失活したヒト血清と混合するかのいずれかであった。

20

【0601】

複合体をCR1発現細胞と共に37で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、フローサイトメトリーによってDylight 650 蛍光を検出することにより免疫複合体の捕捉に関して分析した。

【0602】

2. マクロファージへの免疫複合体トランスファー

100nMホルボールミリステートアセテート（PMA）と共に37で24時間インキュベートすることにより、培養U937単球を活性化した。免疫複合体で被覆された細胞（上記参照）を活性化U937マクロファージと共に37で30分間インキュベートした。この共培養物をフローサイトメトリーによって分析した。FSC/SSCゲーティングによってマクロファージを同定した。マクロファージ集団のDylight 650 蛍光を検出することにより、マクロファージにおける免疫複合体の存在を分析した。

30

【0603】

図6は、培養赤血球系細胞で外因的に過剰発現する補体受容体1（CR1）の生化学的活性及び生物学的活性を示す。

【0604】

図6Aは、インビトロでの免疫複合体の捕捉として定義されるCR1の生化学的活性を示す。黒色のヒストグラムは、培養赤血球系細胞で過剰発現したCR1によるBSAベースの免疫複合体の捕捉を示す。網掛けのヒストグラムは、ヒト補体を欠くBSA及びIgGの複合体との最小バックグラウンド結合を示し、結合イベントがCR1媒介性であることを実証している。

40

【0605】

図6Bは、培養赤血球系細胞からマクロファージへの捕捉された免疫複合体のトランスファーとして定義されるCR1の生物学的活性を示す。これは、当該技術分野における標準アッセイであり、以下を参照されたい：Repik et al. 2005 Clin Exp Immunol. 140:230; Liet al. 2010 Infec

50



tion Immunity 78(7):3129。トランスファーはフローサイトメトリーによって評価され、マクロファージにおける標識された免疫複合体から生じる蛍光の強度として計測される。このアッセイでは、免疫複合体無しにインキュベートされるマクロファージ(黒色のバー)は蛍光にならない。補体を欠く(従ってCR1に結合しない)BSA及びIgGの複合体と共にインキュベートするマクロファージは、培養CR1過剰発現赤血球系細胞の存在とは無関係に、少量の免疫複合体のみを取り込む(塗り潰した灰色のバー)。この取込みは、U937細胞のFc-受容体がIgG分子のFc領域と相互作用することに起因する可能性が高い。CR1過剰発現細胞の非存在下で免疫複合体(BSA+IgG+補体)と共にインキュベートされるマクロファージは(網掛けのバー、左)、恐らくは同じFc-の媒介による方法によって補体の非存在下と同じ量の免疫複合体を取り込む。しかしながら、CR1過剰発現細胞の存在下で免疫複合体と共にインキュベートされるマクロファージ(網掛けのバー、右)は、蛍光によって計測するとき略2倍の数の免疫複合体を取り込む。

#### 【0606】

これらのデータは、培養赤血球系細胞におけるCR1過剰発現が前記赤血球系細胞上の免疫複合体の捕捉を可能にし、赤血球系細胞からマクロファージへの免疫複合体のトランスファーを促進し、マクロファージによって取り込まれる免疫複合体の速度及び数を大幅に増加させることを決定的に実証している。

#### 【0607】

実施例24: scFvの活性

図7は、膜貫通タンパク質GPAとの融合物として培養赤血球系細胞の表面上で外因的に発現する抗体scFvの生化学的活性及び生物学的活性を示す。

#### 【0608】

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。グリコホリンAのリーダー配列、B型肝炎表面抗原に特異的な抗体scFv(scFv、Bose 2003, Molecular Immunology 40:617に記載される)、HAエピトープタグ、[Gly-3-Ser]2可動性リンカー、及びグリコホリンAの本体をコードするトランス遺伝子コンストラクトを、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによってアセンブルした。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。トランス遺伝子発現を、抗HA抗体(Abcam)を使用して本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって評価した。この細胞を本明細書に記載されるとおり培養して最終分化させた。抗体scFvの生化学的活性は、標的タンパク質、この場合B型肝炎表面抗原(HBsAg)との結合に関してフローサイトメトリーによって評価した。組換えHBsAgタンパク質(Abcam)をDylight-650フルオロフォア(Pierce)で標識した。scFv発現細胞を100nMの標識タンパク質とインキュベートし、PBS中で洗浄し、Dylight 650蛍光に関して本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって分析した。

#### 【0609】

抗体scFvの生物学的活性は、フローサイトメトリーによって検出されるHBsAgのインビボ捕捉によって評価した。組換えHBsAgタンパク質(Abcam)をDylight-650フルオロフォア(Pierce)で標識した。scFv発現細胞をCFSE(Sigma)で蛍光標識した。免疫不全NSGマウス(Jackson Labs)に約400pmolの標識HBsAgを尾静脈注射した。数分後、同じマウスに $2 \times 10^7$ 個のscFv発現細胞を注射した。一定の間隔で血液を顎下穿刺によってEDTA入りチューブに採取した。採取した血液細胞を洗浄し、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって分析した。ヒト細胞はCFSE陽性であると特定された。ヒト細胞におけるDylight 650蛍光としてHBsAgの捕捉を検出した。

#### 【0610】

図7A~図7Bは、その同種抗原、B型肝炎表面抗原(HBsAg)の結合として定義

10

20

30

40

50

される抗体 s c F v の生化学的活性を示す。図 7 A においては、抗体 s c F v を発現する細胞（黒色）又はそれを発現しない細胞（灰色網掛け）を 450 nM H B s A g と共にインキュベートし、ビオチン化抗 H B s A g 抗体及び蛍光ストレプトアビジンで染色する。抗体 s c F v を発現する細胞（この培養物中の細胞の約 45%）は抗原と結合する。図 7 B においては、抗体 s c F v を発現する細胞を様々な濃度の H B s A g と共にインキュベートして上記のとおり染色し、結合イベントが用量依存性であって、親和性が約 10 nM であることが示される。

#### 【0611】

図 7 C ~ 図 7 D は、マウスにおいて循環中にある間の同種抗原 H B s A g の捕捉として定義される抗体 s c F v の生物学的活性を示す。この実験では、免疫不全 N S G マウスに約 400 p m o l の蛍光標識 H B s A g を尾静脈注射した。5 分後、培養除核赤血球系細胞（7 C）又は外因性抗体 s c F v を発現する培養除核赤血球系細胞（7 D）を尾静脈注射した。注射前、全ての培養細胞を C F S E 蛍光色素で標識した。6 時間後に血液を採取し、フローサイトメーターで分析し、C F S E + ヒト細胞でゲーティングした。裸の培養細胞は H B s A g に結合しなかったが（7 C）、一方、抗体 s c F v 発現細胞は H B s A g に結合する（7 D）。生化学的活性実験と一致して、この培養物中の細胞の約 45% が抗体 - s c F v を発現する。

#### 【0612】

これらのデータは、抗体 s c F v が培養赤血球系細胞の表面上で発現するとき生化学的活性であること、及び赤血球系細胞上の抗体 s c F v がインビボで循環中にあるときその標的に結合可能であることを実証している。これは、循環中の物質の捕捉、隔絶、及びクリアランスが所望される治療手法にとって深い意味を有する。

#### 【0613】

実施例 25：活性 - 循環クリアランス

図 8 は、標的の循環クリアランスに使用される表面分子捕捉剤の生化学的活性及び生物学的活性の両方を示す。

#### 【0614】

捕捉剤、この場合 H A ポリペプチド及びビオチンの生化学的活性は、標的タンパク質、この場合抗 H A 抗体及び抗ビオチン抗体との結合に関してフローサイトメトリーによって評価した。捕捉剤の生物学的活性は、フローサイトメトリー及び血漿タンパク質定量化により検出するときの標的タンパク質のインビボ捕捉及びクリアランスによって評価した。

#### 【0615】

##### 1. 化学的に修飾された細胞による抗ビオチン抗体の捕捉

正常ヒトドナー由来の赤血球を購入した（Research Blood Components）。細胞を C F S E（Sigma）によって製造者の指示に従い 37 で 20 分間標識した。次に、0.02 容積の 2 m M ストックビオチン試薬を使用して細胞を製造者の指示に従い N H S - ビオチン（Sigma）で室温で 30 分間ビオチン化した。抗ビオチン抗体（Abcam）を D y l i g h t 650（Pierce）で蛍光標識した。標識抗ビオチン抗体及び C F S E 蛍光を検出マーカーとして使用してフローサイトメトリーによって細胞の標識効率を評価した。250 u g の標識抗体を N S G マウス（Jackson Labs）に尾静脈から静脈内注射した。4 時間後、 $1 \times 10^8$  個のビオチン化細胞を尾静脈から静脈内注射した。一定の間隔で血液を顎下穿刺によって E D T A 入りチューブに採取した。採取した血液細胞を洗浄し、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって分析した。ヒト細胞は C F S E 陽性であると特定された。ヒト細胞における D y l i g h t 650 蛍光として抗ビオチン抗体の捕捉を検出した。採血からの血漿を E L I S A によってビオチン被覆マイクロプレート（Pierce）を使用して製造者の指示に従い分析し、循環中の抗体レベルを検出した。

#### 【0616】

##### 2. トランスジェニック培養細胞による抗 H A 抗体の捕捉

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。グリコホリン A シグナル配列、

10

20

30

40

50

HAエピトープタグ、グリコホリンAコード配列、ウイルスT2A切断可能配列及びGFPをコードするトランス遺伝子コンストラクトを、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによってアセンブルした。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。この細胞を本明細書に記載されるとおり培養して最終分化させた。Dylight 650 (Pierce) 及びGFP蛍光で蛍光標識した抗HA抗体 (Life Technologies) を使用して、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって細胞を分析し、両方のトランス遺伝子の発現を検出した。250 µgの標識抗HA抗体をNSGマウス (Jackson Labs) に尾静脈から静脈内注射した。4時間後、 $1 \times 10^8$  個の培養細胞を尾静脈から静脈内注射した。一定の間隔で血液を顎下穿刺によってEDTA入りチューブに採取した。採取した血液細胞を洗浄し、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって分析した。ヒト細胞はCFSE陽性であると特定された。ヒト細胞におけるDylight 650 蛍光として抗HA抗体の捕捉を検出した。採血からの血漿をELISAによってHAペプチド被覆マイクロプレート (Pierce) を使用して製造者の指示に従い分析し、循環中の抗体レベルを検出した。

10

## 【0617】

図8は、(8A~8B) GPAとの融合物として培養赤血球系細胞の表面上で発現するポリペプチド (polypeptide) HA、及び(8C~8D) 初代赤血球の表面に化学的にコンジュゲートしたビオチンの生化学的活性及び生物学的活性を示す。生化学的活性は、インビトロでの標的タンパク質の捕捉として定義される。生物学的活性は、インビトロでの標的タンパク質のクリアランスの亢進として定義される。

20

## 【0618】

図8Aにおいては、GPAのN末端との融合物として発現するHAポリペプチドが、インビボでマウス抗HA抗体を捕捉する。NSGマウスに蛍光標識マウス抗HA抗体を注射し、続いて表面上にGPAとの融合物としてHAエピトープタグを発現しない(上)、或いは発現する(下) 培養ヒト赤血球系細胞を注射した。血液を採取し、細胞をフローサイトメーターで分析した。x軸はCFSE蛍光を表す。y軸は抗HA抗体Dylight 650 蛍光を表す。両方の試料でCFSE陽性培養ヒト赤血球が観察されるが、HAエピトープタグを発現する細胞のみが、循環抗HA抗体を捕捉することが可能である。

30

## 【0619】

図8Bにおいては、マウスに抗HA抗体を注射し、次に任意選択で、その表面上にGPAとの融合物としてHAペプチドを発現しない、或いは発現する培養ヒト赤血球系細胞を注射した。複数の時点で血漿を採取し、血漿中の抗HA抗体レベルを、HAペプチド被覆プレートを基質として使用してELISAによって評価した。抗HA抗体のみ(白色の丸、実線 - このマウスは120分後に治療とは無関係な原因によって死亡した) 又は抗HA抗体と、続いてその表面上にHAペプチドを発現しない細胞(破線)を注射したマウスは、細胞の注射後24時間まで循環中に有意な抗体を有する。対照的に、抗HA抗体と、続いてその表面上にHAペプチドを発現する細胞を注射したマウスは、数分以内に標的抗体が枯渇する。このデータは、その表面上に外因性抗原ポリペプチドを発現する培養赤血球系細胞によって標的抗体が循環から急速且つ特異的に除去されることを決定的に実証している。

40

## 【0620】

図8Cにおいては、アミン官能化化学によって赤血球系細胞の表面にコンジュゲートしたビオチン分子が、マウス抗ビオチン抗体を捕捉する。これらの例のいずれにおいても、捕捉はフローサイトメトリーによって評価した。CFSE標識され且つビオチン化された細胞は、蛍光抗ビオチン抗体で染色したときダブルポジティブとして現れ(下側のドットプロット)、一方、ビオチン化されていないCFSE標識細胞は、シングルポジティブとして現れるのみである(上側のドットプロット)。

## 【0621】

図8Dにおいては、マウスに抗ビオチン抗体を注射し、次に任意選択で、その表面上で

50

ビオチンにコンジュゲートされていない、又はコンジュゲートされている培養ヒト赤血球系細胞を注射した。複数の時点で血漿を採取し、血漿中の抗ビオチン抗体レベルを、ビオチン被覆プレートを基質として使用してELISAによって評価した。抗ビオチン抗体のみ（白色の丸、実線）又は抗ビオチン抗体と、続いてその表面上でビオチンにコンジュゲートされていない細胞（破線）を注射したマウスは、細胞の注射後24時間まで循環中に有意な抗体を有する。対照的に、抗ビオチン抗体と、続いてその表面上でビオチンにコンジュゲートされている細胞を注射したマウスは、数分以内に標的抗体が枯渇する。このデータは、その表面上に外因性抗原ポリペプチドを含む培養赤血球系細胞によって標的抗体が循環から急速且つ特異的に除去されることを決定的に実証している。

【0622】

10

総合して、これらのデータは、外因性抗原発現EHC上の好適な外因性抗原が循環中にあるときインビボでその標的分子を結合して標的分子の急速な循環クリアランスを媒介し得ることを決定的に実証しており、これは治療上、深い意味を有する。

【0623】

実施例26：補体調節因子の活性

外因性抗原発現EHCの補体調節活性は、当該技術分野において公知の標準CH50及びAH50アッセイによって評価する（例えば、Kabata et al. 1961 Exp Immunochem pp. 133-239及びPlatts-Mills et al. 1974 J Immunol 113:348を参照）。

【0624】

20

簡潔に言えば、CH50アッセイは標的細胞としてヒツジ赤血球(SRBC)を利用する。簡潔に言えば、GVB(2+)緩衝液(Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>含有ゼラチン/ペロナル緩衝生理食塩水)、pH7.35に1×10<sup>9</sup>個のSRBC/mlを含有する懸濁液を調製する。溶血素(ウサギ抗ヒツジ抗血清)を力価測定して、SRBCを感作するのに最適な希釈を決定する。希釈した溶血素(1:800)を等容積のSRBC(1×10<sup>9</sup>SRBC/)と混合し、全てを37で15分間インキュベートする。これにより5×10<sup>8</sup>/mlの抗体被覆赤血球(EA)が得られる。EA(100μl)を、正常ヒト血清(NHS)の100μlの5つの段階2倍希釈物(1:20、1:40、1:80、1:160、及び1:320)又はNHSと外因性抗原発現EHCとの混合物の同様の希釈物と共に37で1時間インキュベートする。GVB2+緩衝液とインキュベートするNHSを対照として使用する。EAを緩衝液単独(血清を加えない)と共にインキュベートすることによりバックグラウンド対照を得て、EAに蒸留水を加えることにより総溶解(100%溶血)を決定する。1.2mlの氷冷0.15M NaClを使用して反応を停止させ、混合物をスピンドして非溶解細胞をペレット化し、上清の光学濃度を分光光度法(412nm)で決定する。100%溶解対照と比べた溶血パーセンテージを決定する。アッセイ混合物中の細胞の50%を溶解させるために必要な血清希釈度を決定することにより、補体活性を定量化する。結果は、この希釈度の逆数としてCH50単位/ml血清単位で表す。

30

【0625】

簡潔に言えば、AH50アッセイは、第二経路の活性化によるヒト血清による非感作ウサギ赤血球(Erab)の溶解に依存する。アッセイ緩衝液にカルシウムキレーターエチレンジグリコール四酢酸(EGTA)を加えることによりカルシウム依存性古典経路の活性化を阻止し、及びこの緩衝液に、両方の経路に必要なマグネシウムを加える。簡潔に言えば、GVB-Mg<sup>2+</sup>-EGTA緩衝液にウサギRBC(2×10<sup>8</sup>細胞/ml)の細胞懸濁液を調製する。正常ヒト血清(NHS)の段階1.5倍希釈物(1:4、1:6、1:9、1:13.5、及び1:20.25)又はNHSと外因性抗原発現EHCとの混合物の同様の希釈物をGVB-Mg<sup>2+</sup>-EGTA緩衝液に調製し、100μlの各血清希釈物を50μlの標準化Erabに加える。GVB-Mg<sup>2+</sup>-EGTA緩衝液とインキュベートしたNHSを対照として使用する。次にこの混合物を、振盪水浴中で細胞を懸濁下に保ちながら37で60分インキュベートし、1.2mlの氷冷NaCl(0.15

40

50

M)を使用して反応を停止させる。チューブを1250g、4で10分間スピンして細胞をペレット化し、上清の光学濃度を分光光度法(412nm)で決定する。バックグラウンド対照は100 $\mu$ lのGVB-Mg<sup>2+</sup>-EGTA緩衝液、及び50 $\mu$ lのErabを有し、10%の総溶解を超えない。総溶解物対照チューブにおいて50 $\mu$ l Erab懸濁液に100 $\mu$ lの蒸留水を加え、100%溶解対照と比べた溶血のパーセンテージを決定する。アッセイの結果を計算し、アッセイ混合物中の細胞の50%を溶解させるために必要な血清希釈度を決定することにより、補体活性を定量化する。結果は、この希釈度の逆数としてAH50単位/ml血清単位で表す。

#### 【0626】

実施例27：血小板に負荷したチミジンホスホリラーゼの活性

10

C末端にHAタグを有するチミジンホスホリラーゼをコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築する。本明細書に記載されるとおり前駆細胞から血小板を培養する。本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によってトランス遺伝子を培養血小板前駆細胞に導入する。培養血小板内でのチミジンホスホリラーゼの発現を、本明細書に記載されるとおり、抗HA検出抗体を使用してウエスタンブロッティングにより評価する。

#### 【0627】

チミジンからチミンへの変換率を定量化することにより、血小板試料においてチミジンホスホリラーゼ活性を決定する。予備実験を行って、時間及び酵素希釈度に対する線形代謝産物形成動態を決定する；この方法は、4.0~719nmol/分/mlのチミンホスホリラーゼ範囲(10~9088の試料希釈度範囲に対応する)に対し、16分まで線形であることが示される。解凍した試料を125mMトリス-HCl、pH7.4で1:710希釈することにより、透析前試料培養血小板及び対照血小板試料のライセートを調製する。次に25 $\mu$ lの血小板溶解物を100 $\mu$ lリン酸ナトリウム緩衝液(100mM、pH6.5)及び25 $\mu$ lチミジン標準(10mM)に加え、混合し、37で10分間インキュベートする。この反応は25 $\mu$ lの40%TCAで停止させる。血小板溶解物を加える前にTCAをリン酸ナトリウム緩衝液/チミジンインキュベーション混合物に加えることにより、アッセイブランクを調製する。試料を13,400 $\times$ gで2分間遠心し、上清を振盪機において水飽和ジエチルエーテルで2分、2回洗浄して、TCAを抽出する。エーテルがHPLC分離を妨害しないように、マトリックスを5分間曝気してエーテルを蒸発させることにより、有効な除去を達成する。HPLCに10 $\mu$ lの試料容積を投入する。

20

30

#### 【0628】

基質及び生成物のクロマトグラフ分離は、Waters Alliance HPLC 2795システムを使用した均一濃度溶離による逆相クロマトグラフィーを用いて達成する。予め充填されたC18カラム(Spherisorb ODS 125mm $\times$ 4.6mm ID、5 $\mu$ m粒度、Waters)を固定相として使用した。HClでpH2.70に調整したイオン対生成剤硫酸水素テトラブチルアンモニウム(5mM)を含有する酢酸アンモニウム(40mM)の移動相を使用して、1.0ml/分の流量で送り、8分のラン時間で分析物を溶離させる。UV検出は254nm及び0.1吸光度単位フルスケールである。スペクトルを純粋標準と比較して代謝産物を同定する。

40

#### 【0629】

実施例28：血小板によって提示されるグッドパスチャー抗原の活性

介在するHAタグを有してCD42b(GP1B、genbank AAH27955.1)のN末端に融合したコラーゲン3(IV)(COL4A3)NC1ドメイン抗原をコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築する。血小板を本明細書に記載されるとおり前駆細胞から培養する。本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によってトランス遺伝子を培養血小板前駆細胞に導入する。培養血小板における外因性抗原の発現を、本明細書に記載されるとおり抗HA検出抗体を使用するフローサイトメトリーによって評価する。

50

## 【0630】

グッドパスチャー症候群に罹患している患者から血清を採取し、その血清を市販のELISA (MyBioSource COL4A3 ELISAキット) によって抗COL4A3抗体に関して試験する。この抗COL4A3血清を一次検出抗体として使用し、及び蛍光抗ヒトIgGを二次検出抗体として使用して、抗原を発現する血小板の結合能を本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって評価する。

## 【0631】

この抗原を発現する血小板を使用して、インビボでの血小板によって促進される循環抗原のクリアランスをマウスにモデル化する。NSGマウスに、DyLight 650色素で蛍光標識した100 $\mu$ Lのマウス抗ヒトCOL4A3抗体 (Creative BioMart) を注射する。次に外因性抗原を発現するCFSE標識培養血小板 (1マウス当たり $10^8$ ) を尾静脈から注射する。10分、30分、2時間、12時間、及び24時間で顎下部位から血液を採取する。血液を遠心して多血小板画分を収集し、次にそれを染色して、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって分析する。CFSE-DyLight 650ダブルポジティブ集団をトラッキングすることにより、血小板による抗体捕捉を決定する。

## 【0632】

## 実施例29：インビボ活性 (マウス)

本明細書に記載されるとおりマウス赤血球系細胞を培養する。赤血球系前駆細胞に、本明細書に記載されるとおりレンチウイルスを使用して、好適である、例えば補体受容体1 (CR1) をコードする外因性抗原ポリペプチドトランス遺伝子を形質導入する。本明細書に記載されるとおり細胞を培養して最終分化させる。細胞における外因性タンパク質の存在を、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって評価する。細胞の検出を促進するため、細胞を蛍光色素、例えばCFSE (Sigma Aldrich) で製造者の指示に従い標識する。ループスのNZBWF1/Jマウスモデル、又は好適な外因性抗原ポリペプチドに対応する他の適切な疾患若しくは活性モデルに細胞を注射し、約 $1 \times 10^8$ 個の細胞を尾静脈から注射する。複数の時点で顎下穿刺によって血液を採取する。ラジ細胞アッセイによって血漿中の免疫複合体レベルを検出する。例えば、Theofilopoulos et al. 1976, J Clin Invest 57(1): 169を参照されたい。採取した血液試料中のCFSE蛍光細胞の割合をトラッキングすることにより、培養細胞の薬物動態を本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって評価する。マウスの全般的な健康を、免疫複合体沈着及び炎症媒介性の損傷をトラッキングするための腎組織の組織学を含め、肉眼的剖検によって評価する。

## 【0633】

## 実施例30：迅速スクリーニング

細胞株、例えば293T及びK562は、発現及び培養サイクル (約1日) が培養赤血球系細胞 (数日~数週間) と比較して短い。これらの細胞株を使用して、好適な外因性抗原ポリペプチドをコードする遺伝子ライブラリを高速で繰り返し適用し、最も高い発現又は活性を有する外因性抗原ポリペプチドを同定することができる。

## 【0634】

好適な外因性抗原ポリペプチドトランス遺伝子、例えば補体受容体1 (CR1) の完全長及びより短い変異体のライブラリを、本明細書に記載されるとおりポリメラーゼ連鎖反応及びギブソンアセンブリによって構築する。このトランス遺伝子のライブラリを、本明細書に記載されるとおりリポフェクタミンを使用してマイクロタイタープレートにおいて並行方式でHEK293T細胞にトランスフェクトし、本明細書に記載されるとおりレンチウイルスを使用してK562細胞に形質導入する。24~48時間後に外因性抗原の発現を本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって評価する。本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーで検出される蛍光免疫複合体の捕捉により、及び本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーで検出される培養単球への蛍光免疫複合体のトランスファーにより、ライブラリ中の外因性抗原の各々の活性を評価する。次にラ

10

20

30

40

50

イブラリからの最も機能性である（例えば、最も高度に発現する、最も多く免疫複合体を捕捉する、又は免疫複合体を単球に最良にトランスファーする）外因性抗原を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルスを使用して本明細書に記載されるとおり並行赤血球系細胞培養物に個々に形質導入する。培養赤血球系細胞における各外因性抗原の発現は、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって評価する。培養赤血球系細胞における各外因性抗原の活性は、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーで検出される蛍光免疫複合体の捕捉により、及び本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーで検出される培養単球への蛍光免疫複合体のトランスファーによって評価する。

#### 【0635】

実施例31：インビボでのRBCのクリアランス速度の評価

10

免疫不全マウスモデルにおいてインビボで赤血球系細胞のクリアランス速度を評価した。-1日目にNSGマウスを100 $\mu$ Lのクロルドネートリポソーム (clordonate liposome) (Clodrosomes.com) 溶液で処置し、マクロファージを選択的に枯渇させた。細胞を蛍光タグCFSEで標識し、約 $1 \times 10^8$ 個の細胞を各マウスに尾静脈から注射した。一定の間隔で血液を顎下穿刺によって採取し、血液細胞を回収した。細胞を抗ヒトGPA抗体で共染色し、フローサイトメトリーによって分析した。ヒト赤血球系細胞は、CFSEシグナルによって、及びヒトGPAシグナルによってマウス赤血球系細胞と区別された。

#### 【0636】

治療上の適用には、培養赤血球系細胞、及び細胞内か或いは表面上に外因性タンパク質を含有する培養赤血球系細胞が、生体内で正常に循環することが重要である。これは、標準的な免疫不全マウスモデルを使用して図9に示される。図9Aにおいては、注射したマウスから採取した血液をフローサイトメーターで分析する。培養ヒト赤血球系細胞は、プロットの右上の象限に、CFSE及びヒト-GPAがダブルポジティブと同定される。図9Bにおいては、マウスにヒト赤血球（塗り潰しの丸）、培養除核赤血球系細胞（破線上の菱形）、細胞内外因性タンパク質を発現する培養除核赤血球系細胞（点線上の四角形）及び表面外因性タンパク質を発現する培養除核赤血球系細胞（白色の三角形）を注射した。ヒト細胞のクリアランス速度は、最初の時点（注射後20分）に対してスケールした時間に対する残存CFSE+細胞のパーセンテージとして計測される。4つの試料間にクリアランス速度の有意な差はない。

20

30

#### 【0637】

これらのデータは、培養除核赤血球系細胞の循環が正常ヒト赤血球と実質的に同様であることを明らかに実証している。さらに、細胞内空間又は細胞の表面上のいずれで発現する外因性タンパク質も、これらの細胞の循環挙動に実質的に影響を及ぼさない。これは、この技術の治療的解釈にとって重要な結果である。

#### 【0638】

実施例32：有害循環事象の評価

循環中の培養赤血球系細胞によって引き起こされる有害事象の発生を、培養赤血球系細胞を注射した動物における血中のフィブリノゲン崩壊産物の検出及び組織学によって評価した。

40

#### 【0639】

フィブリノゲン崩壊産物の検出。本明細書に記載されるとおりマウスに培養赤血球系細胞を注射した。マウスから血液を顎下穿刺によってEDTA入りチューブに採取した。遠心によって細胞を分離し、血漿を収集した。マウス血漿中のフィブリノゲン崩壊産物フィブリノペプチドA及びフィブリノペプチドBのレベルをELISA (My Biosource) によって製造者の指示に従い計測した。

#### 【0640】

組織学。同じマウスの組織試料を死体解剖後に採取した。組織をトリミングし、パラフィンワックスに包埋して切片化した。組織切片をH&E染色及びトリクロム染色によって染色した。10倍及び20倍の拡大率で顕微鏡像を撮った。

50

## 【0641】

治療上の適用には、培養赤血球系細胞及び外因性タンパク質を（細胞内又は表面上のいずれかに）含む培養赤血球系細胞が凝固カスケードの活性化及び組織血栓形成などの有害事象を誘導しないことが重要である。

## 【0642】

図10A及び図10Bは、（1）ヒト赤血球、（2）培養除核赤血球系細胞、（3）細胞内外因性タンパク質を発現する培養除核赤血球系細胞、（4）表面外因性タンパク質を発現する培養除核赤血球系細胞、及び（5）組換えタンパク質単独を注射したマウスに関するマウス血漿中のフィブリノペプチドA及びBのレベルを示す。凝固カスケードのフィブリノゲン崩壊及び活性化マーカーであるフィブリノペプチドA及びBのレベルは、全ての試料で実質的に同程度である。

10

## 【0643】

図10C及び図10Dは、培養除核赤血球系細胞（10C）及び組換えタンパク質（10D）を注射したマウスに関する脾臓の組織染色切片を示す。組織間に実質的な差はなく、試料のいずれの間においても、脾臓、肝臓、肺、脳、心臓、及び腎臓に同定可能な組織損傷は観察されなかった。

## 【0644】

これらのデータは、外因性タンパク質を含む又は含まない培養赤血球系細胞が、マウスにおいて循環中にある間にいかなる有害事象も誘導しないことを決定的に実証している。

## 【0645】

実施例33：循環中における外因性タンパク質保持の評価

培養除核赤血球系細胞内及びその上での外因性タンパク質の保持をフローサイトメトリー及びウエスタンブロットングによって評価した。

20

## 【0646】

1. フローサイトメトリーによって評価した外因性タンパク質の保持

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。グリコホリンAシグナル配列、B型肝炎表面抗原に特異的な抗体scFv、HAエピトープタグ、及びグリコホリンAコード配列をコードするトランス遺伝子コンストラクトを、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによってアセンブルした。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。この細胞を本明細書に記載されるとおり培養して最終分化させた。細胞をCFSEで蛍光標識し、免疫不全NSGマウス（Jackson Labs）に尾静脈から注射した（1マウス当たり $1 \times 10^8$ 細胞）。一定の間隔で血液を顎下穿刺によって採取した。採取した細胞を蛍光抗HA抗体（Abcam）で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。ヒト細胞をCFSE+細胞と同定し、エピトープタグに関しても陽性染色されたCFSE+細胞の画分によって外因性タンパク質保持を評価した。

30

## 【0647】

2. ウエスタンブロットによって評価した外因性タンパク質の保持

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。アデノシンデアミナーゼ及びHAエピトープタグをコードするトランス遺伝子コンストラクトを、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによってアセンブルした。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。この細胞を本明細書に記載されるとおり培養して最終分化させた。細胞をCFSEで蛍光標識し、免疫不全NSGマウス（Jackson Labs）に尾静脈から注射した（1マウス当たり $1 \times 10^8$ 細胞）。一定の間隔で血液を顎下穿刺によって採取した。採取した細胞を洗浄し、溶解し、HAエピトープタグに対する検出抗体で本明細書に記載されるとおりウエスタンブロットによって分析した。

40

## 【0648】

治療上の適用には、細胞内或いは表面上に外因性タンパク質を含む培養赤血球系細胞が循環中にある間にこれらのトランス遺伝子を保持することが重要である。当該技術分野に

50



においては、赤血球系細胞が循環中にあるとき、成熟し及び成熟するに従い基本的な機能に不要なタンパク質を除去する厳密なプログラムを受けることが広く仮定されている点を考えると、これは軽視できない成果である (Liu J et al. (2010) Blood 115(10):2021-2027, Lodish HF et al. (1975) Developmental Biology 47(1):59)。

【0649】

図11は、培養除核赤血球系細胞内及びその上で発現する外因性タンパク質が循環中に保持されたことを示す。図11Aでは、マウスに、抗体s c F vを表面上に発現する培養除核赤血球系細胞を注射した。抗体s c F v陽性細胞の割合は約50%で始まり、複数日の循環試験の継続期間中そのまま一定に保たれた。図11Bでは、マウスに、H Aタグを有する細胞質酵素を発現する培養除核赤血球系細胞又はH Aタグを有する組換え酵素のいずれかを注射した。ウエスタンブロットで分析したとき、実験の継続期間にわたり酵素が培養細胞内に保持されたことは明らかである。バンド強度の低下は実験中の細胞のクリアランスに起因し、前記細胞から外因性酵素が外れたことによるものではない。

【0650】

これらのデータは、培養除核赤血球系細胞内及びその上で発現する外因性タンパク質が循環中において細胞内及びその上に保持されることを明らかに実証しており、これは治療上の関連性に大きい且つ前例のない意味を有する。

【0651】

実施例34：インビボでの半減期延長の評価

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。アデノシンデアミナーゼ及びH Aエピトープタグをコードするトランス遺伝子コンストラクトを、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによってアセンブルした。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりレンチウイルス形質導入によって赤血球系細胞に導入した。この細胞を本明細書に記載されるとおり培養して最終分化させた。細胞をC F S Eで蛍光標識し、免疫不全NSGマウス(Jackson Labs)に尾静脈から注射した(1マウス当たり $1 \times 10^8$ 細胞)。一定の間隔で血液を顎下穿刺によって採取した。採取した細胞を洗浄し、溶解し、H Aエピトープタグに対する検出抗体で本明細書に記載されるとおりウエスタンブロットによって分析した。

【0652】

C末端にH Aタグを有するアデノシンデアミナーゼをコードするトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりギブソンアセンブリによって構築した。このトランス遺伝子を、本明細書に記載されるとおりリポフェクタミントランスフェクション(Life Technologies)によってHEK-293T細胞に導入した。7日後にH Aアフィニティー樹脂(Pierce)を使用して製造者の指示に従い細胞培養上清からタンパク質を精製した。タンパク質濃度は280nmの光の吸光度によって評価した。タンパク質(40ug)を免疫不全NSGマウス(Jackson Labs)に尾静脈から注射した。一定の間隔で血液を顎下穿刺によって採取した。血漿をH Aエピトープタグに対する検出抗体で本明細書に記載されるとおりウエスタンブロットによって分析した。

【0653】

図11Bでは、マウスに、H Aタグを有する細胞質酵素を発現する培養除核赤血球系細胞又はH Aタグを有する組換え酵素を注入した。ウエスタンブロットで分析したとき、可溶性形態で注入したときと比較して、循環細胞内で発現したときには酵素の循環半減期が有意に延長されることは明らかである。

【0654】

実施例35：インビボでのクリアランス速度の評価 - 血小板

外因性チミジンホスホリラーゼを発現する血小板の集団を、本明細書に詳説される手順を用いて培養し、C F S Eで標識し、NSGマウスに尾静脈から注射する。ヒト供給源の天然血小板の集団を同様にC F S Eで標識し、別のマウスに注射する。両方のマウスから10分、1時間、4時間、8時間、24時間、及び48時間の時点で試料を採取し、フロ

10

20

30

40

50

ーサイトメトリーを用いて血小板循環レベルを定量化する。天然血小板と培養血小板の半減期を比較する。

【0655】

実施例36：有害循環事象の評価 - 血小板

治療上の適用には、培養血小板及び外因性タンパク質を（細胞内又は表面上のいずれかに）含む培養血小板が凝固カスケードの活性化及び組織血栓形成などの有害事象を誘導しないことが重要である。培養血小板をNSGマウスに尾静脈から注射した後、ELISAによって製造者のプロトコルに従い（My Biosource）マウス血漿中のフィブリノゲン崩壊産物フィブリノペプチドA及びフィブリノペプチドBを検出する。死体解剖後、NSGマウスの組織試料を採取する。組織はトリミングし、パラフィンワックスに包埋して切片化する。組織切片をH&E染色及びトリクロム染色によって染色する。10倍及び20倍の拡大率で顕微鏡像を撮り、病原性の特徴について熟練の病理学者が評価する。

10

【0656】

実施例37：循環中における外因性タンパク質保持の評価 - 血小板

培養血小板内及びその上における外因性タンパク質の保持を、フローサイトメトリー及びウエスタンブロットングによって評価する。

【0657】

細胞内外因性タンパク質を含むCFSE標識血小板をマウスに尾静脈から注射する。一定の間隔で血液を顎下穿刺によって採取する。血液を遠心して多血小板血漿を単離し、次にそれを溶解して、外因性タンパク質に存在するエピトープタグを染色してウエスタンブロットで分析する。

20

【0658】

実施例38：生成用ドナー細胞の入手

インフォームドコンセントを得た後、健康CD34+幹細胞ドナーが末梢血幹細胞動員のためにrhG-CSF（Granocyte又はNeupogen）、10ug/kg/日s.c.を5日間受け、次に2日連続でアフレーシスを受けて、動員されたCD34+HSCが収集される。動員された末梢血からFicoll密度勾配遠心法によって単核細胞（MNC）を単離し、2部に分ける。1部は、Miltenyiプロトコルに関連して、抗CD34被覆磁気ビーズ（Miltenyi Biotec, Inc., Germany）を使用したCD34+細胞の精製に使用する。CD34+画分の純度を制御する。次にCD34+濃縮HSCを二段階培養法で直ちに使用するか、又は一段階培養法における使用時まで凍結する。

30

【0659】

使用する完全培地（CM）は、2mM L-グルタミン及び100IU/ml ペニシリン-ストレプトマイシン（Gibco, Grand Island, NY, USA）及び10%熱失活FBS（Gibco）を補充したRPMI 1640（Eurobio, France）である。拡大には、10%熱失活FBSを補充したIMDM（Gibco）を使用する。組換えヒト幹細胞因子（rhSCF）、トロンボポエチン（TPO）、胎児肝チロシンキナーゼ3リガンド（Flt-3L）、GM-CSF、及びTNF- $\alpha$ は、R&Dシステム（Minneapolis, MN, USA）から購入する。

40

【0660】

実施例39：生成用のスケールアップ

静置培養で細胞を $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/mlの密度に維持して、赤血球系細胞の容積を漸進的にスケールアップする。拡大段階は $10^5$ /mlで播種し、3~7回の漸進的な容積替えを含む；100ml、500ml、1L、10L、50L、100L、1000L。生成の過程において、細胞培地はIMDM、FBS、BSA、ホロトランスフェリン、インスリン、グルタミン、デキサメタゾン、エストラジオール、IL-3、SCF、及びエリスロポエチンの組み合わせを含む。細胞が生成バイオリクターに播種するのに適切な容積に達したところで、最終的なスケールアップ及び分化のために細胞を生成バイオリクターに移し替える。

50

## 【0661】

## 実施例40：バイオリアクターでの細胞の培養（Wave）

WAVEバイオリアクター2/10システムを操作マニュアルに従いセットアップする。端的には、Cellbagをロッキングユニットに組み付け、それを灌流モジュールに置く。このバッグを空気で膨張させた後、ウェイトをゼロに設定する。続いてバッグに適切な量の培養培地を充填し、少なくとも2時間インキュベートして培地を37℃に到達させる。2つのポートを有する特別な設計のDURANガラスボトルであるトランスファーフラスコでこのバッグに培地及び細胞を移し替える。フラスコの上においてポートにフィルタを接続する。フラスコの底の近くの他方のポートにはチューブを組み付ける。トランスファーフラスコのチューブをCellbagの供給接続部と結合する。トランスファーフラスコはLAFフード内に維持し、汚染のリスクを低下させる。

10

## 【0662】

灌流開始前、回収及び供給用のチュービング及び容器をCellbagに接続する。チュービングは以下のとおり調製する；それぞれ3.2mm、6.4mmの内径及び外径を有する50又は70cm長さのSaniflexASTP-ELPシリコンチュービング（Gore/SaniflexAB）は、両端に雄型ルアーロック接続部を備える。シリコンチュービングを雌型ルアーロックを介してC-Flexチューブの一端に接続する。C-Flexチューブの他端に雄型ルアーロックを組み付け、その後チュービングをオートクレーブ処理する。全てのチューブ上にルアーロックをジップタイで適所に保持する。灌流に先立ち、供給及び回収の両方のため、シリコン部品をCellbagに接続し、C-Flex部品を5L容器（HycloneLabtainer）に接続する。全ての接続は層流キャビネット内で行う。

20

## 【0663】

環境要因及び代謝要因を制御すると、培養下の赤血球系細胞の転写因子及び遺伝子調節タンパク質の発現又は活性を変えることができる。例えば、Csaszar et al., 2009 Biotechnol Bioeng 103(2):402; Csaszar et al. 2012 Cell Stem Cell 10(2):218を参照されたい。反応器の入出力の制御をもたらすため微量送達システムを作成し、その主要構成要素は、内径が100µmの60~80cm長さの熔融石英毛細管（#TSP100375、Polymicro Technologies）である。入力端で、毛細管には、PEEKルアーを介してMicroTightアダプター（#P-662、Upchurch Scientific）に接続したluer-lock先端ストックシリンジ（#309585 BD）を送り込む。ストックシリンジはモデル33 Twinシリンジポンプ（#553333、Harvard Apparatus）に装填し、4℃の冷蔵庫に保管する。出力端で、毛細管はバイオリアクターに入る：2ポートFEP細胞培養バッグ（#2PF-0002、Vuelife）を37℃、5%CO<sub>2</sub>の細胞培養インキュベーター内のオービタルシェーカーに置く。毛細管を針でセルフシールゴム隔膜（#B-IIS、InterLink）に通し、バイオリアクターの間接点まで送り込む。バイオリアクターの反対側のコネクタは、別のセルフシールゴム隔膜に交換する。ストックシリンジ及び送達毛細管は、使用前に、シリンジ及び毛細管壁にタンパク質が付着することを防ぐため10%ウシ胎仔血清を含有するPBS溶液で一晩ブロックする。

30

40

## 【0664】

National Instruments LabVIEW 7.1を使用してプログラムを作成し、シリンジポンプの注入を制御する。このプログラムの基本的な投与戦略は、初回注射で濃度L1にし、待機時間t1が続き、次に各々濃度L2にする注射と、続く待機時間t2をn回繰り返すものである。使用者が、流量、ストック濃度、初期培養容積、注射後の所望の濃度、注射間の時間、及び総注射回数を入力する。

## 【0665】

## 実施例41：免疫原性及びトレランス誘導の評価

## 1. マウスにおけるトレランス誘導

50

マウスにおいて、抗原タンパク質、この例ではオボアルブミン(OVA)を含む本発明の細胞組成物を逐次的に3回静脈内注射することにより、トランスを誘導し得る。-7日目、-3日目及び-1日目、未処置マウスに遊離OVA又は本発明の細胞組成物中で発現するOVA(細胞-OVA)のいずれかを注射する。次に、強力な免疫反応を誘導するためポリI:Cアジュバント(Invivogen、San Diego、CA)と混合した抗原を2回注射して、マウスをOVAに対して免疫化する。

#### 【0666】

##### 2. 抗体力価の評価

マウス血清中のIgGレベルを標準ELISAによって判定する。簡潔に言えば、抗原タンパク質、例えばオボアルブミン(OVA)を含む本発明の細胞組成物を注射したマウス、及び遊離又は組換えOVAを注射したマウスの血液試料から種々の時点で血清を得る。抗原としてOVA(50mM炭酸塩緩衝液中1µg/ml、pH9.7)をアッセイプレート上に吸着させた標準ELISAアッセイを用いる。治療前又は未治療血清については1:50~1:200の範囲、及び治療後血清については1:400~1:500,000の範囲で血清試料を段階希釈し、デュプリケートで試験する。吸着した組換えOVAに対する血清中の抗OVA抗体の結合は、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートした二次抗マウス免疫グロブリンを続いて発色基質で処理して比色分析によって検出する。

10

#### 【0667】

##### 3. T細胞応答の分析

本明細書に記載するとおり抗原タンパク質OVAに対してトランスが誘導される。OVAの免疫フェーズ注射の2回目の投与から7日後にマウスを安楽死させ、それらの脾臓を採取する。0.8%塩化アンモニウム溶液(Stem-Cell Technologies、Grenoble、フランス)によるRBC溶解後に70ミクロン細胞ストレーナーで臓器を濾すことにより、脾臓細胞懸濁液を得る。試料は全て、抗Fc受容体抗体(精製抗CD16/32、Ozyme、San Diego、CA)と共にインキュベートして非特異的結合を妨げてから、分析用抗体と共にインキュベートする。脾臓細胞染色には、以下のモノクローナル抗体(Ab)を使用する:PC5-抗CD62L(MEL14)及びPC7-抗CD8(Biolegendから購入)。OVAペプチド-MHC四量体(PE-Kb-SIINFELK四量体)はBeckmann Coulterから購入する。OVA特異的T細胞は、フローサイトメトリーにより、抗CD8及びOVAペプチド-MHC四量体での染色によってダブルポジティブの細胞として同定する。この細胞集団のうち、活性化されるOVA特異的CD8 T細胞のパーセンテージを、抗CD62L抗体染色が陽性の細胞の割合によって決定する。

20

30

#### 【0668】

##### 4. インビボT細胞溶解アッセイ

10マイクログラム/mlのSIINFELKペプチド(Genscript、Piscataway、NJ)によって未処理脾臓細胞に37°Cで1時間パルスを与え、次に、0.4µM CFSEで標識する(CFSE低)。未処理脾臓細胞の対照集団は4µM CFSEで標識する(CFSE高)。CFSE低及びCFSE高細胞を1:1の比で組み合わせ、予め本明細書に記載するとおりOVA抗原に対して寛容化したマウス又は本明細書に記載するとおりOVA抗原で免疫化したマウスに対し、マウス当たり $1 \times 10^7$ 個の細胞を静脈内経路で注射する。16時間後、本明細書に記載するとおり脾臓単一細胞懸濁液を調製し、フローサイトメトリーを用いて分析することにより、CFSE低/CFSE高細胞比を決定する。

40

#### 【0669】

##### 実施例42: 培養赤血球系細胞の拡大及び分化を評価する

インビトロ分化細胞の拡大、分化、及び除核を評価して、トランス遺伝子の導入が培養下の細胞の品質に悪影響を及ぼさないよう確実にすることは重要である。拡大は、細胞計数によって評価する。分化は、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、及びRT-

50

PCRによって評価する。除核は、フローサイトメトリーによって評価する。

【0670】

細胞計数による拡大速度の評価。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養する。種々の時点で細胞を回収し、PBSで洗浄し、Countess自動セルカウンター機器(Life Technologies)を使用してカウントする。細胞の拡大速度は、時間に伴う細胞数の増加によって決定する。

【0671】

フローサイトメトリーによる分化の評価。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養する。種々の時点で細胞を回収し、PBSで洗浄し、細胞表面マーカーGPA(CD235a)、CKIT(CD117)、及びTR(CD71)に対する蛍光抗体(Life Technologiesから購入)の1:100希釈物で染色する。標識した細胞を本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって分析する。

10

【0672】

ウエスタンブロットによる分化の評価。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養する。種々の時点で細胞を回収し、PBSで洗浄し、RIPA緩衝液で溶解し、分化マーカーGATA1、GATA2、バンド3、CD44、及びアクチンに対する抗体(Abcam)を使用して、本明細書に記載されるとおりウエスタンブロットによって分析する。

【0673】

フローサイトメトリーによる除核の評価。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養する。種々の時点で細胞を回収し、PBSで洗浄し、グリコホリンAに対する蛍光抗体(Life Technologies)及び核酸染色剤DRAQ5(Pierce)により製造者の推奨する希釈度で染色し、本明細書に記載されるとおりAttuneフローサイトメーターで分析する。

20

【0674】

顕微鏡法(ベンジジン-ギムザ)による除核の評価。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養した。種々の時点で細胞を回収し、PBSで洗浄し、Cytospin(Thermo Scientific)を使用してスライド上でスピンした。細胞は、cytospin後に-20℃のメタノールによって室温で2分間固定し、水でリンスして風乾した。ベンジジン錠(Sigma#D5905)を10mL PBSで溶解し、そこに10μLのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えた。この溶液を0.22μmシリンジフィルタでろ過した。スライド上の細胞スポットを300~500μLのベンジジン溶液で被覆し、室温で1時間インキュベートし、次に水で洗浄した。ギムザ染色液を水で1:20希釈した(Sigma#GS500)。スライド上の細胞スポットを300~500μLのギムザ溶液で被覆し、室温で40分間インキュベートし、水で洗浄して風乾した。次にスライドをマウントし、シールした後、顕微鏡でイメージングした。

30

【0675】

図12Aは、トランス遺伝子を含む細胞(破線及び点線)及びトランス遺伝子を含まない細胞(実線)に関する7日間の拡大及び分化ウィンドウにおける培養下赤血球系細胞の拡大速度を示す。注目すべきことに、トランス遺伝子を含む培養細胞の拡大速度は、トランス遺伝子を含まない細胞の拡大速度と区別がつかない。

40

【0676】

図12Bは、細胞表面分化マーカーGPA及びCKITに対する抗体で染色した細胞の一連のフローサイトメトリープロットである。この特定の分化段階では、細胞が最終的な成熟に近づくにつれ培養物はそのCKIT発現を失い、且つそのGPA発現を増加させている。注目すべきことに、トランス遺伝子を含む培養細胞をこの分化尺度によってトランス遺伝子を含まない培養細胞と区別することはできない。

【0677】

図12Cは、表面マーカーGPAに対する抗体及び蛍光DNA染色剤で染色した細胞の一連のフローサイトメトリープロットである。3つの細胞集団が明らかである:(1)G

50

PA - 高及びDNA - 低の細胞、除核赤血球系細胞が含まれる；(2) GPA - 高及びDNA - 高の細胞、遺伝物質をなおも含む赤血球系細胞が含まれる；及び(3) GPA - 低及びDNA - 高の細胞、ピレノサイト、即ち除核細胞から放出された膜に囲まれた核が含まれる。注目すべきことに、トランス遺伝子を含む培養細胞をこの除核尺度によってトランス遺伝子を含まない培養細胞と区別することはできない。

【0678】

細胞培養物へのトランス遺伝子の導入は、培養下の細胞の拡大速度、分化、又は除核速度に特に著しい影響を及ぼさない。

【0679】

実施例43：ヘモグロビン含量を評価する

10

1. 全ヘモグロビン

赤血球ヘモグロビン含量をドラブキン試薬(Sigma-Aldrich、製品D5941)によって製造者の指示に従い決定した。簡潔に言えば、血液細胞をこの試薬と水性緩衝液中に合わせ、徹底的に混合し、標準的な分光光度計を使用して波長540nmの光の吸光度を計測した。可溶性ヘモグロビン検量線を使用して細胞中のヘモグロビン含量を定量化した。

【0680】

2. RT-PCRによるヘモグロビンタイピング

細胞を溶解したと共に、全RNAを回収する。SuperScript RT-PCR用第一鎖合成システム(First-Strand Synthesis System for RT-PCR)(Life Technologies)によって製造者のプロトコルに従い逆転写を実施した。簡潔に言えば、全RNA(5ug)を10uL H<sub>2</sub>O中の150ngランダムヘキサマープライマー及び10nmol dNTPミックスと共に65℃で5分間、次に氷上で1分間インキュベートした。反応マスター混合物を、2uL 10x RT緩衝液、4uLの25mM MgCl<sub>2</sub>、2uLの0.1M DTT、及び1uLのRNaseOUTと共に調製した。この反応混合物をRNA/プライマー混合物に加え、素早く混合し、次に室温に2分間置いた。各チューブに1uL(50単位)のSuperScript II RTを加え、混合し、25℃で10分間インキュベートした。この反応物を42℃で50分間インキュベートし、70℃で15分間熱失活させ、次に氷上で保存した。1uLのRNaseHを加え、37℃で20分間インキュベートした。次にこの反応産物、第一鎖cDNAを、RT-PCR反応に必要なまで-20℃で保存した。

20

30

【0681】

種々のヘモグロビン遺伝子及び対照遺伝子を増幅するためのプライマーは、IDT-DNAから購入した。プライマーは以下のとおりであった：hHBB\_\_F - tcctgaggagaagtctgccgt(配列番号9)；hHBB\_\_R - ggagtggaacagatccccaaag(配列番号10)；hHBA\_\_F1 - tctcctgccgacaagaccaa(配列番号11)；hHBA\_\_R1 - gcagtggtttagcttgaagtgt(配列番号12)；hHBA\_\_F2 - caacttcaggctaagccactgc(配列番号13)；hHBA\_\_R2 - cgggtgctcacagaagccag(配列番号14)；hHBD\_\_F - gactgctgtcaatgccctgt(配列番号15)；hHBD\_\_R - aaaggcacctaagcacccttctt(配列番号16)；hHBG2\_\_F - cactggagctacagacaagaagggtg(配列番号17)；hHBG2\_\_R - tctcccaaccatagaagataccagg(配列番号18)；hHBE\_\_F - aagagcctcaggatccagcac(配列番号19)；hHBE\_\_R - tcagcagtgatggatggacac(配列番号20)；h18S-RNA-F - cgcaagctaggaaataatggaaatagg(配列番号21)；h18S-RNA-R - catggcctcagttccgaaa(配列番号22)。

40

【0682】

50

25  $\mu$ L SYBRグリーンミックス(2x)(Applied Biosystems)、0.5  $\mu$ L 第1鎖cDNA、2  $\mu$ L フォワード/リバースプライマーペアミックス(各プライマー5 pmol/ $\mu$ L)と共に、50  $\mu$ L H<sub>2</sub>Oの総容積でRT-PCR反応混合物を調製した。ABI Prism SDS 7000機器(applied biosystems)で以下の増幅サイクルを用いて反応を実行した: 50 2分、1サイクル; 95 10分、1サイクル; 95 15秒 -> 60 30秒 -> 72 30秒、40サイクル; 72 10分、1サイクル。解離曲線分析及びRT-PCR結果はSDS 7000機器で行った。

#### 【0683】

実施例44: 培養血小板の評価分化 - FACS

10

培養下の血小板の分化状態は、フローサイトメトリーによって評価することができる。巨核球(MK)は、最終的な血小板分化に先行する特徴的な細胞形態を表す。MKに向かう成熟の程度を決定するため、 $1 \times 10^6$ 個の培養細胞(LAMA-84及びCD34+細胞)を洗浄し、次に(a)抗CD41-FITC(GpIIb/IIIa; BD Bioscience, San Jose, CA, USA)又は抗CD71-FITC又は(b)抗CD33-FITC、抗CD41-PE、抗CD45-PerCp及びCD34-APC(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)で標識し、作成されたCD41細胞のパーセンテージを分析する。

#### 【0684】

倍数性の大きさを決定するため、分化型LAMA-84細胞を4の75%エタノール中に一晚固定し、ヨウ化プロピジウム(PI、50  $\mu$ g/ml)で標識し、FACS caliber(Becton Dickinson)を使用して分析する一方、14日目の分化型CD34+細胞をメイ・グルンワルド/ギムザ染色後に、この染色で1細胞当たりの核の数及びMKの特異的な形態を定量化することによって顕微鏡下で定量的に分析する。MK形態を有する細胞のみを分析する。cytospin調製物における多核細胞の存在が、倍数体MKの存在の指標となる。分化型CD34+細胞を多核成熟MKの存在に関して形態によって評価する。

20

#### 【0685】

実施例45: 培養血小板の評価分化 - qPCR

30

培養下の血小板の分化状態は、定量的PCRによって評価することができる。血小板RNAを抽出して培養細胞をさらに特徴付ける。全RNAはTRIzol試薬(Invitrogen)を使用して抽出する。各血小板調製物の純度は血小板(GPIIIa)及び白血球(CD45)マーカーのPCR解析によって評価する。さらなる分析の前に、Bioanalyzer 2100(Agilent)を使用して血小板RNAの完全性を評価する。

#### 【0686】

細胞溶解物から全RNAを回収し、市販の合成キット(Clontech)を使用してcDNAライブラリを作成する。標識したcDNAをQuant-iT PicoGreen dsDNAキット(Invitrogen)で定量化し、3 pMに希釈してシングルレーンにロードし、Illumina 1Gゲノムアナライザー(Solexa)でシーケンシングする。

40

#### 【0687】

未加工配列を一連の品質管理基準でフィルタリングする。第一に、少なくとも6 ntの3' Solexaアダプターが存在することを確認する。この基準に適合しなかった配列リードを破棄し、一方、残りをトリミングして、3'末端にあるアダプター配列を除去する。残りのタグを、その長さ(>10 nt)、コピー数(>4リード)及び可読性(<9の同定されないヌクレオチド、アノテートされたN)に関してさらにフィルタリングする。続いてこれらの基準全てに適合するリードを有効なリードとして定義する。

#### 【0688】

有効なリードを全て、miRBaseデータベースから抽出したプレマイクロRNAに

50

対してアラインメントする。2つ以上の前駆体と完全にマッチする配列タグをそれらの間に均等に分布させる。ドローシャ及びダイサーの不完全な切断を考慮するため、参照成熟マイクロRNA位置と比較したとき最大4 ntのシフトを許容して成熟マイクロRNA領域におけるプレマイクロRNAと完全にマッチした任意の配列タグが、成熟マイクロRNAと見なされる。マイクロRNA発現レベルは、小さいRNAの総数が不変であることを考えると、有効なリードの総数に対して正規化した各成熟マイクロRNAをマッピングするリードの数として定義される。各マイクロRNAの相対的存在量は、成熟マイクロRNAをマッピングするリードの総数と比較した各マイクロRNAをマッピングするリードの数として定義される。

【0689】

10

#### 実施例46：遠心による精製

培養細胞画分は遠心によって精製し、核及び夾雑代替密度細胞型 (contaminating alternate-density cell types) から分離することができる。細胞を200gで15分間遠心して赤血球及び網赤血球リッチ画分を単離する。上清をピペットで取り除き、次に望ましい細胞画分を、1µMプロスタグランジンI2の存在下で変性タイロイド緩衝液(138mM NaCl、5.5mMデキストロース、12mM NaHCO<sub>3</sub>、0.8mM CaCl<sub>2</sub>、0.4mM MgCl<sub>2</sub>、2.9mM KCl<sub>2</sub>、0.36mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>及び20mM HEPES含有、pH7.4)で洗浄し、同じ緩衝液に再懸濁する。

【0690】

20

#### 実施例47：化学的除核による精製

培養細胞の除核は、培養物に対する化学添加剤によって刺激することができ、これは精製前に細胞の除核画分の増加を促進し得る。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養する。回収の48時間前、細胞を210mM Me<sub>2</sub>SOと共にインキュベートする。次に350xg、室温で5分間遠心することによって細胞を回収し、210mM Me<sub>2</sub>SO及び5µg/mLのサイトカラシンB(又は他のアクチン又は核操作分子、即ちp38 MAPK、ソラレン)を含有する新鮮培地に3x10<sup>5</sup>細胞/mLのレベルで再懸濁し、37°Cでインキュベートする。核のない細胞の割合を、DRAQ5を核酸染色剤及びグリコホリンAに対する抗体を赤血球表面分化マーカーとして使用して、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって評価する。

【0691】

30

#### 実施例48：音響泳動による精製

幾つかの機械的分離システムを使用して一様な細胞集団を得ることができる。フリーフロー音響泳動は、1つの機械的分離方法に相当する(Petersson 2007, American Chemical Society)。CsCl(0.22g/mL)を含めて、栄養素添加剤と共に生理食塩水(0.9mg/mL)中に懸濁しながら、生理食塩水に加える。培養赤血球系細胞を含有する試料懸濁液を、2つの能動的出口(1つの出口につき流量0.10mL/分)を有する音響泳動チップ(Cell-Care)を使用して処理する。

【0692】

40

シリンジポンプ(WPI SP260P、World Precision Instruments Inc.、Sarasota、FL)を使用してチップの流量を制御する。出口は全て、Teflonチュービングを使用した注入器を介して精密ガラスシリンジ(1005 TLL及び1010 TLL、Hamilton Bonaduz AG、Bonaduz、スイス)に個々に接続しており、出口流量の独立した制御が可能である。クリーン流体入口はシリンジポンプに接続し、及び細胞懸濁液入口はTeflonチュービング(0.3mm内径)の50mm長さ部品に接続し、このチュービングの他端はピーカーに浸されており、そのピーカーから試料懸濁液が、正味の出口流量とクリーン流体入口流量との差によって定義される速度で吸引される。

【0693】

50



分離チャンネルの壁間に定在波を生じさせるために使用される超音波は、チップの裏面に取り付けられた20×20mmの圧電セラミック(Pz26、Ferropem Piezoceramics AS、Kvistgard、デンマーク)を使用して生成する。超音波ゲル(Aquasonic Clear、Parker Laboratories Inc.、Fairfield、NJ)が、両者の間の良好な音響結合を確実にする。圧電セラミックは、関数発生器(HP 3325A、Hewlett-Packard Inc.、Palo Alto、CA)に接続された電力増幅器(モデル75A250、Amplifier Research、Souderton、PA)によって作動する。音波が裏側からチップに入るとしても、結晶構造の3軸に沿って機械的振動が結合する結果として、分離チャンネルの側壁間に定在波が誘導される。

10

## 【0694】

この分離プロセスは、標準的な顕微鏡及び電力計(43 ThruLine電力計、Bird Electronic Corp、Cleveland、OH)を使用してモニタする。続いてこのプロセスは、信号周波数、作動出力、及び流量を調整することにより制御できる。

## 【0695】

試料中の細胞サイズ分布はコールターカウンター(Multisizer 3、Beckman Coulter Inc.、Fullerton、CA)を使用して分析する。各試料を電解質(Isoton II、Beckman Coulter Inc.)と混合し、100µmアパチャーを使用して分析する。溶血レベル、即ち損傷を受けた赤血球からの遊離ヘモグロビンの濃度を光度計(血漿/低HB光度計、HemoCue AB、Angelholm、スウェーデン)を使用して計測する。

20

## 【0696】

## 実施例49：エキソピボ成熟による精製

完全には成熟していない赤血球系細胞は、天然のインピボ成熟トリガーを模倣するシステムにおいてエキソピボでインキュベートすることにより、成熟に至るよう促進することができる。

## 【0697】

## 1. 間質細胞との共培養

培養の最終段階において、赤血球系細胞をサイトカイン不含の新鮮培地中の付着間質細胞層上で培養する。培養物は37°Cで5%CO<sub>2</sub>空气中に維持する。付着細胞層は、10%ウシ胎仔血清を補充したRPMI(Invitrogen)中の、正常成人全骨髄から樹立されたMS-5間質細胞株又は間葉間質細胞(MSC)のいずれかからなる(Prockop, DJ (1997) Science 276:71を参照)。付着MSCは、共培養で使用する前に、少なくとも2代の連続継代で拡大及び精製する。

30

## 【0698】

## 2. フィブロネクチン被覆プレートにおける培養

培養の最終段階において、ヒトフィブロネクチンを吸着させたプレートで赤血球系細胞を培養する。このようなプレートを作製するには、フィブロネクチン(Sigma Aldrich)を1mL滅菌H<sub>2</sub>O/mgタンパク質で再構成し、37°Cで少なくとも30分間溶解させる。少量の不溶材料が残り得る。これが産物のパフォーマンスに影響を与えることはない。フィブロネクチン溶液を滅菌平衡塩類溶液中に100倍希釈し、最少容積で培養表面に加える。培養表面を室温で少なくとも45分間風乾させる。過剰のフィブロネクチンを吸引によって取り除く。

40

## 【0699】

## 実施例50：磁気泳動による精製

赤血球系細胞を磁気泳動によって分離し、濃縮し、及び/又は精製する戦略は当該技術分野において公知であり、例えば、Zborowski et al., 2003, Biophys J 84(4)2638及びJin&Chalmers 2012, PLOS One 2012 7(8):e39491を参照されたい。市販の磁気分離システ

50

ム(4つのMidimaCS(商標)分離ユニット及びLDカラムを組み合わせるQuadromaCS(商標)セパレーター、Miltenyi Biotec、Auburn、CA)を使用してHSC由来の赤血球培養物から赤血球を磁氣的に濃縮する。窒素(Medipure(商標)窒素、濃度>99%、Praxair, Inc.、Danbury、CT)を充満させたGlove-Bag(商標)膨張式グローブチャンバ(Cole Parmer、Vernon Hills、IL)において細胞を脱酸素化する。脱酸素化前に全ての材料及び機器を、分離システム、脱気した滅菌緩衝液(PBS+2mMEDTA+0.5%BSA)、及び滅菌コレクションチューブを含めてグローブバッグに置き、次にバッグをきつく密閉する。N<sub>2</sub>ガスを充満させた膨張式グローブチャンバの内部で酸素欠乏条件下に保たれているQuadromaCS(商標)セパレーターに置かれたMACS(登録商標)LDカラムに、脱酸素化培養物を直接ロードする。磁石内に入ったカラムを通り抜ける細胞は陰性画分と分類され、これは「非磁性」と予想され、HSC及び最終的な成熟前の赤血球系細胞が含まれる。分離カラムに保持される細胞は陽性画分と分類され、これは「磁性」であり、機能性ヘモグロビンで略充満した成熟RBC様細胞からなる。これらの細胞は、LDカラムを磁石から取り外した後にそこから溶出する。分離終了後、回収された細胞を曝気することにより、酸素化した細胞が可逆的に回復する。

10

## 【0700】

実施例51: FACSによる精製

Becton-Dickinson Aria IIuセルソーターを使用して赤血球培養細胞の集団を選別する。選別前に細胞を回収し、PBSで洗浄し、グリコホリンA(Life Technologies)に対する蛍光抗体及び核酸染色剤DRAQ5(Pierce)によって製造者の推奨する希釈度で染色する。28,000滴/秒の滴下駆動周波数で100µmノズルを使用する。試料閾値速度は約4000イベント/秒である。全選別時間にわたり温度制御オプションを使用して試料及びコレクションチューブを4に維持する。加えて、選別の間中試料攪拌機能を200rpmで使用して、試料の沈降を防止する。試料は、シリンジから分注される約750µのアリコートに選別される。一方、これらの中断中はコレクションチューブを4に保ち、遮光し、穏やかに混合した後に選別を再開する。選別した試料は、10%FCSを補充した250µl DMEMが入った12x75mmハウケイ酸ガラスコレクションチューブに回収する。

20

## 【0701】

実施例51: 細胞の酵素処理による精製

同種赤血球を供給源とするにおいては、A及びB抗原を除去して万能に適合する産物を生成することが有益であり得る。これは、ガラクトース基を選択的に切断して赤血球系細胞を免疫原性の点でより有利なものにする能力を有する一組の酵素によって促進し得る。

30

## 【0702】

エンド-β-ガラクトシダーゼの2種類の組換えタンパク質(当初はクロストリジウム・パーFRINGENS(Clostridium perfringens)から同定されている)を、標準的なクローニング方法を用いて大腸菌(E.coli)BL-21で産生する。A/B Agを遊離させるためのABアーゼ及び異種移植において高度に免疫原性であることが知られ、且つA/B Agと似た糖鎖構造を有するGal 1-3Gal 1-4GlcNAc(Gal Ag)を遊離させるためのエンド-β-ガラクトシダーゼC(EndoGalC)を調製する。ABアーゼは血液型A[GalNAc 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-4GlcNAc]及び血液型B[Gal 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-4GlcNAc]においてGal 1-4GlcNAc結合を切断する。

40

## 【0703】

簡潔に言えば、ABアーゼのクローニング後、シグナルペプチドを有しないpET-15bベクターeabcに、C末端Hisタグを有する発現プラスミドを構築する。この外因性遺伝子を大腸菌(E.coli)BL-21細胞に形質転換する。細胞で可溶性タンパク質画分として産生される酵素をニッケル-ニトリロ三酢酸カラム(QIAGEN G

50

mbH、Hilden、Germany)で精製する。最後に、3.6 mg/mLの濃度で比活性が1500 U/mgの5 mLの精製組換えABアーゼが得られる。酵素活性の1単位は、毎分1  $\mu$ molの基質を加水分解するために必要な酵素の量として定義される。

#### 【0704】

Agの存在、Ab結合及び補体活性化に対するABアーゼ処理の効果を調べる。ヒトA/B RBCをABアーゼで消化し、交差反応性を有する(それぞれB型、A型又はO型を含む抗A又は抗B又は抗A及びB)ヒト血清と共にインキュベートした後、フローサイトメトリー分析に供する。平均蛍光強度(MFI)を使用して血液型A、B及びGal Agの発現レベルを定量化する。消化レベルは、ABアーゼの非存在下でインキュベートした後にRBC上で発現する血液型A又はB Agに対するパーセンテージとして表される。

10

#### 【0705】

3人の健常ヒトボランティアから新鮮血液型O血清をプールし、-80 で凍結して、使用時まで内因性補体活性を維持する。熱失活させた(56 で30分間)血清を使用してAb結合を分析する。酵素(ABアーゼ)消化を伴う又は伴わないRBCを、0.2%ウシ血清アルブミン(PBS/BSA)を含有するリン酸緩衝生理食塩水で希釈した50%血液型O血清(100  $\mu$ L)と共に37 で30分間インキュベートする。洗浄後、RBCをFITC標識抗ヒトIgG/IgM(DAKO、Glostrup、デンマーク)( $\times$ 30、100  $\mu$ L)と4 で30分間反応させて、次にフローサイトメトリー分析に供する。

20

#### 【0706】

補体活性化に対する酵素処理の阻害効果もまた、C3d沈着の変化によって評価する。RBCを補体活性の存在下において50%ヒト血清と共に37 で15分間インキュベートした後、RBCをFITC標識ウサギ抗ヒトC3d Ab(DAKO、Glostrup、デンマーク)( $\times$ 100、100  $\mu$ L)と4 で30分間反応させ、次にフローサイトメトリー分析にかける。対照レベル(酵素の非存在下)のパーセンテージをMFIに基づき計算し、Ab結合及びC3d沈着に対する酵素処理の阻害効果を評価する。

#### 【0707】

##### 実施例52：遠心による血小板の精製

血小板は、混合細胞懸濁液から遠心によって精製することができる。約40 mLの全血を、抗凝固薬として使用される3.2%のクエン酸ナトリウムと共に採血チューブに分配する。このチューブを400  $\times$  gで10分間遠心する。この段階後、3層の境界が明確に画定される：血漿、赤血球、及び中間域。血漿が上にあり、血小板、赤血球は密度が高いため、下にある；及び微細な白みがあった中間域は、より大きい血小板及び白血球からなり、パフィーコートと呼ばれる。Jelco 18 G針を使用して、血小板を含む血漿の上部を抜き取り、パフィーコートを、ここでは添加剤無しに2本の別のチューブに入れる：一方のチューブは血漿を作製するため(Pチューブ)及び他方はトロンピンを作製するため(Tチューブ)である。僅か1.5 mLの血漿のみを使用してトロンピンを作製し、そこに10%で0.5 mLのグルコン酸カルシウムを加え、37 で15分間ダブルボイラーに置く。次に2本のチューブを、ここでは800  $\times$  gで、同じ長さの時間にわたり(T=10分)再度遠心する。この最後の遠心後、Tチューブにはトロンピンリッチの液体が含まれ、一方、Pチューブには血小板沈渣及びいくらかの赤血球(赤血球-血小板凝集塊)が含まれる。この段階で、総血漿容積の3分の2を取り除いて容積を減らす。取り除く部分は乏血小板性であり、一方、沈降した血小板(攪拌することによって容易に分散し得る)を含む残りの部分は多血小板性である。

30

40

#### 【0708】

##### 実施例53：チミジン取込み

細胞集団の自己複製能力は、当該技術分野において公知のチミジン取込みアッセイを用いて評価することができる。例えば、Harkonen et al. 1991 Exp Cell Res 186 L288及びTanaka et al. 1992 PNA

50

S 89 : 8928 を参照されたい。

【0709】

簡潔に言えば、均一に $13\text{C}$ 及び $15\text{N}$ 濃縮したチミジン [ $U-13\text{C}$ ,  $15\text{N}-\text{TdR}$ ] を Martek Biosciences (Columbia, MD) から入手し、及び $3\text{H}-\text{TdR}$  ( $80\text{Ci}/\text{mmol}$ ) を ICN Radiochemicals (Irvine, CA) から購入する。培地及び緩衝液は Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) から入手する。ホスホジエステラーゼを除く全ての酵素は Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) からのものである。ホスホジエステラーゼ II は Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ) から入手する。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 溶媒は EM Science (Gibbstown, NJ) からのものであり、含まれる蒸発残留物質は  $<0.1\text{ppm}$  の蒸発残留物質であった。

10

【0710】

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養する。培養後、チミジン取込みアッセイで使用するため細胞を回収する。

【0711】

最終チミジン濃度が  $1\mu\text{M}$  に達するように非濃縮チミジンを添加して、細胞を  $1.6\mu\text{g}/\text{ml}$  の [ $U-13\text{C}$ ,  $15\text{N}$ ] -  $\text{TdR}$  で 18 時間標識する。細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、補足 DMEM で 6 時間以上培養してから  $3\text{H}-\text{TdR}$  を指示濃度 ( $0.1\sim 10\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) で加え、さらに 18 時間インキュベートする。この試料に非標識チミジンを加えて最終チミジン濃度を  $0.13\mu\text{M}$  にする (これは、 $10\mu\text{Ci}$  放射性標識  $/\text{ml}$  を受ける試料中の  $3\text{H}-\text{TdR}$  濃度と均等である)。  $3\text{H}-\text{TdR}$  の除去後、補足 DMEM 中で細胞をさらに 6 ~ 54 時間インキュベートした後、DNA を単離する。

20

【0712】

DNA は、改良 Puregene DNA 単離キット (Gentra Systems, Minneapolis, MN) を使用して抽出する。試料中の細胞の数に基づき、スケールアップ/スケールダウン手順を用いて添加試薬容積を決定する。例えば、 $1\times 10^7$  個の細胞を使用する場合、 $328\mu\text{g}$  のプロテイナーゼ K を含有する  $21\mu\text{l}$  が  $3\text{ml}$  の細胞溶解物溶液に加えられる。混合後、試料を室温に一晩放置する。翌日、 $10\mu\text{g}$  の RNアーゼを加え、試料を混合し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートする。タンパク質沈殿溶液 ( $1\text{ml}$ ) を加え、試料を氷上で 5 分間インキュベートする。  $2000\text{g}$  で 10 分間遠心した後、DNA を含有する上清を  $3\text{ml}$  の  $100\%$  2 - プロパノールと混合し、50 回、又は DNA の白色の糸が見えるようになるまで、穏やかに反転させる。次に試料を  $2000\text{g}$  で 5 分間遠心する。得られた DNA ペレットを 5 分間乾燥させた後、 $3\text{ml}$  の  $70\%$  エタノールで洗浄し、再び  $2000\text{g}$  で 5 分間遠心する。この最終ペレットを風乾させ、次に脱イオン化  $\text{H}_2\text{O}$  で再水和させて、 $260\text{nm}$  の吸光によって定量化する。複製対照として、 $\text{CD}34+$  幹細胞に同じ手順を適用する。

30

【0713】

3 分間煮沸することにより DNA を全て変性させて、次に氷上で急速に冷却する。  $0.5\text{mg}/\text{ml}$  の DNA 濃度で酵素加水分解手順を実施する。以下のプロトコルは、DNA 溶液 1 ミリリットル当たりに加える試薬容積を記載する。DNA は、 $200\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $100\text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$ 、及び  $1\text{M}$  トリスを含有する  $10\mu\text{l}$  の緩衝液、 $\text{pH} 7.2$  中の  $10\mu\text{l}$  のヌクレアーゼ P1 ( $0.5\text{U}/\mu\text{l}$ ) 及び  $5\mu\text{l}$  の DNアーゼ I ( $4\text{U}/\mu\text{l}$ ) によって  $45^\circ\text{C}$  で 2 時間加水分解し、続いて  $20\mu\text{l}$  ホスホジエステラーゼ ( $4\text{mU}/\mu\text{l}$ ) を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間さらにインキュベートする。最後に、 $5\mu\text{l}$  の  $10\text{M}$  酢酸アンモニウム ( $\text{pH} 9.0$ ) 及び  $10\mu\text{l}$  のアルカリホスファターゼ ( $1\text{U}/\mu\text{l}$ ) を加え、試料を  $37^\circ\text{C}$  でさらに 2 時間インキュベートする。

40

【0714】

消化した DNA 試料を  $0.22\mu\text{m}$  ナイロンフィルタでろ過する。この試料を HPLC

50

/C R I / I R M Sシステムで、4.6 × 250 mm Supelcosil LC-18-S HPLCカラム (Supelco, Bellefonte, PA) を使用して分析する。同じ溶媒系を1 ml / 分及び5% ~ 25% Bの直線勾配で15分間使用する。

【0715】

HPLCによって分離した後、化学反応界面質量分析法 (CRIMS) を用いてデオキシヌクレオシドを分析する。この方法では、ヘリウム流によって駆動される噴霧及び脱溶媒和系にデオキシヌクレオシドが流れ込み、そこでデオキシヌクレオシドは乾燥粒子ビームとして現れる。このインライン生成されたCO<sub>2</sub>からの<sup>13</sup>CO<sub>2</sub> / <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>存在量が、Finnigan/MAT Delta S同位体比質量分析計 (ThermoFinnigan, San Jose, CA) 及びそれに付属するIsodatデータシステムで決定される。5-フルオロデオキシウリジン (Sigma) が内部同位体比標準として使用される。

【0716】

各試料から3個のヌクレオシド: T、dA、及びdGの同位体比 (以下の式中ではIR) を得る。各DNA由来デオキシヌクレオシドから生じるCO<sub>2</sub>濃縮は、式(13) CO<sub>2</sub> (1 ml 当たり) = 1000 × (IR実験 - IR標準) / IR標準によって計算される。最も高いレベルの内部均一性を維持し、且ついかなる実験間のずれも回避するため、全ての実験についてTの同位体比からdGの同位体比を減じる。安定同位体標識期間の終わり (0日目) からウォッシュアウトの終わり (3日目) までのデータを評価する。

【0717】

実施例54: 核物質の定量化

DNAを含有する混合集団中の細胞の数を、DNA染色剤DRAQ5 (Pierce) を使用したフローサイトメトリーによって評価する。細胞を染色剤と共に製造者の指示に従いインキュベートし、フローサイトメーター、例えばAttuneサイトメーター (Life Technologies) で分析する。所定の核物質含量閾値を上回る細胞の割合を定量化する。

【0718】

実施例55: インビトロ腫瘍原性アッセイ

細胞の複製能を評価するには、軟寒天コロニー形成アッセイを実施することができる。端的には、0.5%寒天 + 1 × RPMI + 10% FCS溶液を作ることによって基本寒天層が作り、全成分を40 ℃ に加温し、1.5 mLのこの溶液を35 mmペトリ皿に加える。使用前にこの寒天を室温で30分間凝固させる。

【0719】

0.7%アガロースを電子レンジで融解させて40 ℃ に冷却することにより、上層アガロースを調製する。2 × RPMI + 20% FCS溶液を40 ℃ に加熱する。細胞をカウントし、200,000細胞/mLの密度で1プレート当たり5000細胞でプレーティングするように調製する。10 mLチューブに0.1 mLの細胞懸濁液を加え、続いて3 mLの温かい0.7%アガロース及び3 mLの温かいRPMI / FCS溶液を加える。この溶液を静かにかき回して混合し、3つ又は4つのレプリケート基本寒天プレートの各々に加える (1.5 mL)。

【0720】

プレートを加湿インキュベーターにおいて37 ℃ で10 ~ 30日間インキュベートする。週1 ~ 2回、細胞に0.75 mL / プレートの細胞培養培地を供給する。

【0721】

コロニー形成を評価するため、プレートを0.5 mLの0.005%クリスタルバイオレットで1時間超染色する。解剖顕微鏡を使用してコロニーをカウントする。

【0722】

実施例56: インビボ腫瘍原性アッセイ

最終分化した培養赤血球系細胞を様々な動物モデルに移植して潜在的な腫瘍原性を評価する。様々なモデルから幾つかの組織を採取し、組織学的、免疫化学的、及び蛍光アッセ

10

20

30

40

50

イで分析して腫瘍原性を定量化する。

【0723】

動物には、移植2日前から開始して毎日CsA(10mg/kg、Sandimmune、Novartis Pharma、Nuernberg)の腹腔内注射を投与する。NK細胞を枯渇させるため、一部のラットには、モノクローナル抗体(mAb)のCsA腹腔内注射に加え、抗NKRP1A(クローン10/78、マウスIgG<sub>1</sub>、BD Biosciences、Heidelberg、Germany)又はそれぞれのアイソタイプ対照(クローンPPV-06、マウスIgG<sub>1</sub>、Exbio、Prague、チェコ共和国)を投与する。抗NKRP1A mAb(クローン10/78)はmAb(クローン3.2.3)と同じエピトープを標的にする。赤血球系細胞の注射前日に1mgのそ

10

【0724】

これらの実験の開始前、赤血球系細胞移植後0日目及び4日目、及び剖検時(92日目)に血液試料を採取し、フローサイトメトリーによって血中のNK細胞の割合を決定する。皮下腫瘍成長の分析のため、100µlリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の赤血球系細胞を動物の側腹部に注射する。腫瘍成長を触診によって1日おきにモニタし、直尺ノギスを使用してサイズを記録する。100日目より前にマウスで1cm<sup>3</sup>及びラットで5cm<sup>3</sup>の腫瘍容積に達した場合、10%より多い体重減少が生じた場合、又は任意の疼痛又は苦痛の行動的徴候が観察された場合には、動物を犠牲にする。全ての動物の剖検を実施する。

20

【0725】

注射部位近傍のマウス組織を液体窒素で直ちに凍結するか、又はリン酸緩衝4%ホルマリン中に16時間置き、次にパラフィンに包埋する。続く免疫学的分析のため、脾臓及びリンパ節を摘出する。片側性6-OHDA病変ラットの線条体への赤血球系細胞の移植を実施する。これらの動物は移植後6週間で犠牲にする。

【0726】

動物組織をフローサイトメトリーによって分析する。切除した組織試料に、CD133、CD3、CD、CD16、CD19、CD20、CD56、CD44、CD24、及びCD133の確立された癌細胞バイオマーカーに対する適切な蛍光抗体及びPEコンジュゲート抗体を加え、分析して潜在的な腫瘍原性を定量化する。

30

【0727】

実施例57：EKTAによる変形能

本明細書に記載されるとおり培養した赤血球系細胞を、変形能特性に関してエクタサイトメトリーによって天然赤血球試料と比べて評価する。

【0728】

エクタサイトメーターは、2つのシリンダ間にある粘性流体中に懸濁された赤血球の回折像を生じさせるために使用されるヘリウム-ネオンレーザーと組み合わされたクエット型粘度計からなる。粘度計が回転すると、正常な赤血球はせん断場で伸長し、そのため回折像が楕円になる。回折パターンの長軸(A)及び短軸(B)に沿った光の強度を定量化し、且つそれを比(A-B)/(A+B)、変形能指数(DI)又は伸び指数(EI)として表すことにより、この像の楕円率が計測される。媒体の粘度は、最も高密度の赤血球系細胞の内部粘度より高くなるように選択される。蒸留水中のK2HP04及びKH2P04で構成される0.04Mのリン酸緩衝液中のポリビニルピロリドン(PVP)、mw = 360,000の31g/リットル溶液は、25で0.20ポアズ及び37で12ポアズの粘度を生じる。

40

【0729】

容量オスモル濃度はNaClで所望のレベルに調整し、ローリング凝固点浸透圧計で計測する。最終的なpHは、NaOH及びHClの1M溶液を少量加えることにより変更し、Technicon BG I1血液ガスアナライザーで計測する。ストック溶液に保存剤としてナトリウムアジドを0.4g/lとなるように加える。

50

## 【0730】

エクサイトメーターは赤血球系細胞試料から3つの主要な尺度；重量オスモル濃度最小値 ( $O_{min}$ )、変形能指数 ( $D_{max}$ )、及びDIがその最大値の半分に達する重量オスモル濃度 ( $O_{hyp}$ )を収集し、それらを天然赤血球と比較する。

## 【0731】

$O_{min}$ は、細胞の表面積対容積比に関係し、古典的浸透圧脆弱性試験における50%溶血点に等しいことが分かっている。

## 【0732】

$D_{max}$ は、変形能指数の最大値であり、通常290ミリオスモル(生理学的重量オスモル濃度値)で達する。これは必ずり応力下の細胞の最大変形能を示し、多くの因子、例えば、表面積、容積、内部粘度、及び細胞膜の機械的特性に関係する。

## 【0733】

$O_{hyp}$ は、DIがその最大値の半分に達するときの重量オスモル濃度である。これは曲線の高浸透圧部の位置の指標を提供し、これは細胞の内部粘度並びに膜の機械的特性、例えば膜が力を受けてどの程度曲がるか(剛性)に関係する。

## 【0734】

培養赤血球系細胞に関して得られるパラメータを、初代赤血球系細胞の同じ値と比較する。

## 【0735】

実施例58：LORCAによる変形能

精製cRBC集団の変形能をレーザー回折法(LORCA、レーザー支援旋光セルアナライザー、R&R Mechanotrics)によって計測する。端的には、細胞の高度希釈懸濁液を、2つのシリンダ間が0.3mm間隙の、シリンダの一方が回転して必ずり応力を生じさせることが可能なクエットシステムでせん断する。レーザービームが懸濁液を通過し、37で回折パターンが計測される。低必ずり応力では細胞は円板であるが、一方、高必ずり応力では細胞は楕円になる。細胞変形能は伸び指数(EI)を単位として表され、EIは変形細胞の楕円率に依存する。12.5uLのペレット化したRBCペレットを含有するアリコートを含む5mLのポリピニルピロリドン溶液(分子量360000)に希釈する。種々の必ずり応力における試料間での比較を容易にするため、30PaにおけるEI値( $EI_{max}$ と称される)及び3PaにおけるEI値が変形能の代表値として選択される。

## 【0736】

実施例59：血管閉塞の評価 - エキソピボラット血管系

赤血球系細胞の血管閉塞の可能性は、当該技術分野において公知の方法を用いて単離人工灌流ラット血管系で評価することができる。例えば、Kaul et al. 1983, J Clin Invest 72:22を参照されたい。簡潔に言えば、ウイスター系の麻酔下(ペントバルビトール(pentobarbital)ナトリウム30mg/kg)ラット、120~150gにおいて、右回結腸動脈及び静脈を、回結腸接合部から3cm離れた部位でヘパリン添加(100uL/mL)シラスティックチュービングによってカニューレ挿入する。1%ウシ血清アルブミンを含有するリンゲル液による定常状態の灌流下で、上行結腸及び回腸末端(各3cm)を結紮間で区切る。全ての血管接続部の止血結紮を達成した後、組織を単離する。顕微鏡ステージ上の光学的に透明なルーサイトブロックに単離虫垂間膜を穏やかに広げる。カニューレの出口及び顕微鏡対物レンズを除き、調製物全体をプラスチックサラップ(登録商標)で被覆する。

## 【0737】

対照動脈灌流圧力( $P_{pa}$ )及び静脈流出圧力( $P_v$ )はそれぞれ80及び3.8mmHgに一定に保ち、Statham-Gould P-50圧カトランスデューサー(Stathan Instruments Inc, Oxnard CA)によってモニタする。静脈流出量( $F_v$ )は光電式滴数計を使用してモニタし、mL/分単位で表す。10~12分の経過によって組織を平衡させ、 $F_v$ を安定化させる。宿主血液細胞を含まな

10

20

30

40

50

い、且つ  $4.6 \pm 0.5$  (平均値  $\pm$  SD) の一定の Fv を有する虫垂間膜微小血管系を呈する調製物のみを使用する。実験は 37 で行う。

【0738】

赤血球系細胞を本明細書に記載されるとおり単離する。Ppa 及び Fv の対照計測後、動脈カニューレ挿入部位より 15 cm 遠位の注入ポートから赤血球系細胞 (0.2 mL、Hct 30%) を穏やかに送り込み、Ppa 及び Fv の変化を Grass ポリグラフ (Grass Instrument Co, Quincy MA) のストリップチャートに記録する。組織調製物は試料注入前にリンゲル溶液で 10 ~ 15 分間灌流して組織を安定させ、血管系から宿主動物の残存血液細胞を取り除く。細胞の注入後に生じた閉塞は、血管系を高圧 (100 mmHg) の完全酸素化リンゲル溶液で短時間 (2 ~ 3 分) 灌流することによって除去し、流れを回復させ得る。

10

【0739】

各実験の終わりに組織調製物の全体 (カニューレ及び管腔内容物は含まない) を秤量する。末梢抵抗単位 (PRU) を計算し、 $PRU = P / Q = \text{mmHg} / \text{mL} / (\text{分} - \text{g})$  (式中、P (mmHg) は動静脈圧力差であり、及び Q (mL / 分 - g) は組織 1 グラム当たりの静脈流出量である) として表す。

【0740】

各実験において、試料のポラス注入後に圧力流回復時間 (Tpf) を決定する。Tpf は、所与の試料の送達後に Ppa 及び Fv がベースライン値に戻るまでにかかる時間 (秒) として定義され、全虫垂間膜血管系にわたる総通過時間に相当する。培養赤血球系細胞について得られるパラメータ値を初代赤血球系細胞について得られる値を比較する。

20

【0741】

実施例 60 : 血管閉塞の評価 - インビトロフローチャンバ

漸進的高さのインビトロフローチャンバを使用して赤血球系細胞の血管閉塞を評価する方法は当該技術分野において公知である。例えば、Zennadi et al 2004, Blood 104 (12) : 3774 を参照されたい。

【0742】

簡潔に言えば、漸進的高さのフローチャンバを使用して内皮細胞 (EC) に対する赤血球系細胞の付着を定量化する。EC で被覆されたスライドを、予め 37 に加温した  $1.26 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$ 、 $0.9 \text{ mM } \text{Mg}^{2+}$  含有ハクス平衡塩類溶液 (HBSS) (Gibco, Grand Island, NY) で洗浄し、次に可変高さのフローチャンバに入れる。フローチャンバを、37 に設定したサーモプレート (thermoplate) (東海ヒット、富士宮市、日本) に接続した倒立位相差顕微鏡 (Diaphot; Nikon, Melville, NY) のステージにマウントする。顕微鏡に取り付け、且つ Macintosh G4 コンピュータ (Apple, Cupertino, CA) に接続したビデオカメラ (RS Photometrics, Tucson, AZ) を使用して、細胞を観察する。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養し、蛍光色素 PKH 26 赤色蛍光細胞リンカーキット (Sigma) で製造者の指示に従い標識する。 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  含有 HBSS 中に 0.2% (vol/vol) で懸濁した細胞 (3 mL) をフローチャンバに注入し、フロー無しで 15 分間スライドに付着させる。フローに曝露する前に、フローの行く手に垂直な方向の線に沿った 7 つの異なる位置の各々にある最低 3 つのフィールドについて、蛍光細胞の総数を調べる。次に目盛り付きシリンジポンプを使用して流体フロー ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  含有 HBSS) を開始する。フローに曝露した後、フィールドを再び調べ、付着細胞の数をカウントする。付着細胞の割合は以下のとおり表される：フローへの曝露後に付着した細胞の数 / フロー前に各フィールドに存在した細胞。壁ずり応力は以下のとおり計算される： $w = (6 \mu Q) / (wH[x]^2)$ 、式中、w は壁ずり応力 (ダイン /  $\text{cm}^2$ ) を示し；Q、体積流量 ( $\text{cm}^3 / \text{s}$ )； $\mu$ 、媒体粘度；w、フローチャネルの幅；及び H (x)、顕微鏡スライドに沿った位置の関数としてのフローチャンバの高さを示す。

30

40

【0743】

50



### 実施例 6 1 : 血管閉塞の評価 - 生体顕微鏡法

生体顕微鏡法を使用して赤血球系細胞の血管閉塞を評価する方法は当該技術分野において公知である。例えば、Zennadi et al. 2007 Blood 110 (7) : 2708 を参照されたい。

#### 【0744】

簡潔に言えば、100 mg / kg ケタミン (Abbott Laboratory、Chicago、IL) 及び 10 mg / kg キシラジン (Bayer、Shawnee Mission、KS) の腹腔内注射によって被験動物の全身麻酔を得る。層流フードを使用して無菌条件下で両面チタンフレームウィンドウチャンバを背面皮下脂肪に外科的に植え込む。手術には、背面皮下脂肪の片側の表皮層及び真皮層を慎重に取り除くこと、反対側の皮下脂肪の横紋筋に隣接する皮下組織の血管を露出させること、次にチャンバの2つのサイドをステンレス鋼ネジ及び縫合糸を使用して皮膚に固定することが含まれる。チャンバにガラスウィンドウを置いて露出した組織を覆い、スナップリングで固定する。続いて、手術の3日後にインビボ研究を実施するまで、動物を32 ~ 34 に保つ。

#### 【0745】

ウィンドウチャンバを有する麻酔下の動物を Axoplan 顕微鏡 (Carl Zeiss、Thornwood、NY) のステージに置く；体温はサーモスタット制御式加熱パッドを使用して 37 に維持する。全ての注入は背側尾静脈からとする。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養する。次に細胞を Dil 又は DiO (Molecular Probes、Eugene、OR) 色素で製造者の指示に従い標識する。標識した細胞 (300  $\mu$ L ; Ca<sup>2+</sup> 及び Mg<sup>2+</sup> 含有 PBS 中ヘマトクリット [Hct] 0.50 [50%]) を注入し、LD Achroplan 20x / 0.40 Korr 及び Fluor 5x / 0.25 対物レンズを使用して皮下血管の RBC 付着及び血流動態を少なくとも30分間観察する。デジタルビデオカメラ C2400 (浜松ホトニクス株式会社、浜松市、日本) に接続した Trinitron カラービデオモニタ (PVM-1353 MD ; ソニー、東京、日本) 及び JVC ビデオカセットレコーダー (BR-S3784 ; VCR King、Durham、NC) を使用して微小循環イベント及び細胞付着を同時に記録する。各条件セットについて細静脈の30区間を調べる。細動脈と細静脈の区別は、(1) 狭まる流れとは対照的な広がる流れの観察；(2) 細動脈血管平滑筋に特有の、透光法を使用したときの血管壁の複屈折像；及び(3) 明らかな蛇行のない比較的直線的な血管軌道に基づき行われる。

#### 【0746】

赤血球流束及び付着の計測は、20倍の拡大率を使用して作成したビデオテープ調べることによって実施する。細胞付着は、血管壁に付着して1分間動かない細胞を考慮して定量化する。SS RBC によって占有される、最大 25  $\mu$ m 又は 25  $\mu$ m より大きい直径の血管の長さの割合は、以下のとおり定量化する：SS RBC によって占有される%細静脈長さ = (付着細胞を有する血管壁の長さ / 分析する血管区間の全長)  $\times$  100。RBC 流束の変化は、以下のとおり計算する：流束 = 直径 50  $\mu$ m 未満の血管上に印された単一の点を通る毎分循環蛍光ヒト RBC の数。

#### 【0747】

### 実施例 6 2 : 血管閉塞の評価 - 血小板

ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を使用して血小板の血管閉塞を評価する方法は、赤血球に関する同様の方法を適用することができる。簡潔に言えば、2 mL 容積の 0.05% ヘマトクリット懸濁液を組織培養ペトリ皿上のコンフルエントな HUVEC に加える。血小板を加えて1分以内にコーンアンドプレート器具を組み立て、Nikon Diaphot-TMD 倒立位相差顕微鏡 (Southern Micro Instrument s、Atlanta、GA) に置く。モータを始動させてコーンを回転させ、0.1 又は 1  $\mu$ m / cm<sup>2</sup> のずり応力で30分間、付着を継続的にモニタする。温度は、付着器具に吹き付けるエアカーテンインキュベーター (Nicholson Precision Instruments、Inc.、Bethesda、MD) によって 37 に一定

10

20

30

40

50

に維持する。血小板付着を可視化し、5分毎に、各時点各視野につき8つの異なる視野に20秒間焦点を合わせるにより記録する。実験全体はCCD-72シリーズカメラ(Dage-MTI, Inc., Michigan City, IN)によって400倍の総倍率下で観察し、SVO 2000ビデオカセットレコーダー(Sony Electronics, San Jose, CA)でビデオテープに記録する。各実験終了時に、記録したビデオ画像を手動再生する間に個々の付着細胞をカウントすることにより、付着をオフラインで定量化する。各時点につき8つの視野の細胞数を平均し、内皮1平方ミリメートル当たりの付着赤血球に対して正規化する。

#### 【0748】

実施例63：共振器による質量/容積/密度の評価

10

Bryan et al, Lab Chip, 2014に基づきデュアル懸濁マイクロチャネル共振器(SMR)システムを使用して最終分化型赤血球系細胞集団の質量、容積、及び密度を特徴付ける。細胞密度計測の開始時、初めにシステムをPercollo過媒体でフラッシュし、これが高密度流体としての役割を果たす。次に、試料バイパスに希釈細胞試料を充填し、試料入口及び出口のバイアル高さを調整して流体フローが最初のSMRに入るように導く。高密度流体入口の圧力が流体2の密度を設定するために使用され、廃棄物出口の圧力が装置における全体の流速を制御する。より重い細胞が試料バイアル又はチューブの底に沈降することに起因してサイズバイアスがかかる可能性を最小限に抑えるため、一定の間隔で試料バイパスチャネルをフラッシュすることにより、新鮮な試料を導入する。LabVIEWによってデータを取得し、MATLABで処理する。

20

#### 【0749】

コールターカウンターを使用して細胞濃度をモニタする。 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlに成長させた培養物で細胞計測を実施する。第2のSMRに計測用に導入される高密度流体は、50%(v/v) Percollo (Sigma)、1.38%(w/v)粉末状L15媒体(Sigma)、0.4%(w/v)グルコース、100IUペニシリン、及び100µg/mL-1ストレプトマイシンの溶液として配合する。媒体のpHを7.2に調整する。このPercollo媒体は4に保存し、使用直前にデュアルSMRで過する。

#### 【0750】

実施例64：アネキシンVによるホスファチジルセリン含量の評価

30

本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養する。5mM CaCl<sub>2</sub>を含有するリンゲル溶液中で50µL細胞懸濁液を洗浄し、次にこの溶液中のアネキシン-V-FITC(1:200希釈; ImmunoTools, Friesoythe, Germany)によって遮光下37で20分間染色する。細胞を洗浄し、本明細書に記載されるとおりフローサイトメトリーによって染色し、488nmの励起波長及び530nmの発光波長でアネキシン-V蛍光強度を計測する。アネキシン-V蛍光から相対ホスファチジルセリン露出を評価する。

#### 【0751】

実施例65：クロマトグラフィーによる脂質含量の評価

40

抗酸化剤BHT(Sigma Aldrich)の存在下、室温でメタノール-クロロホルム1:1によって3回抽出することにより、洗浄した外因性抗原発現EHCから脂質を抽出する。プールした抽出物を、Folch, Lees and Sloane Stanley 1957, J Biol Chem 226:497の方法において0.05M KClで洗浄する。簡潔に言えば、最初の抽出については、遠心管内の洗浄した複合体に0.05mg/mL BHT含有15mLメタノールを加え、沈降物を散らせるため時折攪拌しながら30分間静置する。次に15mLのクロロホルムを加え、凝集塊を散らせるため時折攪拌しながら混合物を30分間静置する。チューブを1500gで5分間遠心し、上清画分をTeflon活栓付きの分液漏斗にデカントする。2回目及び3回目の抽出も同様に、15mLのメタノール-BHTを残渣に加え、続いて15mLのクロロホルムを加えて実施し、但し毎回加えた後に抽出物は時折攪拌しながら10分間だけ静置す

50

る。遠心後、上清画分を分液漏斗にプールし、次に48 mLのクロロホルム及び28 mLの0.05 M KClを加え、混合する。この混合物を4 で一晩暗所に静置して相分離させる。再び室温に加温した後、2つクリアな相の下の方を回収し、ロータリー真空エバポレーターにおいて真空中40 で蒸発乾固させる。脂質をクロロホルムと共に定量的に10 mLメスフラスコに移し、-22 で保存する。

#### 【0752】

脂質抽出物中の遊離コレステロールの濃度は以下のとおり決定する。ヘキサン-ジエチルエーテル-氷酢酸80:20:1中のシリカゲルHR (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, N.Y.)の0.5 mm層で脂質抽出物をクロマトグラフ処理し、2,7-ジクロロフルオレセイン溶液(下記参照)をスプレーすることによりTLCプレートを染色し、遊離コレステロールスポットをコニカル遠心管に剥がし取り、2.0 mLのクロロホルムで1回及び1.0 mLのクロロホルムで3回抽出し、抽出物をロータリー真空エバポレーターにおいて真空中40 で蒸発乾固させ、鹼化を含まないMann 1961 Clin Chem 7:275の塩化第二鉄方法によってコレステロールを推定する。二臭化物誘導体を用いた単離(例えば、Fieser J Amer Chem Soc 1953 75:5421を参照)によって市販の認可試薬グレード材料から調製した遊離コレステロール標準をクロマトグラフ手順で取り、一組の決定毎に推定する。遊離コレステロール値は、標準の回収率(これは平均して95%である)に対して決定毎に補正する。TLCはBHTを取り除く必要があり、取り除かない場合にはBHTが560 nmを吸収する褐色の産物を生じて塩化第二鉄方法を妨害する。

#### 【0753】

クロマトグラフィー中の自動酸化を防止するため50 mg/100 mLの濃度のBHTを加えたクロロホルムメタノール-氷酢酸-水25:15:4:2中、シリカゲルHR、0.5 mm厚上4 の全脂質抽出物のアリコートしたTLCによってリン脂質分布をトリプレートで決定する;このTLCプレートを水で調製する(「中性」プレート)。「くさび形先端法」を用いてプレートの基点に脂質試料を適用すると(Stahl 1965 Thin-Layer Chromatography, Academic Press Inc.を参照)、個々のリン脂質の優れた分離がもたらされる。詳細には、この方法は、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、レシチン、及びスフィンゴミエリンの間の完全な分離をもたらす;ある特徴的なスポットがPSとレシチンとの間に移動し、これがホスファチジリンイノシトール(PI)として同定される。これらのスポットは、2,7-ジクロロフルオレセインの溶液(33.3 mg/100 mLの2 mM NaOH水溶液)をスプレーすることにより紫外光下で可視化され、次にKramer-Gittelmanチューブに直接剥がし取り、ここでリン脂質を1.0 mLの70%過塩素酸によって190 で60分間消化する。残りの手順を上記に記載したとおり実施し、但し発色後、3000 gで5分間遠心することによりシリカゲルは取り除き、澄明な上清溶液で吸光度を決定する。ブランクレーンの対応する領域の吸光度に対して補正を行う。

#### 【0754】

Gas-Chrom P、100-120メッシュ(Applied Science Laboratories Inc.)上のEGSS-X(シリコンと組み合わせたコハク酸エチレングリコールポリエステル)8%の対の8 ftカラム及びデュアル水素炎イオン化検出器を備えたBarber-Colman機器、モデル5000によって、ヘキサン溶解試料でガス-液体クロマトグラフィーを実施する。窒素流量は入口で50 mL/分である。カラム温度は試料注入後165 に10分間維持し、次に2 /分で200まで増加させる。

#### 【0755】

実施例66:膜粘度の評価

細胞の集団の膜粘度は、蛍光退色アッセイによって評価することができる。赤血球系細

10

20

30

40

50

胞の0.5ml試料を収集し、HEPES緩衝生理食塩水(132mM NaCl、4.7mM KCl、2.0mM CaCl<sub>2</sub>、1.2mM MgSO<sub>4</sub>、20mM HEPES、pH7.4に調整)で1回洗浄する。次にこの濃厚血球を145mM NaCl-10mM NaHCO<sub>3</sub>、pH9.5で1回洗浄し、1mg/ml DTA F (Research Organics、Cleveland、Ohioから入手)を含有する同じ緩衝液に再懸濁する。細胞を氷上で1時間インキュベートし、次に50mMグリシン-95mM NaCl-10mM NaHCO<sub>3</sub>、pH9.5で2回洗浄して、タンパク質に共有結合的に結合しなかった色素を全て取り除く。最後に、細胞を2回洗浄し、1mg/ml ウシ血清アルブミン含有HEPES緩衝生理食塩水中の-2%ヘマトクリットに再懸濁する。対照陰性赤血球にも同じ処理を適用する。

10

## 【0756】

落射式蛍光顕微鏡法用に装備されたLeitz Diavert (Rockleigh、NJ)倒立顕微鏡のステージにフローチャンバをマウントする。ダイクロイックミラー及び励起/発光フィルタは、励起波長が範囲450~490nmの、フルオレセイン色素(Leitz記号12)で使用される標準的な組み合わせである。対物レンズは100倍倍率及び1.25開口数の油浸型である。適切な動力源及びハウジング(Oriel、Stamford、CT)を有する100ワット高圧水銀アークランプ(Osram、Munich)が蛍光励起源としての役割を果たす。

## 【0757】

コンピュータ制御式電子シャッター(Vincent Associates、Rochester、NY)が曝露時間を制限し、蛍光強度の計測用光子計数電子システムと同期する。入射光イルミネーターの視野絞りを使用して励起を直径20~40umの円形範囲に制限する。一定の間隔で、コンピュータからの出力パルスが20msの典型的な持続時間にわたりシャッターを開放する。短時間蛍光像からの光は一連のプリズムで分割され、従って光の半分は低光量SITビデオカメラ(モデル66-SIT、Dage-MTI、Michigan City、IN)に送られ、及び半分は周囲温度ハウジングに囲まれた光電子増倍管(モデル8850、RCA、Harrison、NJ)に送られる。電子シャッターが開放している時間中、ビデオ画像プロセッサ(モデル794、Hughes Aircraft、Carlsbad、CA)が作動して蛍光像を取得し、ビデオスナップショットが提供され、それをモニタすることにより、対象に焦点が合ったままであり、視野に異物が侵入していないことを確認し得る。ビデオキャリアーでビデオスクリーン上の距離を計測し、ステージマイクロメートルのビデオ画像との比較によってキャリブレーションする。シャッターが開放している時間中はまた、光電子増倍管信号が光子計数法で処理される。増幅器/弁別器(モデルAD6、Pacific Instruments、Concord、CA)が所与の大きさを上回る各信号パルスのデジタル論理パルスを生じ、それらのデジタルパルスを100MHzゲートカウンター(モデル770、EG&G Ortec、Oak Ridge、TN)でカウントする。マイクロコンピュータが光子カウントのゲーティング、リセット、及び記録を制御する。

20

30

## 【0758】

典型的な実験は、励起光の短時間(20ミリ秒)パルスの間に行われる複数回の予備的蛍光計測と、続いて試料細胞を退色させる長い照射期間(典型的には30秒)と、続いて15~30秒毎の、蛍光が回復し終えたように見えるまでのさらなる一連の短時間曝露とからなる。

40

## 【0759】

培養赤血球系細胞について得られる回復時間及び他のパラメータ値を、初代赤血球系細胞について得られる同じ値と比較する。

## 【0760】

実施例67: Advia血液アナライザーによる平均赤血球容積の評価

Advia 120血液アナライザー(Siemens Healthcare)において電気インピーダンスを使用して培養赤血球系細胞の平均赤血球容積(MCV)を計測

50

する。その結果を天然ヒト赤血球と比較する。

【0761】

実施例68：培養赤血球系細胞の病原体検査

RT-PCRを用いて培養赤血球系細胞集団における外来性ウイルスの存在を定量化し、非汚染を確認する(アッセイ番号003000.BSV、BioReliance)。未処理バルク及び最終バルク、最終バイアル、貯蔵前細胞、並びに細胞及びウイルスバンクの無菌検査を、それぞれ好気性及び嫌気性細菌の成長を支持する2つの異なる種類の培地に赤血球集団を直接接種することにより実施する。試料を14日間インキュベートし、続いてBioReliance無菌試験プロトコルUSP 71に従い汚染微生物に関して試験する。

10

【0762】

実施例69：浸透圧脆弱性の評価

低張液に曝露されたときの赤血球系細胞の溶解に対する抵抗性を計測するため、浸透圧脆弱性を評価する。0%~1%にわたる濃度でNaCl水溶液を作製した。これらの塩溶液の各々で細胞を15分間インキュベートした。試料を遠心してインタクトな細胞をペレット化した。分光光度計を使用して540nmの光の吸収によるヘモグロビン含量に関して上清をアッセイした。50%溶血が起こる点を計算し、初代赤血球について得られる値と比較する。

【0763】

実施例70：ロゼット形成/免疫原性の評価

20

クームス試験としても知られる直接抗グロブリン試験は、血清のポリクローナル抗体が細胞の表面抗原に結合することにより引き起こされる赤血球系細胞の凝集又はロゼット形成を評価する。これは、一般的な同種免疫原性評価のためのヒトプール血清で行うか、又は特定の免疫原性予測のための意図されるレシピエントの血清で行うことができる。

【0764】

端的には、EDTAチューブに保存された細胞1~2滴を反応チューブに加える。このチューブを等張生理食塩水で3回洗浄する。3回目の洗浄後、洗浄した細胞から3%懸濁液を調製する。2本のチューブ名をA及びBとする。洗浄した3%懸濁液の1滴を各チューブに加える。これらのチューブをもう1回洗浄する。デカントするとき、細胞ボタン(cell button)が上になるようにチューブを位置決めする。これにより洗浄プロセスで細胞が過剰に多く失われることが防止される。ウェルを排水し、バイオワイプで拭き取って乾燥させる。直ちに両方のチューブに1滴のヒト被検血清を加え、振盪して混合する。Bチューブを室温で5分間インキュベートしておく。セロフュージでのクームススピン用にキャリブレーションした時間にわたりAチューブを遠心する。直ちに穏やかに再懸濁し、ライト付き凝集観察器(Beckton Dickinson)を使用して凝集を調べる。Aチューブが陽性である場合、Bチューブを読む必要はなく、またAチューブを顕微鏡で調べる必要もない。Aチューブがライト付き凝集観察器によって陰性である場合、顕微鏡下で凝集に関して調べる。顕微鏡の読み取りでAチューブが陰性である場合、Bチューブをそのインキュベーション期間後に遠心し、Bチューブ試料でステップ2~4を繰り返す。さらにBチューブも陰性である場合、チューブに1滴のIgG被覆クームス対照細胞(チェック細胞)を加えて遠心する。凝集を調べる。この段階で凝集が存在するはずであり、さもなければ試験は無効である。

30

40

【0765】

チェック細胞(ccc)を加える前にどの段階にも凝集がない場合、試験は陰性と解釈される。チェック細胞を加える前の任意の段階で凝集が観察される場合、試験は陽性と解釈される。

【0766】

実施例71：酸素結合能の評価

1cm経路長キュベットに連結したトノメーターにおいて37℃での平衡酸素結合曲線を決定する。分光光度計(Cary 50; Variant Inc)でスペクトル計測

50

を実施し、ペルチエモジュールで温度を制御する。分析は、140 mM NaCl及び2 mMグルコースを含有する50 mMピストリス緩衝液(pH 7.2)中で実施する。室温で完全に脱酸素化した後、既知の容積の純酸素をHamiltonシリンジでゴムキャップを介してトノメーターに注入することにより、赤血球懸濁液を種々の酸素分圧で平衡化する。最小二乗回帰によってRBC懸濁液の完全脱酸素化及び酸素化スペクトルの一次結合として可視及びソーレー領域における吸収スペクトルをシミュレーションすることにより、飽和度を推定する。

#### 【0767】

実施例72：細胞の代謝状態の評価

赤血球系細胞集団は、種々の異なる酵素ベースのアッセイを用いて重要な代謝最終産物を定量化して、代謝的に活性であると確かめ得る。能動的解糖は、評価するのに決定的な代謝経路であり、以下のアッセイ(解糖細胞ベースのアッセイキット、Cayman Chemical、品目600450)で計測し得る。

#### 【0768】

450 uLのアッセイ緩衝液、続いて50 uLのL-乳酸標準を試験管にアリコートに分け、完全に混合する。1 mM希釈から開始して乳酸濃度標準を用いて滴定曲線を作成する。

#### 【0769】

96ウェルプレートに細胞を加え、1000 RPMで5分間遠心する。100 uLの標準を別個の96ウェルプレートに移す。次に各ウェルに90 uLのアッセイ緩衝液を加える。次に各細胞ウェル中の10 uLの上清を対応する新しいウェルに移す。反復ピペッターを使用して各ウェルに100 uLの反応液を加える。次にプレートをオービタルシェーカーにおいて室温で30分間インキュベートする。プレートリーダーによって490 nmで吸光度を読み取る。結果を天然細胞と比較して任意の代謝の違いを同定する。

#### 【0770】

実施例73：血小板凝集の評価

培養又は初代供給源の血小板の凝集傾向をモニタすることができる。血小板を光源の前で振盪することにより血小板をスワーリング分析にかけ、結果は複屈折の存在又は非存在として表す。50~70 mLの容積で生じる濃縮血小板の単位を1時間静置しておき、 $22 \pm 2$  ( $71.6 \pm 3.6$  °F)の制御された温度で70 rpmの直線振盪機(C-Mar(登録商標))に置く。

#### 【0771】

処理後1日目、3日目及び5日目に濃縮血小板の試験(血小板数、血小板凝集及びpH)を実施する；白血球数は1日目のみ実施し、微生物制御は保存5日目のみ実施する。濃縮血小板の試料からアリコートを得るため、滅菌接続(Haemonetics(登録商標))を使用して環境の完全性を確実にする。血液採取から4時間以内にデュアルチャネルChronolog(Crono-Log Corporation(登録商標))を使用した比濁凝集法を用いて血小板凝集を達成する。このため、初めに1000 rpmで5分間軽く遠心することによって細胞を得て、次に3000 rpmで15分間遠心する(Eppendorf(登録商標))。試料を自動カウンター(Human Count(登録商標))で血小板計数に供する。

#### 【0772】

血小板濃度の調整後、種々の濃度の誘導作動薬：コラーゲン $2.0 \mu\text{g/mL}$ 及びADP $7.0 \mu\text{g/mL}$ (Crono-Log Corporation(登録商標))を使用して凝集を評価する。自発的な凝集を待った後、各試験につき400 uLのPRP及び400 uLのPPPを使用する(各々が異なるキュベットにある)。作動薬を誘導することによる刺激の5分後に凝集曲線を観察し、直後に凝集を計測して、試験中に形成される曲線に従いパーセンテージとして表す。試験の結果は通常、試験溶液を透過する光の量による凝集のパーセンテージとして表す；凝集は、正常、低又は高に分類する。

#### 【0773】

10

20

30

40

50

#### 実施例 74：自家培養プロセス

自家供給源の前駆体 CD34 + 細胞を使用した赤血球系細胞の培養を行い、患者に対する細胞免疫適合性を最適化する。患者において本明細書に記載されるとおり GM-CSF を使用して骨髓由来の CD34 + 細胞を末梢に動員する。  $10^6 \sim 10^8$  個の CD34 + 細胞を採取し、限定培地を使用する前述の 22 日間プロトコルを用いて培養する。4 日目の間に、治療剤の発現をコードする遺伝子を含有するレンチウイルスベクターで細胞をトランスフェクトする。培養プロトコルの完了後、細胞を精製し、循環生存能、免疫原性、複製能、純度、及び治療用量と関連する物理的特性を含めた幾つかの品質管理尺度に関して評価する。次に細胞を適切な安定化溶液に保存し、シリンジ又は適切な送達媒体に製剤化する。次にこの細胞を、最初の CD34 + 細胞を提供したのと同じ患者に注入する。

10

【0774】

#### 実施例 75：自家負荷プロセス

好適な外因性抗原が負荷された治療用赤血球系細胞を調製するため、自家供給源の赤血球を使用して患者に対する細胞免疫適合性を最適化することができる。患者から血液を採取し、5000g で 20 分間遠心する。パフィーコートを取り除き、残りの赤血球を抗凝固薬緩衝液中に  $10^8$  細胞/ml の密度で再懸濁し、合計  $10^{10}$  細胞とする。上記に記載される方法の 1 つによって細胞に目的の治療用外因性抗原を負荷する。負荷プロトコルの完了後、細胞を精製し、循環生存能、免疫原性、複製能、純度、及び治療用量と関連する物理的特性を含めた幾つかの品質管理尺度に関して評価する。次に細胞を適切な安定化溶液に保存し、シリンジ又は適切な送達媒体に製剤化する。この細胞を、最初の赤血球を提供したのと同じ患者に注入する。

20

【0775】

#### 実施例 76：同種培養プロセス

拡張性のある万能な治療薬を作るため、同種供給源から赤血球系細胞を培養することができる。同種供給源の前駆体 CD34 + 細胞を使用した赤血球系細胞の培養を行い、プロセスを合理化して、規模を拡大して患者を治療する能力を有するある容積の治療薬を培養する。ドナーの A、B、Rh を含めた主要血液抗原の血液型を決定し、万能ドナー（例えば、O Rh - 又はボンベイ Rh - ）を同定する。好適なドナーにおいて本明細書に記載されるとおり GM-CSF を使用して骨髓由来の CD34 + 細胞を末梢に動員する。  $10^6 \sim 10^8$  個の CD34 + 細胞を採取し、限定培地を使用する前述の 22 日間プロトコルを用いて培養する。4 日目の間に、治療剤の発現をコードする遺伝子を含有するレンチウイルスベクターで細胞をトランスフェクトする。培養プロトコルの完了後、細胞を精製し、循環生存能、免疫原性、複製能、純度、及び治療用量と関連する物理的特性を含めた幾つかの品質管理尺度に関して評価する。次に細胞を適切な安定化溶液に保存し、シリンジ又は適切な送達媒体に製剤化する。次にこの細胞を患者に対し、その主要血液型とは無関係に注入する。

30

【0776】

#### 実施例 77：同種負荷プロセス

同種供給源の前駆体 CD34 + 細胞を使用した赤血球系細胞の培養を行い、規模を拡大して患者を治療する能力を有するより大容積の治療用細胞の調製方法を合理化する。ドナーの A、B、Rh を含めた主要血液抗原の血液型を決定し、万能ドナー（例えば、O Rh - 又はボンベイ Rh - ）を同定する。上記に記載される方法の 1 つによって細胞に目的の治療用外因性抗原を負荷する。負荷プロトコルの完了後、細胞を精製し、循環生存能、免疫原性、複製能、純度、及び治療用量と関連する物理的特性を含めた幾つかの品質管理尺度に関して評価する。次に細胞を適切な安定化溶液に保存し、シリンジ又は適切な送達媒体に製剤化する。次にこの細胞を患者に対し、その主要血液型とは無関係に注入する。

40

【0777】

#### 実施例 78：保存

##### 1. 冷蔵緩衝溶液中での保存

赤血球の標準保存プロトコルは当該技術分野において公知である。例えば、Merym

50

an and Hornblower 1986, Transfusion 26(6) : 500を参照されたい。赤血球の標準保存プロトコル(最長42日間)は、抗凝固薬溶液(クエン酸-デキストロース-リン酸)への採血である。本明細書に記載されるとおり赤血球系細胞を培養する。遠心によって血漿を取り除くことにより、濃縮赤血球を調製する。細胞をやや高張の添加剤溶液、SAGM(ナトリウム、アデニン、グルコース、マンニトール、376mOsm/L)中に $4 \pm 2$  で保存する。

#### 【0778】

##### 2. 凍結緩衝溶液中での保存

赤血球系細胞のグリセロール処理、凍結、及び解凍方法は当該技術分野において公知である。例えば、Meryman and Hornblower 1977 Transfusion 17(5) : 4348を参照されたい。採取から4日以内にクエン酸リン酸デキストロース中のヒト血液をグリセロール処理し、凍結する。グリセロール処理RBCの調製には、初めに約10mLの全血を1,400gで10~15分遠心し、血漿を取り除く。次に得られた濃厚血球に、以下の組成のグリセロール水溶液を使用して2段階でグリセロール処理する：57.1gグリセロール、0.03g塩化カリウム、0.085g塩化マグネシウム六水和物、0.08gリン酸二ナトリウム、及び1.6g乳酸ナトリウム、総容積100mL中、pHは6.8に調整42。第1のステップでは、濃厚血球に1.5mLのこのグリセロール溶液を穏やかに攪拌しながら3分間かけて滴下して加える。次に混合物を少なくとも5分間そのままにして平衡化させる。第2のグリセロール処理ステップでは、混合物を穏やかに攪拌しながら3分間かけて5mLのグリセロール溶液を滴下して加え、約40%w/vの最終グリセロール組成物を得る。グリセロール処理プロセス全体は室温で行う。次にグリセロール処理RBCを低温用バイアルに0.6~1.1mLのアリコートに分け、NalgeneVR Cryo「Mr. Frosty」凍結容器(Thermo Scientific、NC)に入れ、-80のフリーザーに少なくとも12時間、最長10年保存する。凍結RBCは、低温用バイアルを37の水浴中に1分間置くことにより解凍する。全てのグリセロール処理血液試料は解凍後2時間以内に脱グリセロール化実験で使用する。

#### 【0779】

##### 3. シリンジとしての製剤化

細胞集団はシリンジによって静脈内投与し得る。100mLの容積、又は $10^9$ 細胞が送達されるように、37の標準生理食塩緩衝液を使用して治療用細胞を $10^7$ 細胞/mLの密度に希釈する。細胞溶液を150ccシリンジ、20ゲージ針に装填し、尺側皮静脈から5cc/分で患者に注射する。注射中、免疫原性反応又は凝固反応がないか患者のバイタルをモニタする。

#### 【0780】

##### 4. バッグとしての製剤化

細胞集団は、バッグ及び点滴チャンバに接続したシリンジによって静脈内投与し得る(即ちIV点滴)。100mLの容積、又は $10^9$ 細胞が送達されるように、37の標準生理食塩緩衝液を使用して治療用細胞を $10^7$ 細胞/mLの密度に希釈する。細胞溶液を1Lプラスチックバッグに装填し、カテーテルに接続し、重力によって尺側皮静脈から患者体内に送液する。注入中、免疫原性反応又は凝固反応がないか患者のバイタルをモニタする。

#### 【0781】

##### 実施例79：疾患の治療

##### 1. 血友病

血友病Aに罹患している患者を診断する。外因性FVIIを発現する除核造血細胞の組成物を本明細書に記載するとおり調製する。 $10^9$ 個の細胞を患者に静脈内投与する。当該技術分野において公知の標準インビトロ凝固時間アッセイによって凝固速度を評価する。血清中におけるFVIIに対する循環抗体を本明細書に記載するとおり検出する。循環抗体レベルを評価して免疫トレランス誘導の有効性を追跡する。凝固カスケード活性

10

20

30

40

50



が健常な凝固を確実にするのに不十分である場合、血友病Aの症状を低減するため、同時に組換え又は単離FVIIを静脈内投与する。

【0782】

2. 非典型溶血性尿毒症症候群

非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)に罹患している患者を診断する。外因性CFHを発現する除核造血細胞の組成物を本明細書に記載するとおり調製する。 $10^9$ 個の細胞を患者に静脈内投与する。当該技術分野において公知の標準尿溶血アッセイによって症候性溶血率を評価する。血清中におけるCFHに対する循環抗体を本明細書に記載するとおり検出する。循環抗体レベルを評価して免疫トランス誘導の有効性を追跡する。患者には、本明細書に記載されるアッセイを用いて疾患の症状に改善が見られるまで治療を投与する。

10

【0783】

3. 多発性硬化症

多発性硬化症(MS)患者が、本明細書に記載するとおり作製及び製剤化された抗原ポリペプチドミエリン塩基性タンパク質(MBP)を発現する $1 \times 10^9$ 個の抗原発現除核造血細胞の単回注入を受ける。治験薬投与の当日、第1相入院患者ユニットにおいて患者を24時間モニタする。3ヵ月の時点で主要転帰の計測を実施し、6ヵ月まで継続的な臨床検査、MRI検査、及び全身の身体検査並びに臨床分析及び検査室分析でさらなる安全性経過観察を実施して、有害事象を評価し、MS疾患活動性をモニタする。トランスが誘導されて患者においてMSの症状が改善するまでこの手順を繰り返す。例えば、Andreas Lutterotti et al. Sci Transl Med 5, 188ra75 (2013)を参照されたい。

20

【0784】

全血(EDTA管)において、以下の抗体パネルを用いたフローサイトメトリーによって種々の細胞サブセットの頻度を分析する：免疫細胞サブセットに関して(顆粒球、好酸球、単球、及びB、T、NK、及びNK T細胞) - 抗CD45(PE-Cy7、eBioscience)、抗CD16(APC-Cy7、BioLegend)、抗CD19[フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、BD]、抗CD14(V450、BD)、抗CD3[ペリジニククロフィルタンパク質(PerCP)、BD]、及び抗CD56[フィコエリトリン(PE)、eBioscience]; CD4+、FoxP3+ Treg、調節性CD8+CD57+ILT2+、及び炎症誘発性CD8+CD161high T細胞を含むT細胞サブセットに関して - 抗CD3(PE-Cy7、eBioscience)、抗CD4(APC、eBioscience)、抗CD8[パシフィックブルー(PB)、Dako-Biozol]、抗FoxP3(PE、Miltenyi)、抗CD25(APC、eBioscience)、抗CD57(FITC、BD)、抗ILT2(PE、Beckman)、及び抗CD161(APC、Miltenyi)。全ての染色に、対応するアイソタイプ対照を含める。細胞はLSR-IIフローサイトメーター(BD)及びFACS Divaソフトウェア(BD)で分析する。

30

【0785】

Ficoll密度勾配遠心法(PAA)によって末梢血単核細胞(PBMC)を単離し、以下のとおりの細胞内サイトカイン染色によってT細胞の機能表現型を判定する： $5 \times 10^5$ 個の新鮮に単離したPBMCを滅菌FACSチューブにおいて200mlのX-VIVO 15(Lonza)中で一晩インキュベートする。翌日、プレフェルジンA(10mg/ml、eBioscience)の存在下においてホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸(50ng/ml、Sigma)及びイオノマイシン(1mg/ml、Sigma)で細胞を5時間刺激する。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、細胞をLive Deadキット(AmCyan、Invitrogen)で染色し、固定し、透過処理し、及び種々の抗体：抗IL-17(Alexa Fluor 647; eBioscience)、抗IL-4(PE-Cy7、BioLegend)、抗IFN-g(FITC、BioLegend)、抗IL-10(PE; BioLegend)、抗CD3(PE

40

50

、DakoCytomation)、抗CD4(PB、DakoCytomation)、及び抗CD8(PB、BioLegend)又は対応するアイソタイプ対照で染色する。

【0786】

寛容化手順を行う前、及び3ヵ月後に、新鮮に単離したPBMCにおいてこの試験で使用するミエリンペプチドに対する抗原特異的T細胞応答を計測する。抗原特異的T細胞応答は、チミジン取込みを用いた増殖アッセイによって分析する。簡潔に言えば、96ウェルプレートにおける1mMのペプチドを含有するX-VIVO 15培地(Lonza)中に、ウェル当たり $1.5 \times 10^5$  PBMCで単離PBMCを播種する。抗原当たり48ウェルを播種し、各プレートにおいて6ウェルは陰性対照として培地のみを含む。TTx(5mg/ml)(Novartis Behring)を陽性対照として使用する。7日目、1mCiの[3H]チミジン(Hartmann Analytic)と共にプレートを15時間インキュベートする。[3H]チミジンによってパルスしたプレートをシンチレーションカウンタ(Wallac 1450、PerkinElmer)で分析する。各ウェルのシンチレーションカウント(CPM)を計測する。非刺激ウェルの平均値+3SDより高いCPMを示すウェルを陽性と見なす。

10

【0787】

前述の説明及び関連する図面に提供される教示を利用して、これらの発明が関係する技術分野の当業者には、本明細書に示される発明の多くの変形形態及び他の実施形態が想起されるであろう。従って、本発明は開示される具体的な実施形態に限定されないこと、並びに変形形態及び他の実施形態が添付の特許請求の範囲内に含まれるものと意図されることが理解されるべきである。本明細書では特定の用語が用いられているが、それらは一般的且つ説明的な意味で用いられているに過ぎず、限定を目的とするものではない。

20

【0788】

本明細書で言及する全ての刊行物及び特許出願は、本発明が関係する当業者の水準を示すものである。全ての刊行物及び特許出願が、個々の刊行物又は特許出願がそれぞれ具体的に且つ個別的に参照によって援用されることが示されたものと見なすのと同程度に本明細書において参照により援用される。

【0789】

## 【表 A】

表 A: 循環細胞

胚性幹細胞(ESC)	人工多能性幹細胞(iPSC)	
臍帯血幹細胞(CD-SC)	間葉系幹細胞	
CD34+細胞	多染性正赤芽球	
造血幹細胞(HSC)	正染性正赤芽球	
脾臓コロニー形成細胞(CFU-S)	前赤芽球	
顆粒球、赤血球、単球、又は巨核球の形成能を有する骨髓球系共通前駆(CMP)細胞(CFU-GEMM)	多染性赤血球	10
未分化胚芽細胞コロニー形成細胞	正赤芽球	
赤芽球バースト形成細胞(BFU-E)	血小板	
巨核球-赤芽球系前駆(MEP)細胞	白血球	
赤芽球コロニー形成細胞(CFU-E)	リンパ系細胞	
網赤血球	T細胞	20
赤血球	B細胞	

## 【0790】

## 【表 A 1】

表 A1: 赤血球系細胞

胚性幹細胞(ESC)	人工多能性幹細胞(iPSC)	
臍帯血幹細胞(CD-SC)	多染性正赤芽球	
CD34+細胞	正染性正赤芽球	
造血幹細胞(HSC)	前赤芽球	30
脾臓コロニー形成細胞(CFU-S)	多染性赤血球	
顆粒球、赤血球、単球、又は巨核球の形成能を有する骨髓球系共通前駆(CMP)細胞(CFU-GEMM)	正赤芽球	
未分化胚芽細胞コロニー形成細胞		
赤芽球バースト形成細胞(BFU-E)		
巨核球-赤芽球系前駆(MEP)細胞		40
赤芽球コロニー形成細胞(CFU-E)		
網赤血球		
赤血球		

## 【0791】

## 【表 B】

表B: 循環細胞関連タンパク質

CD1	CD23	CD46	CD72	CD120	CD195
CD2	CD24	CD47	CD73	CD122	CD197
CD3	CD25	CD48	CD74	CD127	CD199
CD4	CD26	CD49a	CD80	CD132	CD209
CD5	CD27	CD49b	CD81	CD133	CD202a
CD6	CD28	CD49c	CD82	CD134	CD220
CD7	CD29	CD49d	CD83	CD135	CD221
CD8	CD30	CD49e	CD86	CD138	CD235a
CD9	CD31	CD49f	CD87	CD141	CD271
CD10	CD32	CD53	CD88	CD142	CD279
CD11a	CD33	CD54	CD89	CD143	CD303
CD11b	CD34	CD55	CD90	CD144	CD304
CD11c	CD35	CD56	CD91	CD147	CD309
CD12w	CD36	CD57	CD95	CD151	CD326
CD13	CD37	CD58	CD96	CD152	TLR 1
CD14	CD38	CD59	CD100	CD154	TLR 2
CD15	CD39	CD61	CD103	CD156	TLR 4
CD16	CD40	CD62E	CD105	CD158	TLR 5
CD17	CD41	CD62L	CD106	CD163	TLR 6
CD18	CD42	CD62P	CD107	CD165	
CD19	CD43	CD63	CD107a	CD166	
CD20	CD44	CD68	CD107b	CD168	
CD21	CD45	CD69	CD109	CD184	
CD22		CD71	CD117	CD186	

10

20

30

【 0 7 9 2 】

【表 C - 1】

表 C: 赤血球関連タンパク質

2',3'-環状- ヌクレオチド 3'-ホス ホジエステラーゼ	クレアチンキナーゼ	仮定タンパク質 XP_100510	RAP1A 又は RAP1B	
アセチルコリンエス テラーゼ	DC 38	仮定タンパク質 XP_100619	RAP2B	10
アクチン $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖	十二指腸シトクロム b	仮定タンパク質 XP_100665	Rh 血液型 D 抗原ポ リペプチド	
アデノシンデアミナ ーゼ	エンハンサータンパク 質	仮定タンパク質 XP_100925	リーサス D カテゴリー VI タイプ III タンパク 質	
アデュシン $\alpha$ サブユニット	赤芽球膜結合タンパ ク質	仮定タンパク質 XP_103707	接着プラークマトリック スタンパク質前駆体と 類似	20
アルドラーゼ A	ファーアップストリーム エレメント結合タンパ ク質	仮定タンパク質 XP_106269	アンキリン 1 と類似	
アンキリン 1 アイソフォーム 2	フロチリン 1	Ig 重鎖 V-V 領域	フロチリン 2 と類似	
アンキリン 1 アイソフォーム 4	フロチリン 2 47	ケル	グリコホリン A と類似	30
アンキリン 1 スプライシング型 2	グルコーストランスポ ーター糖タンパク質	KIAA0340	ルーテル式血液型と 類似	
アクアポリン 1	グルタチオントランス フェラーゼ	KIAA1741 タンパク質	RAS 関連タンパク質 RAB-15 と類似	
アルギナーゼ 1 型	グリセルアルデヒド-3- リン酸デヒドロゲナー ゼ	Lyn B タンパク質	RAS 関連タンパク質 RAL-A と類似	40
アルギナーゼ 1 型 赤血球変異体	グリコホリン A	膜タンパク質 p55	トロポミオシンと類似	

【 0 7 9 3 】

【表 C - 2】

ATP 結合カセット ハーフトランスポー ター	グリコホリン A 前駆体	ホスファチジルイノシトール -4-リン酸 5 キナーゼ III 型	トロポミオシン 4 18 と 類似	
ATP 結合カセット サブファミリー C メ ンバー6	グリコホリン C アイソ フォーム 1	ホスホリボシルピロリン酸 シンテターゼ	溶質輸送体ファミリー 2 (促進性グルコースト ランスポーター)メンバ ー1	10
bA421H8.2(新規 タンパク質)	ヘモグロビン $\alpha$	ポリ(A)特異的リボヌクレ アーゼ	溶質輸送体ファミリー 29 (ヌクレオシドラン スポーター)メンバー1	
B-CAM タンパク質	ヘモグロビン $\beta$	プレセニリン関連タンパク 質	スペクトリン $\alpha$ 鎖	
増殖ブロック 1	ヘモグロビン $\delta$	タンパク質バンド 3	スペクトリン $\beta$ 鎖	20
C-1-テトラヒドロ葉 酸シンターゼ	ヘモグロビン $\epsilon$	タンパク質バンド 4.1	翻訳開始因子 2C	
カルシウム輸送 ATP アーゼ 4	ヘモグロビン $\gamma$	タンパク質バンド 4.1 (楯 円赤血球症 1、RH 関連)	トロポモジュリン	
CD55	HGTD-P	タンパク質バンド 4.2	トロポミオシン 3	
CD58	仮定タンパク質 XP_061743 又は XP_089854	タンパク質バンド 4.9 (デマ チン)	トロポミオシンアイソフ ォーム	30
CD59 抗原	仮定タンパク質 XP_091430	タンパク質バンド 7.2b、ス トマチン	トロポミオシン $\alpha$ 鎖(平 滑筋) 26	
細胞表面糖タンパ ク質 CD44	仮定タンパク質 XP_091724	RAB 35	未知のタンパク質	
チャネル様内在性 膜タンパク質	仮定タンパク質 XP_092517	ラブフィリン-3 A-組込みタ ンパク質	小胞結合膜タンパク質 2 (シナプトブレビン 2)	40
補体受容体 1	仮定タンパク質 XP_095819	Ral A 結合タンパク質	透明帯結合タンパク質	
脂肪細胞細胞膜関 連タンパク質	ストマチン	ミオシン-9	ヒストン H1.1	

【表 C - 3】

アンモニウムトラン スポーターRh A 型	ストマチン様タンパク 質 2	タンパク質 4.1	ヒストン H2A 1-B/E 型	
アクアポリン 1	チオレドキシソ関連膜 貫通タンパク質 4	スペクトリン $\alpha$ 鎖、赤血球	ヒストン H3.1	
アクアポリン 7	TMCC2	スペクトリン $\beta$ 鎖、赤血球	ヒストン H4	
ATP 結合カセット サブファミリーB メ ンバー6、ミトコンド リア	トランスフェリン受容 体タンパク質 1	タリン-1	ラミン A/C	10
バンド 3 アニオン輸 送タンパク質	膜貫通及びコイルドコ イルドメインファミリー 2	タリン-2	ラミナ関連ポリペプチ ド 2、アイソフォーム $\alpha$	
ベイシジン	尿素トランスポーター 1	トロポモジュリン-1	ラミナ関連ポリペプチ ド 2、アイソフォーム $\beta/\gamma$	20
CD44	亜鉛トランスポーター 1	トロポミオシン 1 ( $\alpha$ )アイソ フォーム 4	ラミン-B 受容体	
CD47	55kDa 赤血球膜タン パク質	トロポミオシン 3	ラミン-B1	
受動拡散型スクレ オシドトランスポー ター1	アクチン、 $\alpha$ 心筋	トロポミオシン $\alpha$ -3 鎖	ラミン-B2	30
赤血球膜結合タン パク質	アクチン、細胞質	チューブリン $\alpha$ -1 鎖	マトリン-3	
フロチリン-1	アクチン関連タンパク 質 2	チューブリン $\beta$ 鎖	多重イノシトールポリリ ン酸ホスファターゼ 1	
フロチリン-2	アクチン関連タンパク 質 2/3 複合体サブユ ニット 1B	チューブリン、 $\alpha$ 1 (精巣特 異的)	N-アシルノイラミン酸 シチジルトランスフェラ ーゼ	40
グルコーストランス ポーター、1 型	アクチン関連タンパク 質 2/3 複合体サブユ ニット 2	チューブリン、 $\alpha$ 8	中性 $\alpha$ -グルコシダー ゼ AB	

【 0 7 9 5 】

【表 C - 4】

グリコホリン-A	アクチン関連タンパク質 3	チューブリン、 $\beta 6$	核膜孔複合体タンパク質 Nup93	
グリコホリン-B	$\alpha$ -アクチニン-4	ピンキュリン	核膜孔膜糖タンパク質 210	
グリコホリン-C	$\alpha$ -アデュシン	78kDa グルコース調節タンパク質	ヌクレオリン	10
免疫グロブリン様ドメイン含有受容体 1	アンキリン-1	抗原 KI-67	ヌクレオポリン NUP188 相同体	
インテグリン $\alpha$ -X	アンキリン-3	ATP 依存性 RNA ヘリカーゼ DDX39A	核タンパク質 TPR	
インテグリン $\beta$ -1	$\beta$ -アクチン様タンパク質 2	カルネキシン	プレラミン-A/C	
ケル血液型糖タンパク質	$\beta$ -アデュシン	カルレティキュリン	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ	20
大型中性アミノ酸トランスポーター小サブユニット 3	キャッピングタンパク質(アクチン線維)筋肉 Z 線、 $\beta$	DNA トポイソメラーゼ 1	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ A4	
膜輸送タンパク質 XK	コルタクチン	DNA 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ A6	
膜結合プロゲステロン受容体成分 2	デマチン	ドリキルジホスホオリゴ糖タンパク質グリコシルトランスフェラーゼ 48 kDa サブユニット	タンパク質 ERGIC-53	30
モノカルボン酸トランスポーター1	ダイナクチン 2 (P50)、アイソフォーム CRA_b	ドリキルジホスホオリゴ糖タンパク質グリコシルトランスフェラーゼサブユニット 1	リボホリン II	
多剤耐性関連タンパク質 4	赤血球膜タンパク質バンド 4.2	小胞体常在タンパク質 29	移行型小胞体 ATPアーゼ	40
中性コレステロールエステルヒドロラーゼ 1	フィラミン-A	小胞体常在タンパク質 44	UDP-グルコース:糖タンパク質グリコシルトランスフェラーゼ 1	

【 0 7 9 6 】



【表 C - 5】

細胞膜カルシウム 輸送 ATP アーゼ 1	$\gamma$ -アデュシン	エンドプラスミン	CD59	
細胞膜カルシウム 輸送 ATP アーゼ 3	ゲルゾリン	24k Da の ER-ゴルジ SNARE		
細胞膜カルシウム 輸送 ATP アーゼ 4	キネシン-1 重鎖	FACT 複合体サブユニッ ト SPT16		10
推定 E3 ユビキチ ン・タンパク質リガー ゼ C12orf51	微小管結合タンパク 質 RP/EB ファミリー メンバー1	グルコシダーゼ 2 サブユ ニット $\beta$		
Rh 血液型、CcEe 抗原	ミオシン軽鎖 4	ヘムオキシゲナーゼ 1		
SLC43A3	ミオシン軽鎖ポリペプ チド 6	ヘモゲン		20
ナトリウム/カルシウ ム交換体 SCL8A3	ミオシン、重鎖 11、平 滑筋	ヘテロクロマチンタンパク 質 1-結合タンパク質 3		
ナトリウム/カリウム 輸送 ATP アーゼ サブユニット $\alpha$ -1	ミオシン-10	高移動度グループタンパ ク質 B1		
ナトリウム/カリウム 輸送 ATP アーゼ サブユニット $\beta$ -3	ミオシン-14	高移動度グループタンパ ク質 B2		30

【 0 7 9 7 】

## 【表 C 1】

表 C1: 赤血球膜貫通タンパク質

アクアポリン 1	ケル
細胞表面糖タンパク質 CD44	膜タンパク質 p55
チャンネル様内在性膜タンパク質	タンパク質バンド 3
補体受容体 1	Rh 血液型 D 抗原ポリペプチド
赤芽球膜結合タンパク質	リーサス D カテゴリー VI タイプ III タンパク質
グルコーストランスポーター糖タンパク質	グリコホリン A と類似
グリコホリン A	ルーテル式血液型と類似
グリコホリン A 前駆体	溶質輸送体ファミリー 2 (促進性グルコーストランスポーター)メンバー 1
グリコホリン C アイソフォーム 1	溶質輸送体ファミリー 29 (ヌクレオシドトランスポーター)メンバー 1

10

## 【 0 7 9 8 】

20

## 【表 C 2】

表 C2: 赤血球 GPI 結合タンパク質

アセチルコリンエステラーゼ
CD55
CD58
CD59 抗原

30

## 【 0 7 9 9 】

## 【表 C 3 - 1】

表 C3: 赤血球細胞内タンパク質

2',3'-環状-ヌクレオチド 3'-ホスホジエステラーゼ	エンハンサータンパク質	仮定タンパク質 XP_100925	RAP1A 又は RAP1B	
アクチン $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖	ファーアップストリームエ レメント結合タンパク質	仮定タンパク質 XP_103707	RAP2B	
アデノシンデアミナーゼ	フロチリン 1	仮定タンパク質 XP_106269	接着プラークマトリックス タンパク質前駆体と類似	10
アデュシン $\alpha$ サブユニッ ト	フロチリン 2 47	Ig 重鎖 V-V 領域	アンキリン 1 と類似	
アルドラーゼ A	グルタチオントランスフェ ラーゼ	KIAA0340	フロチリン 2 と類似	
アンキリン 1 アイソフォ ーム 2	グリセルアルデヒド-3-リン 酸デヒドロゲナーゼ	KIAA1741 タンパク質	RAS 関連タンパク質 RAB-15 と類似	
アンキリン 1 アイソフォ ーム 4	ヘモグロビン $\alpha$	Lyn B タンパク質	RAS 関連タンパク質 RAL-A と類似	20
アンキリン 1 スプライシ ング型 2	ヘモグロビン $\beta$	ホスファチジルイノシト ール-4-リン酸 5 キナー ゼ III 型	トロポミオシンと類似	
アルギナーゼ 1 型	ヘモグロビン $\delta$	ホスホリボシルピロリン 酸シンテターゼ	トロポミオシン 4 と類似	
アルギナーゼ 1 型赤血 球変異体	ヘモグロビン $\epsilon$	ポリ(A)特異的リボヌク レアーゼ	スペクトリン $\alpha$ 鎖	30
ATP 結合カセットハーフ トランスポーター	ヘモグロビン $\gamma$	プレセニリン関連タンパ ク質	スペクトリン $\beta$ 鎖	
ATP 結合カセットサブフ ァミリーC メンバー6	HGTD-P	タンパク質バンド 4.1	翻訳開始因子 2C	
bA421H8.2 (新規タン パク質)	仮定タンパク質 XP_061743 又は XP_089854	タンパク質バンド 4.1 (橢円赤血球症 1、RH 関連)	トロポモジュリン	40

【 0 8 0 0 】

【表 C 3 - 2】

B-CAM タンパク質	仮定タンパク質 XP_091430	タンパク質バンド 4.2	トロポミオシン 3
増殖ブロック 1	仮定タンパク質 XP_091724	タンパク質バンド 4.9 (デマチン)	トロポミオシンアイソフォーム
C-1-テトラヒドロ葉酸シ ンターゼ	仮定タンパク質 XP_092517	タンパク質バンド 7.2b、ストマチン	トロポミオシン $\alpha$ 鎖(平滑 筋) 26
カルシウム輸送 ATP ア ーゼ 4	仮定タンパク質 XP_095819	RAB 35	未知のタンパク質
クレアチンキナーゼ	仮定タンパク質 XP_100510	ラプフィリン-3 A 組込 みタンパク質	小胞結合膜タンパク質 2 (シナプトプレビン 2)
DC 38	仮定タンパク質 XP_100619	Ral A 結合タンパク質	透明帯結合タンパク質
十二指腸シトクロム b	仮定タンパク質 XP_100665		

10

20

【 0 8 0 1 】

【表 D - 1】

表 D: コンジュゲーション方法

<b>ゼロレングス x-リンカー</b>	<b>アミン-スルフィドリル x-リンカー</b>
EDC	SPDP、LC-SPDP、スルホ-LC-SPDP
EDC+スルホ NHS	SMPT 及びスルホ-LC-SMPT
CMC	SMCC 及びスルホ-SMCC
DCC	MBS 及びスルホ-MBS
DIC	SIAB 及びスルホ-SIAB
ウッドワード試薬 K	SMPB 及びスルホ-SMPB
N,N'-カルボニルジイミダゾール	GMBS 及びスルホ-GMBS
シッフ塩基 + 還元的アミノ化	SIAX 及び SIAXX
<b>ホモ二官能性 NHS エステル</b>	SIAC 及び SIACX
DSP	NPIA
DTSSP	<b>カルボニル-スルフィドリル x-リンカー</b>
DSS	MPBH
BS <sup>3</sup>	M2C2H
DST	PDPH
スルホ-DST	<b>アミン-光反応性 x-リンカー</b>
BSOCOES	NHS-ASA、スルホ-NHS-ASA
スルホ-BSOCOES	スルホ-NHS-LC-ASA
EGS	SASD
スルホ-EGS	HSAB 及びスルホ-HSAB
DSG	SANPAH 及びスルホ-SANPAH
DSC	ANB-NOS
<b>ホモ二官能性イミドエステル</b>	SAND
DMA	SADP 及びスルホ-SADP
DMP	スルホ-SAPB

10

20

30

40

【 0 8 0 2 】

【表 D - 2】

DMS	SAED	
DTBP	スルホ-SAMCA	
スルフヒドリル反応性 x-リンカー	p-ニトロフェニルジアゾピルビン酸	
DPDPB	PNP-DTP	
BMH	スルフヒドリル-光反応性 x-リンカー	10
ジフルオロベンゼン誘導体	ASIB	
DFDNB	APDP	
DFDNPS	ベンゾフェノン-4-ヨードアセトアミド	
光反応性 x-リンカー	ベンゾフェノン-4-マレイミド	
BASED	カルボニル-光反応性 x-リンカー	20
ホモ二官能性アルデヒド	ABH	
ホルムアルデヒド	カルボン酸塩-光反応性 x-リンカー	
グルタルアルデヒド	ASBA	
ビスエポキシド	アルギニン-光反応性 x-リンカー	
1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル	APG	30
ホモ二官能性ヒドラジド	生体直交型反応	
アジピン酸ジヒドラジド	ディールス・アルダー試薬ペア	
カルボヒドラジド	ヒドラジン・アルデヒド試薬ペア	
ビスジアゾニウム誘導体	ボロン酸サリチルヒドロキサム酸	
ジアゾ化 o-トリジン	クリックケミストリー	
ビスジアゾ化ベンジジン	シュタウディンガーライゲーション	40

【 0 8 0 3 】

## 【表 D 1】

表 D1: 酵素的コンジュゲーション方法

酵素反応	
SpyCatcher/SpyTag	
Spy0128 誘導体	
トランスペプチダーゼ	
イソペプチダーゼ	10
ソルターゼ	
DD-トランスペプチダーゼ	
ペプチジルトランスフェラーゼ	
G-グルタミルトランスペプチダーゼ	
D-グルタミルトランスペプチダーゼ	
ファルネシルトランスフェラーゼ	
プレニルトランスフェラーゼ(prenyltransferase)	20
ジメチルアリルトランスフェラーゼ	
ゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼ	
デヒドロリコールニリン酸シンターゼ	

## 【 0 8 0 4 】

## 【表 E】

表 E: 反応基の化学

アミン反応	チオール反応	ヒドロキシル反応	活性水素反応
イソチオシアン酸塩類	ハロアセチル及びハロゲン化アルキル誘導体	エポキシド類及びオキシラン類	ジアゾニウム誘導体
イソシアン酸塩類	マレイミド類	カルボニルジイミダゾール	マンニツヒ縮合
アシルアジド類	アジリジン類	N,N'0 ジスクシンイミジルカーボネート	ヨウ素化反応
NHS エステル類	アクリロイル誘導体	N-ヒドロキシスクシンイミジルクロロホルメート	
スルホニルクロリド類	アリール化剤	過ヨウ素酸塩による酸化	
アルデヒド類及びグリオキサール類	チル(Thil)・ジスルフィド交換試薬	酵素的酸化	環化付加反応
エポキシド類及びオキシラン類	ビニルスルホン誘導体	アルキルハロゲン類	ディールズ・アルダー反応
炭酸塩類	金属-チオール供与結合	イソシアン酸塩類	ボロン酸誘導体との複合体形成
アリール化剤			クリックケミストリー: Cu 促進アジド-アルキン[3+2]付加環化
イミドエステル類	カルボン酸反応	アルデヒド・ケトン反応	
カルボジイミド類	ジアゾアルカン類及びジアゾアセチル化合物	ヒドラジン誘導体	
無水物	カルボニルジイミダゾール	シッフ塩基形成	
フオルフェニル (fuorphenyl)エステル類	カルボジイミド類	還元的アミノ化	
ヒドロキシメチルホスフィン誘導体		マンニツヒ縮合	
アミン類のグアニジン化			

10

20

30

40



【表 F - 1】

表 F: 自己免疫疾患及び抗原

疾患	既知の抗原
急性リウマチ熱	心筋に対する交差反応性抗体
円形脱毛症	トリコヒアリン、ケラチン 16
ANCA 関連血管炎	好中球細胞質抗原、プロテイナーゼ 3、ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase)、細菌性透過性増加因子
自己免疫性胃炎	H,K アデノシントリホスファターゼ
自己免疫性溶血性貧血	Rh 血液型抗原、I 抗原
自己免疫性肝炎	核タンパク質、肝臓・腎臓ミクロソーム 1 型、肝臓サイトゾル 1 型
自己免疫性心筋炎	心臓ミオシン
自己免疫性甲状腺炎	甲状腺ペルオキシダーゼ、チログロブリン、甲状腺刺激ホルモン受容体
自己免疫性ブドウ膜炎	レチナルアレスチン(S 抗原)
皮膚筋炎	Mi2ATP アーゼ
糖尿病(1 型)	膵 β 細胞抗原
グッドパスチャー症候群	基底膜コラーゲン IV 型の非コラーゲン性ドメイン
グレーブス病	甲状腺刺激ホルモン受容体
ギラン・バレー症候群	ニューロファスチン-186、グリオメジン、Nodal 接着分子
低血糖症	インスリン受容体
特発性血小板減少性紫斑病	血小板インテグリン GpIIb、GpIIIa
インスリン抵抗性糖尿病	インスリン受容体
膜性腎炎	ホスホリパーゼ A2
混合性本態性クリオグロブリン血症	リウマチ因子 IgG 複合体
多発性硬化症	ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質
重症筋無力症	アセチルコリン受容体
重症筋無力症-MUSC	ムスカリン受容体
天疱瘡/類天疱瘡	表皮性カドヘリン

10

20

30

40

【 0 8 0 6 】

【表 F - 2】

悪性貧血	内因子(胃)	
多発筋炎	核及び核小体抗原	
原発性胆汁性肝硬変	好中球核抗原、ミトコンドリア多酵素複合体	
乾癬	PSO p27	
関節リウマチ	リウマチ因子 IgG 複合体、滑膜性関節抗原、シトルリン化タンパク質、カルバミル化タンパク質	10
強皮症/全身性硬化症	Scl-86、核小体強皮症抗原	
シェーグレン症候群	SS-B、ループス La タンパク質	
全身性エリテマトーデス	DNA、ヒストン、リボソーム、snRNP、scRNP	
白斑	VIT-90、VIT-75、VIT-40	
ウェゲナー肉芽腫症	好中球核抗原	
抗リン脂質症候群(APS)及び劇症型 APS	$\beta$ -2 糖タンパク質 1	20
化学療法誘発性末梢神経障害	ニューロン抗原	
血栓性血小板減少性紫斑病	ADAMTS13	
非典型溶血性尿毒症症候群	補体因子 H	

【 0 8 0 7 】

30

【表 G】

表 G: 炎症性疾患及び抗原

疾患	抗原
クローン病	フラジェリン、微生物抗原
潰瘍性大腸炎	好中球細胞質抗原、微生物抗原
セリアック病	グルテン
炎症性腸疾患	微生物抗原

40

【 0 8 0 8 】

【表 H - 1】

表 H: アレルギー性疾患のトリガー

アレルギー	抗原	
動物の鱗屑	fel d 1, can f6	
クログルミ	2S アルブミン、ビシリン様(7S)タンパク質	10
ブラジルナッツ	2S アルブミン、レグミン様(11S)種子貯蔵タンパク質	
カシューナッツ	7S ビシリン様タンパク質、レグミン様 11S 種子貯蔵タンパク質	
クリ	キチナーゼ 1b、脂質転移タンパク質 Cas s8	
チリダニ	Der p2	20
卵	オボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、リゾチーム、 $\alpha$ -リベチン	
ペルシャグルミ	2S アルブミン、7S ビシリン様タンパク質、脂質転移タンパク質、レグミン様 11S 種子貯蔵タンパク質	
魚	パルブアルブミン	
ヘーゼルナッツ	Bet v1 ホモログ、プロフィリン、脂質転移タンパク質、11s グロブリン様タンパク質、7S ビシリン様タンパク質	
昆虫毒	メリチン、ホスホリパーゼ A2、ヒアルロニダーゼ、酸性ホスファターゼ、プロテアーゼ、抗原 5、Api m1-4、Bom p1、p4、Dol m1、2、5; Vesp c1、c5; Pol a1、a2、a5; Ves v1、v2、v5; Sol I 1-4	30
ラテックス	Hev b 1、2、3、5、6.01、6.02、8、9、11	
牛乳	$\alpha$ s1 カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン	
カビ	酵素、毒素、細胞壁構成成分	
ピーナッツ	Ara h1、Ara h2、Ara h3、Ara h6	40

【 0 8 0 9 】

【表 H - 2】

花粉	アコニット酸ヒドラーゼ、フルクトース二リン酸アルドラーゼ、ATP シンターゼ、管腔結合タンパク質、カルモジュリン、カルレティキュリン、シャペロニン、エノラーゼ、脂質転移タンパク質 1、脂質転移タンパク質 2、プロフィリン	
花粉、 草	Phl p 1、2、4、5、6、11、12、13	
甲殻類	アルギニンキナーゼ、トロポミオシン、ミオシン軽鎖、筋形質カルシウム結合タンパク質、トリオースリン酸イソメラーゼ、アルドラーゼ、タイチン	10
大豆	Gly m1 ダイズ疎水性タンパク質、gly m4、gly m5、gly m6、Gly m 2s アルブミン、脂質転移タンパク質、 $\alpha$ -グロブリン、	
堅果類	脂質転移タンパク質、プロフィリン、Bet v1 関連ファミリー、レグミン、ビシリン、2S アルブミン	
コムギ	グルテン、プロラミン、2S アルブミン、脂質転移タンパク質、 $\alpha$ -アミラーゼ/プロテアーゼ阻害因子、ピューロインドリン、 $\alpha$ -グロブリン、 $\alpha$ -グリアジン、 $\beta$ -グリアジン、 $\gamma$ -グリアジン、ファスト $\omega$ -グリアジン、スロー $\omega$ -グリアジン	20

【 0 8 1 0 】

【表 I - 1】

表 I: 疾患を治療するための治療用タンパク質

商標	会社	適応症
Amevive	Astellas Pharma	中等度乃至重度の慢性尋常性乾癬
BayGam	Bayer	A 型肝炎、麻疹、水痘、風疹、 免疫グロブリン欠損症
CinnoVex	CinnaGen	多発性硬化症
Synagis	MedImmune	呼吸器合胞体ウイルス(RSV)感染症
Lucentis	Roche Genentech	湿潤型加齢性黄斑変性症(AMD)
Actemra	Hoffman-La Roche	関節リウマチ
Avastin	Roche Genentech	種々の癌
Benefix	Pfizer	血友病 B / クリスマス病(凝固第 IX 因子 欠損症)
Benlysta	HGS, GlaxoSmithKline	全身性エリテマトーデス(SLE)
Bexxar	GlaxoSmithKline, Corixa	CD20 + 濾胞性 NHL
Campath	Genzyme	B 細胞慢性リンパ性白血病(B-CLL)
Ceredase	Genzyme	I 型ゴーシェ病
Cerezyme	Genzyme	I 型ゴーシェ病
Erbitux	Lilly	転移性結腸直腸癌
Helixate FS	CSL Behring	血友病 A
Herceptin	Roche Genentech	乳癌
Kogenate FS	Bayer Healthcare	血友病 A
Lumizyme	Genzyme	ポンペ病(糖原病 II 型)
NovoSeven	Novo Nordisk	第 VIII 因子又は第 IX 因子に対する阻害 因子を有する血友病 A 又は B 患者及び 後天性血友病を有する患者において
Privigen	CSL Behring	IVIg 療法

10

20

30

40

【表 I - 2】

Recombinate	Baxter, Wyeth	血友病 A	
Refacto	Pfizer	血友病 A	
Remicade	Janssen Biotech (J&J)	関節リウマチ、クローン病、強直性脊椎炎、尋常性乾癬、潰瘍性大腸炎	
ReoPro	Lilly	PTCA (血管形成術)補助剤	
Rituxan /MabThera	Roche Genentech / Biogen Idec	血液癌及び関節リウマチ	10
Simulect	Novartis	臓器拒絶予防	
Soliris	Alexion Pharmaceuticals	発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)	
Tysabri	Biogen Idec, Elan Pharma.	多発性硬化症、クローン病	
Vectibix	Amgen	上皮成長因子受容体(EGFR)発現の治療、転移性結腸直腸癌(mCRC)	20
Xyntha	Wyeth	血友病 A (第 VIII 因子欠損症)	
Zenapax	Roche / PDL	腎移植を受けた患者の急性臓器拒絶反応の予防	
Arcalyst	Regeneron Pharmaceuticals	FCAS 及び MWS を含めた、クリオピリン関連周期性症候群(CAPS)	
Betaseron	Bayer Healthcare	多発性硬化症、心筋症	30
Cetrotide	Merck Serono	不妊症	
Cimzia	UCB	関節リウマチ、クローン病	
Copaxone	Teva Pharmaceuticals	多発性硬化症、クローン病、緑内障、運動ニューロン疾患、ハンチントン舞踏病、神経変性疾患	
Enbrel	Amgen, Wyeth	関節リウマチ、乾癬	
Epogen	Amgen	貧血症	40
Humira	Abbott	関節リウマチ、クローン病	

【 0 8 1 2 】

【表 I - 3】

Kineret	Amgen, Biovitrum	活動性関節リウマチ	
Lantus	Sanofi-Aventis	糖尿病	
Pegasys	Roche Genentech	C型慢性肝炎、B型慢性肝炎	
Prolia	Amgen, GSK	骨粗鬆症、療法誘発性骨量減少(乳癌又は卵巣癌)、骨転移、骨巨細胞腫、多発性骨髄腫	10
-	-	-	
Rebif	Merck Serono, Pfizer	多発性硬化症(再発性)	
Simponi	Johnson & Johnson	関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎	
Stelara	Centocor, Janssen-Cilag	光線療法又は全身療法の候補となる中等度乃至重度の尋常性乾癬	
Vivaglobin	CSL Behring	原発性免疫不全(PID)	20
Xgeva	Amgen	固形腫瘍から骨への転移	
Xolair	Roche Genentech, Novartis	中等度乃至重度の持続性アレルギー性喘息	
Avonex	Biogen Idec	多発性硬化症(再発性)	
Aranesp	Amgen	貧血症	
Orencia	Bristol-Myers-Squibb	関節リウマチ、若年性特発性関節炎	30
Procrit	Janssen Biotech (J&J)	貧血症	
Erwinaze	Jazz	急性リンパ性白血病	

【 0 8 1 3 】

## 【表 J】

表 J: 疾患を治療するための治療用タンパク質クラス

AAV カプシドタンパク質	アスパラギナーゼ	
アルグルコシダーゼ $\alpha$	CTLA4	
抗 C5	エリスロポエチン	
抗 gp lib/IIIa	第 IX 因子	
抗 IGE	第 VII 因子	10
抗 IL-12、抗 IL-23	第 VIII 因子	
抗 RANK リガンド	グラチラマー酢酸塩	
抗 $\alpha$ 4 インテグリン	グルコセレブロシダーゼ	
抗 APRIL	GnRH アンタゴニスト	
抗 BAFF	IgG	
抗 CD20	IL1R アンタゴニスト	
抗 CD52	IL1R 又は IL1 アンタゴニスト	20
抗 EGFR	インスリン	
抗 Her2	インターフェロン $\alpha$	
抗 IL2 受容体	インターフェロン $\beta$	
抗 IL6 受容体	レンチウイルスカプシドタンパク質	
抗 PD1	LFA3-Fc	
抗 RSV タンパク質 F	レトロウイルスカプシドタンパク質	30
抗 TNFa	TACI-Ig	
抗 VEGF	TNF 受容体	

【 0 8 1 4 】



【表 1 - 1】

表 1~8

ABO 血液型	ストマチン	ピーターズ(Peters)	DAF クローマー (Cromer)	
アクアポリン 3	トロポミオシン	ラスムッセン (Rasmussen)	ゲルピツヒ(Gerbich) (GYPC)	10
オベルジェ	グルコーストランスポ ーター	リード(Reid)	CD47	
バンド 3	アデュシン	REIT	グリコホリン A, B, C	
ベイシジン	ラブフィリン	SARA	バンド 3 (AE3)	
C41	C1 テトラヒドロ葉酸シ ンターゼ	リーサス血液型 D	GYPB Ss	
CD44	ヴェル(Vel)型	アルドラーゼ	C4A、C4B チド (Chido)、ロジャース (Rodgers) C4 補体成 分	20
シス AB	Lan 抗原	トロポモジュリン	HLA Bg HLA クラス I	
ディエゴ(Di)	At 抗原	アルギナーゼ	RHAG Rh 関連アン モニウム輸送体	
コルトン抗原	Jr 抗原	クレアチンキナーゼ	糖タンパク質	30
補体成分 4	AnWj 抗原	B-Cam タンパク質	コルトン(Co)ウオータ ーチャンネルタンパク質	
$\alpha(1,3)$ フコシルトラン スフェラーゼ	Sd 抗原	Rap1A	ACHE カートライト (Cartwright) (Yt)ア セチルコリンエステラ ーゼ	
CR1	バッティ(Batty)	ベネット-グッドスピード (Bennett- Goodspeed)	グルタチオントランスフ ェラーゼ	40

【 0 8 1 5 】

【表 1 - 2】

DAF	ビルケス(Bilkes)	P 抗原系	グリコホリン C	
ディエゴ	ライト(Wright) (Wr)	Rh 血液型	アクアポリン	
ダッフィ	ボックス(Box)	Xg 抗原系	赤芽球関連膜タンパク質	
Hh/ボンベイ抗原	クリスチャンセン (Christiansen)	XK タンパク質	CD44	10
ii 抗原	$\alpha$ (1,2)フコシルトランス フェラーゼ	Yt/カートライト (Cartwright)抗原系	シナプトプレピン 2	
インディアン血液型	HJK	CD58	リボヌクレアーゼ	
ケル	HOFM	Rh	ABO グリコシルトラン スフェラーゼ	
キッド	JFV	AnWj 接着受容体	CD59	
ルイス抗原	JONEs	シアンナ(Scianna)	CD44	20
ルーテル抗原	イエンゼン(Jensen)	ラディン(Radin)	MER2	
MNS 抗原系	カタギリ(Katagiri)	十二指腸シトクロム B	DOK ドンブロック ADP-リボシルトランス フェラーゼ	
コスト(Cost)型	リブセイ(Livesay)	DARC (ダッフィ)	SEMA7A JMH 推定 接着受容体	
Er 型	ミルン(Milne)	CR1 クノップス-マコイ (Knops-McCoy)	UMOD Sda タム-ホ ースフォール(Tamm- Horsfall)タンパク質 (ウロモジュリン)	30
デマチン	オルデイド(Oldeide)	FP ファミリー	アニオン交換チャネル タンパク質(バンド 3、 AE1)	
インディアン(In)	アネキシンファミリー	トゥイーティー (Tweety)ファミリー	CTL ファミリー	40
キッド(Jk)尿素トランス ポーター	Bcl-2 ファミリー	UT ファミリー	DAACS ファミリー	

【 0 8 1 6 】

【表 1 - 3】

FUT3 ルイス(Le)	ベストロフィンファミリー ー	VIC ファミリー	DASS ファミリー	
アデノシンデアミナーゼ	BNip3 ファミリー	AAAP ファミリー	DMT ファミリー	
OK Oka ニューロテリン、推定接着分子	CD20 ファミリー	トランスフェリン受容体	ENT ファミリー	10
LW 接着受容体	CLIC ファミリー	c-KIT	GPH ファミリー	
FUT2 セクレター(Se)	コネキシンファミリー	インスリン受容体 1 及び 2	GUP ファミリー	
FUT1 Hhα	CRAC-C ファミリー	エストロゲン受容体	LCT ファミリー	
LU ルーテル(Lu)接着受容体	Ctr ファミリー	デキサメタゾン受容体	MC ファミリー	
P1 グリコシルトランスフェラーゼ	E-CIC ファミリー	JAK2 キナーゼ	MET ファミリー	20
XK Kx 推定神経伝達物質トランスポーター	ENaC ファミリー	ABC ファミリー	MFS ファミリー	
XG Xg 旧称 PBDX	GIC ファミリー	ArsAB ファミリー	MOP ファミリー	
MIC2	ICC ファミリー	F-ATP アーゼファミリー ー	MTC ファミリー	30
ヘモグロビン	イネキシンファミリー	IISP ファミリー	NCS2 ファミリー	
アンキリン	IRK-C ファミリー	MPT ファミリー	Nramp ファミリー	
スペクトリン	LIC ファミリー	P-ATP アーゼファミリー ー	NSS ファミリー	
KEL ケル (K,k,Kp,Js)メタロプロテインナーゼ	MIP ファミリー	AE ファミリー	OAT ファミリー	40
トルキルドセン	MIT ファミリー	APC ファミリー	OST ファミリー	
Rab 35	NSCC2 ファミリー	ArsB ファミリー	Oxal ファミリー	
Ral A 結合タンパク質	PCC ファミリー	BASS ファミリー	PiT ファミリー	

【 0 8 1 7 】

【表 1 - 4】

透明帯結合タンパク質	プラモリピン (Plamolipin)ファミリ ー	CaCA ファミリー	PNaS ファミリー
Lyn B タンパク質	PLB ファミリー	CCC ファミリー	POT ファミリー
KIaa1741 タンパク質	PLM ファミリー	CDF ファミリー	RFC ファミリー
DC38	プレセニンファミリー	CIC ファミリー	RND ファミリー*
カルシウム輸送 ATP アーゼ	RIR-CaC ファミリー	CNT ファミリー	SSS ファミリー
ACC ファミリー	TRIC ファミリー	CPA1 ファミリー	STRA6 ファミリー
Amt ファミリー	TRP-CC ファミリー	CPA2 ファミリー	SulP ファミリー
ZIP ファミリー	HCC ファミリー	NIPA ファミリー	N-MDE ファミリー
ATP-E ファミリー	LPI ファミリー	PPI ファミリー	Epo 受容体
dsRNA-T ファミリー	MagT1 ファミリー	PPI2 ファミリー	MgtE ファミリー

10

20

【 0 8 1 8 】

【表 2】

表 2. 赤血球プロモーター	
プロモーター	遺伝子
βグロビンプロモーター	βグロビン
3' β-グロビンエンハンサー	βグロビン
βグロビン遺伝子座制御領域	βグロビン
GATA-1 プロモーター	GATA-1
GYPA プロモーター	グリコホリン A
HK1 プロモーター	ヘキソキナーゼ

30

【 0 8 1 9 】

## 【表 3 - 1】

表3. 補体受容体1の配列

4A. CR1アイソフォームS前駆体、ヒト(Homo sapiens) NCBI参照配列番号NP\_000642.3

```

1 mgassprspe pvppapglp fccggsllav vlllalpvaw gqcnapewlp farptnltde
61 fefpigtyln yecrpgysgr pfsiiclkns vwtgakdr cr rkscrnppdp vngmvhvikg
121 iqfgsqikys ctkgyrligs ssatciisgd tviwdnetpi cdripcglpp titngdfist
181 nrenfhygs vtyrcnpgsg grkvfelvge psiyctsndd qvgiwsgpap qciipnkctp
241 pnvengilvs dnrsflslne vvefrcqpgf vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp
301 pdvlhaertq rdkdnfsgg evfyscepgy dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevkscdd 10
361 fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvdegf qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif
421 cpsppvipng rhtgkplevf pfgktvnytc dphpdr gtsf dligestirc tsdpqngvw
481 sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitcldnl
541 vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd iqvg srinys cttghrligh ssaecilsgn
601 aahwstkppi cqripcglpp tiangdfist nrenfhygs vtyrcnpgsg grkvfelvge
661 psiyctsndd qvgiwsgpap qciipnkctp pnvengilvs dnrsflslne vvefrcqpgf
721 vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp pdvlhaertq rdkdnfsgg evfyscepgy
781 dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevkscdd fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvdegf
841 qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif cpsppvipng rhtgkplevf pfgktvnytc 20
901 dphpdr gtsf dligestirc tsdpqngvw sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna
961 sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitcldnl vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd
1021 iqvg srinys cttghrligh ssaecilsgn aahwstkppi cqripcglpp tiangdfist
1081 nrenfhygs vtyrcnpgsg grkvfelvge psiyctsndd qvgiwsgpap qciipnkctp
1141 pnvengilvs dnrsflslne vvefrcqpgf vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp
1201 pdvlhaertq rdkdnfsgg evfyscepgy dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevkscdd
1261 fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvdegf qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif
1321 cpsppvipng rhtgkplevf pfgkavnytc dphpdr gtsf dligestirc tsdpqngvw
1381 sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitcldnl 30
1441 vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd iqvg srinys cttghrligh ssaecilsgn
1501 tahwstkppi cqripcglpp tiangdfist nrenfhygs vtyrcnlgsr grkvfelvge
1561 psiyctsndd qvgiwsgpap qciipnkctp pnvengilvs dnrsflslne vvefrcqpgf
1621 vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp peilhgehtp shqdnfsgg evfyscepgy
1681 dlrgaaslhc tpqgdwspea prcavkscdd flgqlphgrv lfpvnlqlga kvsvfdegf
1741 rlgssvshc vlvgmrlwn nsvpvcehif cpnpailng rhtgtpsgdi pygkeisyc

```

【 0 8 2 0 】

## 【表 3 - 2】

1801 dphpdrgmtf nligestirc tsdphngvw sspaprcels vraghcktpe qfpfasptip  
 1861 indfefpvg t slnyecrpgy fgkmfsiscl enlvwssved ncrkscgpp pepfngmvhi  
 1921 ntdtqfgstv nyscnegfrl igspsttclv sgnnvtwdkk apiceisce ppptisngdf  
 1981 ysnrntsfhn gtvvtyqcht gpdgeqlfel vgersiycts kddqvgvwss ppprcistnk  
 2041 ctapevenai rvpgnrsfft lteiirfrcq pgfvmvgsht vqcqtngrwg pklphcsrvc  
 2101 qpppeilhge htlshqdnfs pgqevfysce psydlrgaas lhctpggdws peaprctvks  
 2161 cddflgqlph grvllplnlq lgakvsfvcd egfrlkgrsa shcvlagmka lwnssvpvce  
 2221 qifcpnppai lngrhtgtpf gdipygkeis yacdthpdr g mtfnligess irctsdpqgn  
 2281 gvwsspaprc elsvpaacph ppkiqngghi gghvslylpg mtisyicdpg yllvgkgfif  
 2341 ctdqgiwsql dhyckevncs fplfmngisk elemkkvyhy gdyvtlkced gytlegspws  
 2401 qcqaddrwdp plaktsrth dalivgtlsg tiffilliif lswiilkhrk gnnahenpke  
 2461 vaihlhsqgg ssvhprtlqt neensrvlp (配列番号1)

10

## 【 0 8 2 1 】

## 【表 3 - 3】

4B. CR1アイソフォームF前駆体、ヒト(Homo sapiens) NCBI参照配列番号NP\_000564.2

1 mgassprspe pvgppapglp fccggsllav vlllalpvaw gqcnapewlp farptnltd  
 61 fefpigtyln yecrpgysgr pfsiiclkns vwtgakdrer rkscrnppdp vngmvhvikg  
 121 iqfgsqikys ctkgyrligs ssatciisgd tviwdnetpi cdripcglpp titngdfist  
 181 nrenfhysv vtyrcnpgsg grkvfelvge psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp  
 241 pnvengilvs dnrsifslne vvefrcqpgf vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp  
 301 pdvlhaertq rdkdnfsgq evfyscepgy dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevkscdd  
 361 fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvdegf qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif 10  
 421 cpsppvipng rhtgkplevf pfgktvnytc dphpdrgtsf dligestirc tsdpqngvw  
 481 sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitcldnl  
 541 vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd iqvgsrinys cttghrligh ssaecilsgn  
 601 aahwstkppi cqripcglpp tiangdfist nrenfhysv vtyrcnpgsg grkvfelvge  
 661 psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp pnvengilvs dnrsifslne vvefrcqpgf  
 721 vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp pdvlhaertq rdkdnfsgq evfyscepgy  
 781 dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevkscdd fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvdegf  
 841 qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif cpsppvipng rhtgkplevf pfgkavnytc  
 901 dphpdrgtsf dligestirc tsdpqngvw sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna 20  
 961 sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitcldnl vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd  
 1021 iqvgsrinys cttghrligh ssaecilsgn tahwstkppi cqripcglpp tiangdfist  
 1081 nrenfhysv vtyrcnlgsr grkvfelvge psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp  
 1141 pnvengilvs dnrsifslne vvefrcqpgf vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp  
 1201 peilhgehtp shqdnfsgq evfyscepgy dlrgaaslhc tpqgdwspea prcavkscdd  
 1261 flgqlphgrv lfpvnlqlga kvsvfdegf rlgkssvshc vlvgmrlwn nsvpvcehif  
 1321 cpnpailng rhtgtpsgdi pygkeisytc dphpdrgmtf nligestirc tsdphngvw  
 1381 sspaprcels vraghcktp qfpfasptip indfefpvt slnyecrpgy fgkmfiscsl  
 1441 enlvwssved ncrkscgpp pepfngmvhi ntdtqfgstv nyscnegfrl igspsttclv 30  
 1501 sgnnvtwddk apiceisce ppptisngdf ysnrntsfhn gtvvtyqcht gpdgeqlfel  
 1561 vgersiycts kddqvgvss ppprcistnk ctapevenai rvpgnrsfft lteirfrq  
 1621 pgfvmvgsht vqcqtngrwg pklphcsrv cqppeilhge htshqdnfs pgqevfysce  
 1681 psydlrgaas lhctpqgdws peaprctvks cddflgqlph grvllplnlq lgakvsfvcd  
 1741 egfrlkgrsa shcvlagmka lwnssvpvce qifcpnppai lngrrhtgtpf gdipygkeis  
 1801 yacdthpdrq mtfnligess irtsdppgn gwsspparc elsvpaacph ppkiqnghyi  
 1861 gghvslylpg mtisyicdpg yllvgkgfif ctdqgiwsql dhyckevncs fplfmngisk  
 1921 elemkkvyhy gdyvtlkced gytlegspws qcqaddrwdp plaktsrth dalivgtlsg  
 1981 tiffilliif lswiilkhrk gnnahenpke vaihlhsqgg ssvhprtlqt neensrvlp 40  
 (配列番号2)

【 0 8 2 2 】

【表 3 - 4】

## 4C. 予想CR1アイソフォームX1、ヒト(Homo sapiens)、NCBI参照配列番号XP\_005273121.1

1 mclgrmgass prspepvpp apglpfcg sllavvlla lpvawgqna pewlpfarpt  
 61 nltdefefpi gtylnyecrp gysgrpfsii clknsvwtga kdrckrksr nppdpvngmv  
 121 hvikgiqfqs qikysctkgy rligsssata iisgdtviwd netpicdrip cglpptitng  
 181 dfistnrenf hygsvvtyrc npgsggrkvf elvgepsiyc tsnddqvgiw sgpapqciip  
 241 nkctppnven gilvsdnrsl fslnevvefr cqpgfvmkqp rrvkcqalnk wepelpscsr  
 301 vcqpppdvlh aertqrkdnd fspgqevfys cepgydlrga asmrctpqgd wpaaptcev  
 361 kscddfmqql lngrvlfpvn lqlgakvdfv cdegfqlkgs sasycvlagm eslwnssvpv 10  
 421 ceqifcpspp vipngrhtgk plevfpfgkt vnytcphpd rgtsfdlige stirctsdpq  
 481 gngvwsspap rcgilghcqa pdhflfaklk tqtnasdfpi gtslkyecrp eyygrpfsit  
 541 cldnlvwssp kvckrksck tppdpvngmv hvitdiqvg rinycttgh rlighssaec  
 601 ilsgnaahws tkppicqrip cglpptiang dfistnrenf hygsvvtyrc npgsggrkvf  
 661 elvgepsiyc tsnddqvgiw sgpapqciip nkctppnven gilvsdnrsl fslnevvefr  
 721 cqpgfvmkqp rrvkcqalnk wepelpscsr vcqpppdvlh aertqrkdnd fspgqevfys  
 781 cepgydlrga asmrctpqgd wpaaptcev kscddfmqql lngrvlfpvn lqlgakvdfv  
 841 cdegfqlkgs sasycvlagm eslwnssvpv ceqifcpspp vipngrhtgk plevfpfgkt  
 901 vnytcphpd rgtsfdlige stirctsdpq gngvwsspap rcgilghcqa pdhflfaklk 20  
 961 tqtnasdfpi gtslkyecrp eyygrpfsit cldnlvwssp kvckrksck tppdpvngmv  
 1021 hvitdiqvg rinycttgh rlighssaec ilsgnaahws tkppicqlc pppdvlhaer  
 1081 tqrdkndfsp gqevfyscep gydlrgaasm rctpqgdwsp aaptcevksc ddfmqqlng  
 1141 rvlfpvnllq lakvdfvcd gfqlkgsas ycvlagmesl wnssvpvceq ifcpsppvip  
 1201 ngrhtgkple vfpfgkavny tcdphdrgt sfdligesti rctsdpqgng vwsspaprcg  
 1261 ilghcqpadh flfaklktqt nasdfpigs lkyecrpeyy grpfsitcld nlwsspdkv  
 1321 ckrksctpp dpvngmvhvi tdiqvgsrin yscttghrli ghssaecils gntahwstkp  
 1381 picqripqgl pptiangdfi stnrenfhyg svvtyrcnlg srgrkvfelv gepsiyctsn  
 1441 ddqvgiwsgp apqciipnkc tppnvengil vsdnrslfsl nevvefrqcp gfvkqpprrv 30  
 1501 kcqalnkwep elpscsrvcq pppelilgeh tpshqdnfsp gqevfyscep gydlrgaasl  
 1561 hctpqgdwsp eaprcavksc ddfqlqphg rvlfpnlql gakvsfvcd gfrlkgssvs  
 1621 hcvlvgrsl wnssvpvceh ifcpnpail ngrhtgtpsg dipygkeisy tcdphdrgm  
 1681 tfnligesti rctsdphgng vwsspaprce lsvraghckt peqpfaspt ipindfefpv  
 1741 gtslkyecrp gyfgkmfsis clenlvwssv edncrrkscg ppppfngmv hintdtqfqs  
 1801 tvnyscnegf rligspsttc lvsgnvtwd kkapiceis cepptisng dfysnrtsf  
 1861 hngtvvtyqc htgpdgeqlf elvgersiy tskddqvgvw sspprcist nkctapeven  
 1921 airvpgnrsf ftlteiirfr cqpgfvmvgs htvcqtng rwpklphcsr vcqpppeilh  
 1981 gehtlshqdn fspgqevfys cepgydlrga aslhctpqgd wspeaprctv kscddflgql 40  
 2041 phgrvllpln lqlgakvsfv cdegfrlkgr sashcvlagm kalwnssvpv ceqifcpnpp  
 2101 ailngrhtgt pfgdipygke isyacdthpd rgmtfnlige ssirctsdpq gngvwsspap  
 2161 rcelsvpaac phppkiqng yigghvslyl pgmtisyid pyllvgkgf ifctdqgiws  
 2221 qldhyckevn csfplfmngi skelemkkvy hygdyvtlkc edgytlegsp wsqcqaddrw  
 2281 dpplakctsr thdalivgtl sgtifillli iflswiikh rkggnahenp kevaihhsq  
 2341 ggssvhprt1 qtneensrvl p (配列番号3)

【 0 8 2 3 】



【表 4 - 1】

表 4. 標的			
標的の一般クラス			
微生物	ポリペプチド	DNA	アミノ酸
真菌	毒素	RNA	プリオン
細菌	脂質	寄生虫	サイトカイン
ウイルス	細胞	細胞残屑	補体関連分子
補体関連標的			
免疫複合体	C3dg	C4a	C6
B 因子	C3dk	C4b	C7
D 因子	C3e	C2	C8
プロパージン	Bb	C4bp	C9
C3	膜侵襲複合体	マンノース結合レクチン (MBL)	
C3a	C1q	MBL 関連セリンプロテアーゼ 1 (MASP1)	
C3b	C1r	MBL 関連セリンプロテアーゼ 2 (MASP2)	
iC3b	C1s	C5	
C3c	C4	C5a	

10

20

30

【 0 8 2 4 】

【表 4 - 2】

感染症関連標的			
リポ多糖類	細胞浸潤タンパク質	インターメジリシン	分泌型エフェクタータンパク質 sptP
閉鎖帯毒素	コレラエンテロトキシン	浸潤タンパク質 sipA	ゼーリゲリオリシン (seeligeriolysin)
アクチン重合タンパク質 RickA	システインプロテアーゼ	イオタ毒素成分 Ia	セリンプロテアーゼ
アクチン重合タンパク質 RickA	細胞致死性膨張性毒素	イバノリシン	志賀毒素
アデノシン-リン酸タンパク質トランスフェラーゼ vopS	細胞溶解素	LepB	スフィンゴミエリナーゼ
アデニル酸シクラーゼ	細胞毒性壊死因子	致死因子	スタフィロキナーゼ
アデニル酸シクラーゼ ExoY	細胞毒	ロイコトキシン	ストレプトキナーゼ
ADP-リボシルトランスフェラーゼ酵素成分	皮膚壊死性毒素	リステリオリシン	ストレプトリジン
アエロリジン	デュビキチナーゼ	微生物コラゲナーゼ	ストレプトバイン
$\alpha$ -毒素	ジフテリア毒素	外膜タンパク質 IcsA オートトランスポーター	スイリシン
アルベオリシン	エンテロヘモリシン	パントン-バレンタインロイコシジン F	スーパー抗原
アルベオリシン	エンテロトキシン	パーフリンゴリジン	T3SS 分泌型エフェクター-EspF
アントロリシン O(anthrolysin O)	表皮細胞分化阻害因子	百日咳毒素	破傷風毒素
Arp2/3 複合体活性化タンパク質 rickA	細胞外酵素	ホスホリパーゼ	Tir
二元 ADP-リボシルトランスフェラーゼ CDT 毒素	外毒素	プラスミノーゲンアクチベーター	TolC

10

20

30

40

【 0 8 2 5 】

【表 4 - 3】

ボツリヌス神経毒素	G-ヌクレオチド交換因子	ニューモリシン	毒素性ショック症候群毒素	
C2 毒素、成分 II	グアニンヌクレオチド交換因子 sopE	防御抗原	ジンクカルボキシペプチダーゼ	
CagA	耐熱性エンテロトキシン	プロテインキナーゼ	ジンクカルボキシペプチダーゼ	10
カルモジュリン感受性アデニル酸シクラーゼ	IgA 特異的セリンエンドペプチダーゼオートトランスポーター	ピオリシン	Zn 依存性ペプチダーゼ	
細胞周期阻害因子	イノシトールリン酸ホスファターゼ sopB	RTX 毒素		20
<b>他の分子標的</b>				
G-CSF	IL3	IL10	MIP1a	
GM-CSF	IL4	IL12	MIP1b	
M-CSF	IL5	IFNa	TGFb	
IL1a	IL6	IFNb	TNFa	
IL1b	IL7	IFNg	TNFb	30
IL2	IL8	自己抗体	非自己抗体	
PRP	PRPc	PRPsc	PRPres	
<b>脂質及び細胞標的</b>				
循環腫瘍細胞	超低密度脂質 (VLDL)	トリグリセリド	脂肪酸	
転移	高密度リポタンパク質	カイロミクロン	コレステロール	40
真核細胞	低密度リポタンパク質	アポリポタンパク質		

【 0 8 2 6 】

【表 5 - 1】

表 5. 疾患及び病態			
癌			
急性リンパ性白血病(ALL)	結腸直腸癌	マクログロブリン血症、ワルデンシュトレーム	胸膜肺芽腫、小児
急性骨髄性白血病(AML)	頭蓋咽頭腫、小児	男性乳癌	妊娠及び乳癌
副腎皮質癌	皮膚 T 細胞リンパ腫	骨悪性線維性組織球腫及び骨肉腫	原発性中枢神経系(CNS)リンパ腫
AIDS 関連カポジ肉腫	非浸潤性乳管癌(DCIS)	メラノーマ	前立腺癌
AIDS 関連リンパ腫	胎児性腫瘍、小児	メルケル細胞癌	希少癌
肛門癌	子宮内膜癌	中皮腫	直腸癌
虫垂癌	上衣腫、小児	原発不明転移性頸部扁平上皮癌	腎細胞癌
星状細胞腫、小児	上皮癌	NUT 遺伝子が関わる正中管の癌	腎盂及び尿管、移行上皮癌
非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、小児	食道癌	奇胎妊娠	網膜芽細胞腫
基底細胞癌	鼻腔神経芽細胞腫、小児	口腔・中咽頭癌	横紋筋肉腫
胆管癌	ユーイング肉腫	多発性内分泌腺腫症候群、小児	唾液腺癌
膀胱癌	性腺外胚細胞腫瘍	多発性骨髄腫/形質細胞腫瘍	肉腫
骨癌	肝外胆管癌	菌状息肉症	二次癌
腸癌	眼癌	骨髄異形成症候群	セザリー症候群
脳幹神経膠腫、小児	胆嚢癌	骨髄異形成/骨髄増殖性新生物	皮膚癌

10

20

30

40

【 0 8 2 7 】

【表5 - 2】

脳腫瘍	胃癌	骨髄増殖性疾患、慢性	皮膚癌(非メラノーマ)	
乳癌	消化管カルチノイド腫瘍	鼻腔・副鼻腔癌	小細胞肺癌	
気管支腫瘍、小児	胚細胞腫瘍	鼻咽腔癌	小腸癌	
パーキットリンパ腫	妊娠性絨毛性腫瘍(GTT)	神経芽細胞腫	軟部組織肉腫	10
原発不明癌	神経膠腫	非ホジキンリンパ腫	扁平上皮癌	
骨への癌転移	ヘアリー細胞白血病	非小細胞肺癌	原発不明頸部扁平上皮癌、転移性	
脳への癌転移	頭頸部癌	食道癌	胃癌(Stomach Cancer) (胃癌(Gastric Cancer))	20
肝臓への癌転移	心臓癌、小児	口腔癌	胃癌	
肺への癌転移	肝細胞癌(肝癌)	口腔癌	T細胞リンパ腫、皮膚 - 菌状息肉症及びセザリ-症候群参照	
カルチノイド腫瘍	組織球増殖症、ランゲルハンス細胞	中咽頭癌	精巣癌	
原発不明癌腫	ホジキンリンパ腫	骨肉腫(骨癌)	咽喉癌	30
心腫瘍(心臓腫瘍)、小児	下咽頭癌	骨肉腫及び悪性線維性組織球腫	胸腺腫及び胸腺癌	
中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、小児	眼球内黒色腫	卵巣癌	甲状腺癌	
中枢神経系胎児性腫瘍、小児	膵島細胞腫、膵神経内分泌腫瘍	膵癌	腎盂尿管移行上皮癌	40
中枢神経系、小児	腎癌	膵神経内分泌腫瘍(膵島細胞腫)	原発不明癌	

【0828】

【表 5 - 3】

子宮頸癌	ランゲルハンス細胞組織球症	乳頭腫症、小児	尿管及び腎盂、移行 上皮癌
脊索腫、小児	喉頭癌	傍神経節腫	尿道癌
絨毛癌	白血病	副甲状腺癌	子宮癌、子宮内膜
慢性リンパ性白 血病(CLL)	口唇・口腔癌	陰茎癌	子宮肉腫
慢性骨髄性白血 病(CML)	肝癌	咽頭癌	腔癌
慢性骨髄増殖性 疾患	非浸潤性小葉癌(LCIS)	褐色細胞腫	外陰癌
結腸癌	低悪性度腫瘍	下垂体腫瘍	ワルデンシュトレーム マクログロブリン血 症
リンパ腫	肺癌	形質細胞腫瘍/多発 性骨髄腫	ウィルムス腫瘍

10

20

【 0 8 2 9 】

【表 5 - 4】

補体及び免疫複合体関連疾患			
加齢性黄斑変性症	ANCA 関連血管炎(微量免疫型を含む)	糸球体腎炎 - 疎な毛髪 - 毛細血管拡張	MYH9 関連疾患
非典型溶血性尿毒症症候群	抗糸球体基底膜抗体病(グッドパスチャー)	グッドパスチャー症候群	爪・膝蓋骨症候群
自己免疫性溶血性貧血	アルサス反応	多発血管炎性肉芽腫症(ANCA 及びウエゲナー)	爪・膝蓋骨様腎疾患
C1 インヒビター欠損症	喘息	ギラン・バレー症候群	腎炎
C1q 欠損症	非典型溶血性尿毒症症候群	溶血性血管性浮腫(HAE)	非アミロイドモノクローナル免疫グロブリン沈着症
C1r 欠損症	自己免疫性内耳疾患(AIED) 感音難聴	ヘノッホ・シェーンライン紫斑病	微量免疫型糸球体腎炎
C1s 欠損症	自己免疫性ブドウ膜炎	HIVICK	小児全身性エリテマトーデス
C2 欠損症	常染色体優性中間型シャルコー・マリー・トゥース病 E 型	過敏性血管炎	ピアソン症候群
C3 欠損症	ベーチェット病	低補体血症性蕁麻疹様血管炎	多発動脈炎
C4 欠損症	ベルジェ(IgA)腎症	特発性膜性糸球体腎炎	結節性多発性動脈炎
C5 欠損症	バージャー病	特発性ネフローゼ症候群	リウマチ性多発筋痛症
C6 欠損症	中枢神経系脈管炎	IgA 腎症(ベルジェ病)	多発筋炎
C7 欠損症	脈絡膜炎	IgA 腎症/脈管炎(ヘノッホ・シェーンライン紫斑病)	多発筋炎/皮膚筋炎

【 0 8 3 0 】

【表 5 - 5】

C8 欠損症	慢性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP)	免疫性血小板減少症	ブドウ球菌感染後糸球体腎炎	
C9 欠損症	チャージ・シュトラウス症候群	免疫水疱性疾患	連鎖球菌感染後糸球体腎炎	
CD55 欠損症	コーガン症候群	イムノタクトイド又は線維性糸球体症	原発性膜性増殖性糸球体腎炎	10
CD59 欠損症	III 型コラーゲン糸球体症	感染症関連糸球体腎炎	急速進行性糸球体腎炎(半月体形成性)	
補体 I 因子欠損症	先天性・乳児ネフローゼ症候群	炎症性ミオパチー	急速進行性糸球体腎炎(RPGN)	
補体 H 因子関連 1(CFHR1)欠損症	母子抗中性エンドペプチダーゼ同種免疫に起因する先天性膜性腎症	若年性皮膚筋炎	ラスムッセン症候群	20
補体 H 因子関連 3(CFHR3)欠損症	クリオグロブリン血症/寒冷凝集素症	若年性多発筋炎	反応性関節炎	
CR3/CR4 欠損症(白血球接着不全症 1)	クリオグロブリン血症性脈管炎	川崎病	再発性多発性軟骨炎	
B 因子欠損症	皮膚血管炎	リポタンパク糸球体症	腎アミロイドーシス	30
D 因子欠損症	脱髄性ミオパチー(パラプロテイン関連)	ループス腎炎	レイノー症候群	
H 因子欠損症	デニス・ドラッシュ症候群	ループス腎症	関節リウマチ	
I 因子欠損症	皮膚筋炎	メイ・ヘグリン異常	サルコイドーシス(ネスニエー・ベック・シュアマン病(Nesnier Boeck Schuamann disease))	40
フィコリン 3 欠損症	皮膚筋炎	膜性糸球体腎炎	シムケ免疫性骨形成不全	



【表 5 - 6】

MASP2 欠損症	糖尿病性腎症	膜性増殖性糸球体腎炎	強皮症	
MBL 欠損症	薬物誘発性免疫複合体性血管炎	膜性増殖性糸球体腎炎 I 型(MPGN I 型)	セバスチャン症候群	
非アルコール性脂肪性肝炎	好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(チャーグ・ストラウス)	膜性増殖性糸球体腎炎 II 型(デンスデポジット病、MPGN II 型)	続発性アミロイドーシス	10
発作性夜間ヘモグロビン尿症	エプスタイン症候群	膜性増殖性糸球体腎炎 III 型(MPGN III 型)	重症又は再発性クロストリジウム・ディフィシル(C diff)大腸炎	
プロパージン欠損症	本態性混合型クリオグロブリン血症	膜性糸球体腎炎	シェーグレン症候群	20
動作時ミオクロームス - 腎不全症候群	家族性地中海熱	メニエール病	ブドウ球菌性又は連鎖球菌性敗血症	
急性呼吸器疾患症候群(ARDS)/重症急性呼吸器症候群(SARS)	家族性腎アミロイドーシス	顕微鏡的多発性血管炎	全身硬直症候群	30
急性血清病	感音難聴を伴う家族性ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群	微小変化型疾患	全身性エリテマトーデス	
成人発症スチル病	農夫肺	混合結合組織病	全身性硬化症	
加齢性黄斑変性症	フェクトナー症候群	主に大型血管の血管炎	高安動脈炎	
AL アミロイドーシス	フィブロンネクチン糸球体症	主に中型血管の血管炎	中毒性表皮壊死症(ステイブンス・ジョンソン症候群)	40

【 0 8 3 2 】

【表5 - 7】

アルポート症候群	線維性胞隔炎	主に小型血管の血管炎	移植/再灌流(実質臓器)	
アルツハイマー病	巣状分節性糸球体の	マックル・ウェルズ症候群	脈管炎	
アミロイドーシス (AL、AA、MIDD、その他)	巣状分節性糸球体硬化症	重症筋無力症	ウェゲナー肉芽腫症	10
巨細胞性動脈炎	フレイジャー症候群	ギャロウェイ・モフト症候群		
1型糖尿病	重症筋無力症	グレース病	悪性貧血	
クローン病	円形脱毛症	血小板減少性紫斑病	原発性胆汁性肝硬変	
潰瘍性大腸炎	自己免疫性肝炎	ギラン・バレー症候群	乾癬	20
炎症性腸症候群	自己免疫性皮膚筋炎	自己免疫性心筋炎	関節リウマチ	
多発性硬化症	若年性特発性関節炎	自己免疫性天疱瘡	白斑	
<b>酵素欠損症及び血管疾患</b>				
2,4-ジエノイル-CoAレダクターゼ欠損症	ファブリー病(1:80,000~1:117,000)	イソブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ	末梢神経障害	30
2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸尿症	家族性高コレステロール血症(1:500)	イソ吉草酸血症	ペルオキシノーム病(1:50,000; 例えば、ツェルウェガー症候群、新生児副腎白質ジストロフィー、レフサム病)	
2-メチルブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ	家族性心筋梗塞/脳卒中	ラクターゼ欠損症(一般)	フェニルケトン尿症	40

【0833】

【表 5 - 8】

3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル (HMG)酸性尿症	脂肪酸酸化障害(1:10,000)	レッシュ・ナイハン症候群	原発性高シュウ酸尿症	
3-メチルグルタコン酸尿症	ガラクトキナーゼ欠損症	リポタンパク質リパーゼ欠損症(希少)	プロピオン酸血症	
3-オキソチオラーゼ欠損症 (1:100,000)	ガラクトースエピメラーゼ	長鎖 L-3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ	反復性嘔吐	10
4-ヒドロキシ酪酸尿症	ガラクトース血症	リジン尿性タンパク不耐症(希少)	短鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ	
5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素欠損症(一般)	ガラクトース血症(1:40,000)	リジン尿性タンパク不耐症(希少)	スクラーゼ-イソマルターゼ欠損症(希少)	20
5-オキソプロリン尿症(ピログルタミン酸尿症)	ゴーシェ病	マロン酸血症	膵炎の症状	
無βリポタンパク血症(希少)	グルタル酸血症 I 型	メープルシロップ尿症	トランスフェラーゼ欠乏ガラクトース血症 (ガラクトース血症 1 型)	30
急性間欠性ポルフィリン症	グルタル酸血症 II 型	中鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ	三官能性タンパク質欠損症	
アルカプトン尿症	5-オキソプロリン尿症を伴うグルタチオン合成酵素欠損症	中鎖/短鎖 L-3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ	チロシン血症 1 型	
アルギニン血症	5-オキソプロリン尿症を伴わないグルタチオン合成酵素欠損症	中鎖ケトアシル-CoA チオラーゼ	チロシン血症 2 型	40
アルギニノコハク酸尿症	グリコーゲン分解障害 (1:20,000)	異染性白質ジストロフィー(1:100,000)	チロシン血症 3 型	

【 0 8 3 4 】

【表 5 - 9】

良性高フェニルアラニン血症	糖原病、I型(1:70,000)	異染性白質ジストロフィー(1:100,000)	上方注視麻痺	
βケトチオラーゼ欠損症	アデニル酸キナーゼ欠損症に起因する溶血性貧血	メチルマロン酸血症 (Cbl C)	超長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ	
ビオプテリン補因子生合成不全	グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ欠損に起因する溶血性貧血	メチルマロン酸血症 (Cbl D)	ウィルソン病	10
ビオプテリン補因子再生不全	ジホスホグリセリン酸ムターゼ欠損に起因する溶血性貧血	メチルマロン酸血症 (ビタミン B12 不応性)	アイカルディ・グチエール症候群(CLE の対立形質であり得る)	
ビオチン不応性 3-メチルクロニル-CoA カルボキシラーゼ欠損症	赤血球アデノシンデアミナーゼ過剰産生に起因する溶血性貧血	ホモシスチン尿症を伴わないメチルマロン酸血症	皮膚エリテマトーデス	20
カルバモイルリン酸シンテターゼ	グルコリン酸イソメラーゼ欠損に起因する溶血性貧血	メチルマロン酸尿症及びホモシスチン尿症	疱疹状皮膚炎	
カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ	グルタチオンレダクターゼ欠損に起因する溶血性貧血	ミトコンドリア病 (1:30,000)	血友病 A	30
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損に起因する溶血性貧血	ミトコンドリア病 (1:30,000; 例えば、シトクロム-c オキシダーゼ欠損症; MELAS 症候群; ピアソン症候群[全て希少])	血友病 B	40
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II	ピリミジン 5'ヌクレオチダーゼ欠損に起因する溶血性貧血	ミトコンドリア病 (1:30,000; 例えば、リー病、カーンズ・セイヤー症候群 [希少])	特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群(巣状分節性糸球体硬化症と同じ)	

【表 5 - 10】

カルニチン取込み不全	赤血球細胞ピルビン酸キナーゼ欠損に起因する溶血性貧血	ミトコンドリア病 (1:30,000; 例えば、リポアミドデヒドロゲナーゼ欠損症 [希少])	免疫性血小板減少性紫斑病	
シトルリン血症 I 型	HHH 症候群(希少)	ミトコンドリア病 (1:30,000; 例えば、ピアソン症候群 [希少])	重症筋無力症	10
シトルリン血症 II 型	ホモシスチン尿症	マルチプルカルボキシラーゼ(ホロカルボキシラーゼシンテターゼ)	少関節型若年性関節炎	20
先天性グリコシル化異常症(希少)	ホモシスチン尿症(1:200,000)	マルチプルカルボキシラーゼ欠損症(例えば、ホロカルボキシラーゼシンテターゼ[希少])及びピオチニダーゼ欠損症(1:60,000)	強皮症	30
D-2-ヒドロキシグルタル酸尿症	高アンモニア血症/オルニチン血症/シトルリン血症(オルニチントランスポーター欠損)	筋痙攣/痙縮	日光蕁麻疹(ポルフィリン症性紅斑であり得る)	40
D-2-ヒドロキシグルタル酸尿症(希少)	高リポタンパク血症、I 型及び IV 型(希少)	ミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症 (1:100,000)	血栓性血小板減少性紫斑病	
エンテロペプチダーゼ欠損症(希少)	グリシン N-メチルトランスフェラーゼ欠損に起因する高メチオニン血症	ニーマン・ピック病、C 型(希少)	ブドウ膜炎/ATIN を伴う尿細管間質性腎炎	
エチルマロン酸脳症	アデノシンキナーゼ欠損に起因する高メチオニン血症脳症	非ケトン性高グリシン血症	フォン・ヴィレブランド病	
	高プロリン血症			

【表 5 - 1 1】

感染症及び感染病原体			
アシネトバクター (Acinetobacter)	デング出血熱	感染誘発性免疫複 合体性血管炎	敗血症
アーコバクター・ ブツレリ (Arcobacter butzleri)感染症 - 血液感染	マイコバクテリウム・アビウム (Mycobacterium avium)コン プレックスによる播種性感染 - 血液感染	クレブシエラ属 (Klebsiella)	セラチア属(Serratia)
アーコバクター・ クリエロフィルス (Arcobacter cryaerophilus) 感染症 - 血液感 染	大腸菌(E.coli)	らい/ハンセン病	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)
アーコバクター属 (Arcobacter)感 染症 - 血液感染	エンテロバクター属 (Enterobacter)	マラリア	ステプトロホモナス・ マルトフィリア (Stenotrophomonas maltophilia) - 血液 感染
菌血症	エンテロコッカス属 (Enterococcus)	髄膜炎菌	A 群連鎖球菌侵襲 性疾患 - 血液感染
細菌性心内膜炎	鼻疽 - 血液感染	メチシリン耐性黄色 ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	肺炎連鎖球菌 (Streptococcus pneumoniae)
カンピロバクテ ー・フィタス (Campylobacter fetus)感染症 - 血液感染	淋疾	シュドモナス属 (Pseudomonas)	化膿レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)

10

20

30

40

【 0 8 3 7 】

【表 5 - 1 2】

カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni)感染症 - 血液感染	肝炎	ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi)- 血液感染	トリパノソーマ症
カンジダ属 (Candida)	ヒト免疫不全ウイルス	サルモネラ属 (Salmonella)	黄熱
コアグララーゼ陰性スタフィロコッカス属(Staphylococcus)			

【 0 8 3 8 】

【表 6 - 1】

表 6. 外因性抗原			
一般的な外因性抗原クラス			
アンキリンリピートタンパク質		フィブロネクチン	リアーゼ
抗体	補体受容体	GPI 結合ポリペプチド	ナノボディ
アプタマー	環状ペプチド	HEAT リピートタンパク質	核酸
ARM リピートタンパク質	DARPin	ヒドロラーゼ	ポリペプチド
炭水化物	DN アーゼ	キナーゼ	一本鎖可変断片(scFv)
細胞表面受容体	酵素	リポタンパク質	テトラトリコペプチドリピートタンパク質
補体関連外因性抗原			
C1 インヒビター	C4 結合タンパク質	CR3	I 因子
C3 $\beta$ 鎖受容体	CD59	CR4	同種制限因子
C3aR	CR1	崩壊促進因子(DAF)	メンブレンコファクタープ ロテイン(MCP)
C3eR	CR2	H 因子	PRELP
酵素			
トリアシルグリセロール リパーゼ	胆汁酸-CoA ヒドロラー ゼ	フェルロイルエステラ ーゼ	ホスファチジン酸ホスファ ターゼ
(S)-メチルマロニル- CoA ヒドロラーゼ	ビス(2-エチルヘキシル) フタル酸エステラーゼ	ホルミル-CoA ヒドロラ ーゼ	ホスファチジルグリセロホ スファターゼ
[アシルキャリアータン パク質]ホスホジエステ ラーゼ	ビスホスホグリセリン酸 ホスファターゼ	フルクトース-ビスホス ファターゼ	ホスファチジルイノシトール デアシラーゼ
[ホスホリラーゼ]ホスフ ァターゼ	カルボン酸エステルヒド ロラーゼ	フマリルアセトアセター ゼ	ホスホジエステラーゼ I
1,4-ラクトナーゼ	カルボキシメチレンプテ リダーゼ	フサリニン-C オルニチ ンエステラーゼ	ホスホグリセリン酸ホスフ ァターゼ

10

20

30

40

【 0 8 3 9 】



【表 6 - 2】

11-シス-レチニル-パル ミチン酸ヒドロラーゼ	セルロースポリスルファタ ーゼ	ガラクトリパーゼ	ホスホグリコール酸ホスフ ァターゼ	
1-アルキル-2-アセチル グリセロホスホコリンエ ステラーゼ	セファロスポリン-C デア セチラーゼ	グルコノラクトナーゼ	ホスホイノシチドホスホリ パーゼ C	
2'-ヒドロキシビフェニ ル-2-スルフィン酸デス ルフィナーゼ	セレブロシドスルファター ゼ	グルコース-1-ホスファ ターゼ	ホスホリパーゼ A1	10
2-ピロン-4,6-ジカルボ ン酸ラクトナーゼ	セトラキサートベンジルエ ステラーゼ	グルコース-6-ホスファ ターゼ	ホスホリパーゼ A2	
3',5'-ニリン酸ヌクレオ チダーゼ	クロロゲン酸ヒドロラーゼ	グルタチオンチオール エステラーゼ	ホスホリパーゼ C	
3-ヒドロキシイソブチリ ル-CoA ヒドロラーゼ	クロロフィラーゼ	グリセロール-1-ホスフ ァターゼ	ホスホリパーゼ D	20
3'-ヌクレオチダーゼ	コリンエステラーゼ	グリセロール-2-ホスフ ァターゼ	ホスホノアセトアルデヒド ヒドロラーゼ	
3-オキソアジピン酸エ ノールラクトナーゼ	コリンスルファターゼ	グリセロリン酸コリンホ スホジエステラーゼ	ホスホノ酢酸ヒドロラーゼ	
3-フィターゼ	コロイル-CoA ヒドロラー ゼ	グリコシダーゼ、即ち O-及び S-グリコシル 化合物を加水分解す る酵素	ホスホノビルビン酸ヒドロ ラーゼ	30
4-ヒドロキシベンゾイル -CoA チオエステラー ゼ	コンドロ-4-スルファター ゼ	グリコスルファターゼ	リンタンパク質ホスファタ ーゼ	
4-メチルオキサロ酢酸 エステラーゼ	コンドロ-6-スルファター ゼ	グリコシラーゼ	リン酸ジエステルヒドロラ ーゼ	
4-フィターゼ	クエン酸リアーゼデアセ チラーゼ	ヒスチジノールホスファ ターゼ	リン酸モノエステルヒドロ ラーゼ	
4-ピリドキソラクトナー ゼ	コカインエステラーゼ	ホルモン感受性リパー ゼ	リン酸三エステルヒドロラ ーゼ	40

【 0 8 4 0 】

【表 6 - 3】

5'-ヌクレオチダーゼ	クチナーゼ	N-グリコシル化合物を加水分解する	ホスホセリンホスファターゼ	
6-アセチルグルコースデアセチラーゼ	シクラミン酸スルホヒドロラーゼ	S-グリコシル化合物を加水分解する	ポリ(3-ヒドロキシブチレート)デポリメラーゼ	
6-ホスホグルコノラクトナーゼ	システインエンドペプチダーゼ	ヒドロキシアシルグルタチオンヒドロラーゼ	ポリ(3-ヒドロキシアシロキサン酸)デポリメラーゼ	
a-アミノ酸エステラーゼ	システイン型カルボキシペプチダーゼ	ヒドロキシ酪酸二量体ヒドロラーゼ	ポリノイリジンアルデヒドエステラーゼ	10
a-アミノ-アシル-ペプチドヒドロラーゼ	D-アラビノラクトナーゼ	ヒドロキシメチルグルタルル-CoA ヒドロラーゼ	タンパク質-グルタミン酸メチルエステラーゼ	
アセトアセチル-CoA ヒドロラーゼ	デオキシリモン酸 A 環ラクトナーゼ	イズロン酸-2-スルファターゼ	クオラムクエンチング N-アシル-ホモセリンラクトナーゼ	
アセトキシブチニルピチオフェンデアセチラーゼ	dGTP アーゼ	イノシトールリン酸ホスファターゼ	レチニルパルミチン酸エステラーゼ	20
アセチルアジュマリンエステラーゼ	ジヒドロクマリンヒドロラーゼ	幼若ホルモンエステラーゼ	セリンデヒルダターゼ (dehydratase)又はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ	
アセチルアルキルグリセロールアセチルヒドロラーゼ	ジペプチダーゼ	キヌレニナーゼ	セリンエンドペプチダーゼ	30
アセチルコリンエステラーゼ	ジペプチドヒドロラーゼ	L-アラビノラクトナーゼ	セリン-エタノールアミンリン酸ホスホジエステラーゼ	
アセチル-CoA ヒドロラーゼ	ジペプチジルペプチダーゼ及びトリペプチジルペプチダーゼ	リモニン D 環ラクトナーゼ	セリン型カルボキシペプチダーゼ	
アセチルエステラーゼ	ジリン酸モノエステルヒドロラーゼ	リポタンパク質リパーゼ	S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ	40
アセチルピルビン酸ヒドロラーゼ	ジスルホグルコサミン-6-スルファターゼ	L-ラムノ-1,4-ラクトナーゼ	シアル酸-O-アセチルエステラーゼ	

【 0 8 4 1 】

【表 6 - 4】

アセチルサリチル酸デアセチラーゼ	ドデカノイル-[アシルキヤリアータンパク質]ヒドロラーゼ	リゾホスホリパーゼ	シナピンエステラーゼ	
アセチルキシランエステラーゼ	3'-ホスホモノエステルを産生するエンドデオキシリボヌクレアーゼ	マンニトール-1-ホスファターゼ	部位特異的エンドデオキシリボヌクレアーゼ: 開裂は配列特異的ではない	10
酸性ホスファターゼ	5'-ホスホモノエステルを産生するエンドデオキシリボヌクレアーゼ	メタロカルボキシペプチダーゼ	変化した塩基に特異的な部位特異的エンドデオキシリボヌクレアーゼ	10
酸無水物に作用して物質の膜貫通移動を触媒する	未知の触媒機構のエンドペプチダーゼ	メタロエンドペプチダーゼ	部位特異的エンドデオキシリボヌクレアーゼ: 開裂は配列特異的である	
酸無水物に作用して細胞及び細胞内移動を促進する	3'-ホスホモノエステルを産生するエンドリボヌクレアーゼ	メチルホスホチオグリセリン酸ホスファターゼ	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ	20
GTPに作用して細胞及び細胞内移動を促進する	5'-ホスホモノエステルを産生するエンドリボヌクレアーゼ	メチルウンベリフェリル酢酸デアセチラーゼ	S-スクシニルグルタチオンヒドロラーゼ	
リン-窒素結合に作用する	リボ核酸又はデオキシリボ核酸のいずれかで活性な且つ3'-ホスホモノエステルを産生するエンドリボヌクレアーゼ	モノテルペン e-ラクトンヒドロラーゼ	ステロイドラクトナーゼ	30
硫黄-窒素結合に作用する	リボ核酸又はデオキシリボ核酸のいずれかで活性な且つ5'-ホスホモノエステルを産生するエンドリボヌクレアーゼ	N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ	ステロールエステラーゼ	
アクチノマイシンラクトナーゼ	酸無水物に作用する酵素	N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ	ステリルスルファターゼ	40

【 0 8 4 2 】

【表 6 - 5】

アシルカルニチンヒドロラーゼ	炭素-炭素結合に作用する酵素	N-アセチルガラクトサミノグリカンデアセチラーゼ	スクシニル-CoA ヒドロラーゼ	
アシル-CoA ヒドロラーゼ	ペプチド結合を除く炭素-窒素結合に作用する酵素	N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ	スクロースリン酸ホスファターゼ	
アシルグリセロールリパーゼ	炭素-リン結合に作用する酵素	N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ	糖ホスファターゼ	10
アシルオキシアシルヒドロラーゼ	炭素-硫黄結合に作用する酵素	オレオイル-[アシルキヤリアータンパク質]ヒドロラーゼ	硫酸エステルヒドロラーゼ	
アシルピルビン酸ヒドロラーゼ	エーテル結合に作用する酵素	オメガペプチダーゼ	タンナーゼ	
ADAMTS13	ハロゲン化物結合に作用する酵素	オルセリン酸デプシドヒドロラーゼ	チオエステルヒドロラーゼ	20
アデノシンデアミナーゼ	ペプチド結合に作用する酵素(ペプチダーゼ)	オキサロアセターゼ	チオエーテル及びトリアルキルスルホニウムヒドロラーゼ	
アデニル-[グルタミン酸アンモニアリガーゼ]ヒドロラーゼ	リン-窒素結合に作用する酵素	パルミトイル[タンパク質]ヒドロラーゼ	スレオニンエンドペプチダーゼ	
ADP 依存性中鎖アシル-CoA ヒドロラーゼ	硫黄-窒素結合に作用する酵素	パルミトイル-CoA ヒドロラーゼ	チミジンホスホリラーゼ	30
ADP 依存性短鎖アシル-CoA ヒドロラーゼ	硫黄-硫黄結合に作用する酵素	ペクチンエステラーゼ	トレハロースホスファターゼ	
ADP-ホスホグリセリン酸ホスファターゼ	エーテルヒドロラーゼ	ペプチジルペプチドヒドロラーゼ	トリ酢酸ラクトナーゼ	
アルカリホスファターゼ	5'-ホスホモノエステルを産生するエキソデオキシリボヌクレアーゼ	ペプチジルアミノ酸ヒドロラーゼ	三リン酸モノエステルヒドロラーゼ	40

【 0 8 4 3 】

【表 6 - 6】

オールトランス型レチニ ル-パルミチン酸ヒドロ ラーゼ	リボ核酸又はデオキシリ ボ核酸のいずれかで活 性な且つ 3'-ホスホモノ エステルを産生するエキ ソヌクレアーゼ	ペプチジルアミノ酸ヒド ロラーゼ又はアシルア ミノ酸ヒドロラーゼ	三チオン酸ヒドロラーゼ
アミノアシル-tRNA ヒ ドロラーゼ	リボ核酸又はデオキシリ ボ核酸のいずれかで活 性な且つ 5'-ホスホモノ エステルを産生するエキ ソヌクレアーゼ	ペプチジルジペプチダ ーゼ	トロピンエステラーゼ
アミノペプチダーゼ	3'-ホスホモノエステルを 産生するエキソリボヌク レアーゼ	フェニルアセチル- CoA ヒドロラーゼ	ユビキチンチオールエス テラーゼ
アリールエステラーゼ	5'-ホスホモノエステルを 産生するエキソリボヌク レアーゼ	フェニルアラニンアン モニアリアーゼ	UDP-スルホキノボースシ ンターゼ
アリールスルファターゼ	第 IX 因子	フェニルアラニンヒドロ キシラーゼ	ウリカーゼ
アスパラギナーゼ	第 VIII 因子	フェオホルビダーゼ	ウロノラクトナーゼ
アスパラギン酸エンドペ プチダーゼ	脂肪アシルエチルエステ ルシンターゼ	フロレチンヒドロラーゼ	ワックスエステルヒドロラ ーゼ
b-ジケトンヒドロラーゼ		ホルポールジエステル ヒドロラーゼ	キシロノ-1,4-ラクトナーゼ

10

20

30

【 0 8 4 4 】

【表 7 - 1】

表 7. 選択される疾患、外因性抗原及び標的			
カテゴリー	疾患	外因性抗原	標的
アミロイドーシス	AA アミロイドーシス	血清アミロイド A タンパク質又は血清アミロイド P 成分に対する抗体様バインダー	血清アミロイド A タンパク質及びアミロイド斑
アミロイドーシス	$\beta$ 2 ミクログロブリンアミロイドーシス	$\beta$ -2 ミクログロブリン又は血清アミロイド P 成分に対する抗体様バインダー	$\beta$ 2 ミクログロブリン又はアミロイド斑
アミロイドーシス	軽鎖アミロイドーシス	軽鎖、血清アミロイド P 成分に対する抗体様バインダー	抗体軽鎖又はアミロイド斑
細胞クリアランス	癌	CD44 に対する抗体様バインダー	循環腫瘍細胞
細胞クリアランス	癌	EpCam に対する抗体様バインダー	循環腫瘍細胞
細胞クリアランス	癌	Her2 に対する抗体様バインダー	循環腫瘍細胞
細胞クリアランス	癌	EGFR に対する抗体様バインダー	循環腫瘍細胞
細胞クリアランス	癌 (B 細胞)	CD20 に対する抗体様バインダー	癌性 B 細胞
細胞クリアランス	癌 (B 細胞)	CD19 に対する抗体様バインダー	癌性 B 細胞
クリアランス抗体	抗リン脂質症候群	$\beta$ 2-糖タンパク質-1	$\beta$ 2-糖タンパク質-1 に対する病原性自己抗体
クリアランス抗体	劇症型抗リン脂質症候群	$\beta$ 2-糖タンパク質-1	$\beta$ 2-糖タンパク質-1 に対する病原性自己抗体

10

20

30

40

【 0 8 4 5 】

【表 7 - 2】

クリアランス 抗体	寒冷凝集素症	I/i 抗原	I/i 抗原に対する病原 性自己抗体	
クリアランス 抗体	グッドパスチャー症候群	コラーゲン(IV)の a3 NC1ドメ イン	コラーゲン(IV)の a3 NC1ドメインに対する 病原性自己抗体	
クリアランス 抗体	免疫性血小板減少性紫 斑病	血小板糖タンパク質(Ib-IX、 IIb-IIIa、IV、Ia-IIa)	血小板糖タンパク質に 対する病原性自己抗 体	10
クリアランス 抗体	膜性腎症	ホスホリパーゼ A2 受容体	ホスホリパーゼ A2 受 容体に対する病原性 自己抗体	
クリアランス 抗体	温式抗体溶血性貧血	グリコホリン A、グリコホリン B、及び/又はグリコホリン C、 Rh 抗原	グリコホリン及び/又は Rh 抗原に対する病原 性自己抗体	20
補体	加齢性黄斑変性症	好適な補体調節タンパク質	活性補体	
補体	非典型性溶血性尿毒症症 候群	補体因子 H、又は好適な補体 調節タンパク質	活性補体	
補体	自己免疫性溶血性貧血	好適な補体調節分子	活性補体	
補体	補体 I 因子欠損症	補体 I 因子、好適な補体調節 タンパク質	活性補体	30
補体	非アルコール性脂肪性 肝炎	好適な補体調節分子	活性補体	
補体	発作性夜間ヘモグロビ ン尿症	好適な補体調節タンパク質	活性補体	
酵素	3-メチルクロトニル- CoA カルボキシラーゼ 欠損症	3-メチルクロトニル-CoA カル ボキシラーゼ	3-ヒドロキシバレリルカ ルニチン、3-メチルク ロトニルグリシン(3- MCG)及び 3-ヒドロキ シイソ吉草酸(3- HIVA)	40
酵素	急性間欠性ポルフィリン 症	ポルホピリノーゲンデアミナー ゼ	ポルホピリノーゲン	

【表 7 - 3】

酵素	急性リンパ芽球性白血病	アスパラギナーゼ	アスパラギン	
酵素	急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病	アスパラギナーゼ	アスパラギン	
酵素	急性骨髄芽球性白血病	アスパラギナーゼ	アスパラギン	
酵素	アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損症	アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ	不溶性プリン 2,8-ジヒドロキシアデニン	10
酵素	アデノシンデアミナーゼ欠損症	アデノシンデアミナーゼ	アデノシン	
酵素	無フィブリノーゲン血症	FI	酵素補充	
酵素	アルコール中毒	アルコールデヒドロゲナーゼ/ オキシダーゼ	エタノール	20
酵素	アレキサnder病	FVII	酵素補充	
酵素	アルカプトン尿症	ホモゲンチジン酸オキシダーゼ	ホモゲンチジン酸	
酵素	アルギニン血症	アンモニアモノオキシゲナーゼ	アンモニア	
酵素	アルギニノコハク酸尿症	アンモニアモノオキシゲナーゼ	アンモニア	
酵素	シトルリン血症 I 型	アンモニアモノオキシゲナーゼ	アンモニア	
酵素	シトルリン血症 II 型	アンモニアモノオキシゲナーゼ	アンモニア	
酵素	完全 LCAT 欠損症、魚眼症、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症	レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)	コレステロール	30
酵素	シアン化合物中毒	チオ硫酸-シアン化物サルファートランスフェラーゼ	シアン化物	
酵素	糖尿病	ヘキソキナーゼ、グルコキナーゼ	グルコース	
酵素	第 II 因子欠乏症	FII	酵素補充	40
酵素	家族性高アルギニン血症	アルギナーゼ	アルギニン	
酵素	フィブリン安定化因子欠損症	FXIII	酵素補充	



【表 7 - 4】

酵素	グルタル酸血症 I 型	リジンオキシダーゼ	3-ヒドロキシグルタル酸及びグルタル酸 (C5-DC)、リジン	
酵素	痛風	ウリカーゼ	尿酸	
酵素	痛風 - 高尿酸血症	ウリカーゼ	尿酸(尿酸結晶)	
酵素	ハーゲマン因子欠損症	FXII	酵素補充	10
酵素	ピリミジン 5'ヌクレオチダーゼ欠損に起因する溶血性貧血	ピリミジン 5'ヌクレオチダーゼ	ピリミジン	
酵素	血友病 A	第 VIII 因子	トロンビン(第 II a 因子)又は第 X 因子	
酵素	血友病 B	第 IX 因子	第 XIa 因子又は第 X 因子	20
酵素	血友病 C	FXI	酵素補充	
酵素	肝細胞癌、メラノーマ	アルギニンデイミナーゼ	アルギニン	
酵素	ホモシスチン尿症	シスタチオニン B シンターゼ	ホモシステイン	
酵素	高アンモニア血症/オルニチン血症/シトルリン血症(オルニチントランスポーター欠損症)	アンモニアモノオキシゲナーゼ	アンモニア	30
酵素	イソ吉草酸血症	ロイシン代謝酵素	ロイシン	
酵素	鉛中毒	d-アミノレブリン酸デヒドロゲナーゼ	鉛	
酵素	レッシュ・ナイハン症候群	ウリカーゼ	尿酸	
酵素	メープルシロップ尿症	ロイシン代謝酵素	ロイシン	
酵素	メチルマロン酸血症(ビタミン B12 不応性)	メチルマロニル-CoA ムターゼ	メチルマロン酸	40
酵素	ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症	チミジンホスホリラーゼ	チミジン	

【 0 8 4 8 】

【表 7 - 5】

酵素	ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症 (MNGIE)	チミジンホスホリラーゼ	チミジン	
酵素	オーレン病	FV	酵素補充	
酵素	p53 欠損固形腫瘍	セリンデヒルダターゼ (dehydratase)又はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ	セリン	10
酵素	膵臓腺癌	アスパラギナーゼ	アスパラギン	
酵素	フェニルケトン尿症	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ	フェニルアラニン	
酵素	原発性高シュウ酸尿症	シュウ酸オキシダーゼ	シュウ酸塩	20
酵素	プロピオン酸血症	プロピオン酸変換酵素?	プロプリオニル coA(Propionyl coA)	
酵素	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠損症	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ	イノシン、dGTP	
酵素	スチュアート・パワー (Stuart-Power)因子欠損症	FX	酵素補充	30
酵素	血栓性血小板減少性紫斑病	ADAMTS13	超大型フォン・ヴィレブランド因子(ULVWF)	
酵素	トランスフェラーゼ欠損性ガラクトース血症(ガラクトース血症 1 型)	ガラクトースデヒドロゲナーゼ	ガラクトース-1-リン酸	
酵素	チロシン血症 1 型	チロシンフェノールリアーゼ	チロシン	
酵素	フォン・ヴィレブランド病	vWF	酵素補充	40
IC クリアランス	IgA 腎症	補体受容体 1	免疫複合体	
IC クリアランス	ループス腎炎	補体受容体 1	免疫複合体	

【表 7 - 6】

IC クリアランス	全身性エリテマトーデス	補体受容体 1	免疫複合体	
感染性	炭疽菌(B. anthracis)感染症	炭疽菌(B. anthracis)表面タンパク質に対する抗体様バインダー	炭疽菌(B. anthracis)	
感染性	ボツリヌス菌(C. botulinum)感染症	ボツリヌス菌(C. botulinum)表面タンパク質に対する抗体様バインダー	ボツリヌス菌(C. botulinum)	10
感染性	C.ディフィシル(C. difficile)感染症	C.ディフィシル(C. difficile)表面タンパク質に対する抗体様バインダー	C.ディフィシル(C. difficile)	
感染性	カンジダ属(Candida)感染症	カンジダ属(Candida)表面タンパク質に対する抗体様バインダー	カンジダ属(Candida)	20
感染性	大腸菌(E. coli)感染症	大腸菌(E. coli)表面タンパク質に対する抗体様バインダー	大腸菌(E. coli)	
感染性	エボラ感染症	エボラ表面タンパク質に対する抗体様バインダー	エボラ	
感染性	B 型肝炎(HBV)感染症	HBV 表面タンパク質に対する抗体様バインダー	HBV	30
感染性	C 型肝炎(HCV)感染症	HCV 表面タンパク質に対する抗体様バインダー	HCV	
感染性	ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症	HIV エンベロープタンパク質又は CD4 又は CCR5 に対する抗体様バインダー又は	HIV	
感染性	結核菌(M. tuberculosis)感染症	結核菌(M. tuberculosis)表面タンパク質に対する抗体様バインダー	結核菌(M. tuberculosis)	40
感染性	マラリア(熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum))感染症	(熱帯熱マラリア原虫 P. falciparum)表面タンパク質に対する抗体様バインダー	熱帯熱マラリア原虫(P. falciparum)	

【表 7 - 7】

脂質	肝性リパーゼ欠損症、 高コレステロール血症	肝性リパーゼ(LIPC)	リポタンパク質、中間 密度(IDL)	
脂質	高 $\alpha$ リポタンパク血症 1	コレステリルエステル転送タン パク質(CETP)	リポタンパク質、高密 度(HDL)	
脂質	高コレステロール血症	低密度リポタンパク質(LDL)、 LDL 受容体に対する抗体様 バインダー	LDL	10
脂質	高コレステロール血症	高密度リポタンパク質(HDL) 又は HDL 受容体に対する抗 体様バインダー	HDL	
脂質	リポタンパク質リパーゼ 欠損症	リポタンパク質リパーゼ	カイロミクロン及び超 低密度リポタンパク質 (VLDL)	20
脂質	リポタンパク質リパーゼ 欠損症、リポタンパク質 代謝障害	リポタンパク質リパーゼ(LPL)	リポタンパク質、超低 密度(VLDL)	
リソソーム内 蓄積	アスパルチルグルコサミ ン尿症(208400)	N-アスパルチルグルコサミニ ダーゼ	糖タンパク質類	
リソソーム内 蓄積	脳髄黄色腫症(コレスタ ノールリビドーシス; 213700)	ステロール 27-ヒドロキシラー ゼ	脂質、コレステロー ル、及び胆汁酸	30
リソソーム内 蓄積	セロイドリポフスチン沈 着症成人型(CLN4、ク ッフス病; 204300)	パルミトイル-タンパク質 チオ エステラーゼ-1	脂肪色素	
リソソーム内 蓄積	セロイドリポフスチン沈 着症乳児型(CLN1、サ ンタブオリ・ハルチア病; 256730)	パルミトイル-タンパク質 チオ エステラーゼ-1	脂肪色素	40

【 0 8 5 1 】

【表 7 - 8】

リソソーム内蓄積	セロイドリポフスチン沈着症若年型(CLN3、バツテン病、フォークト・シユピールマイアー病; 204200)	リソソーム膜貫通 CLN3 タンパク質	脂肪色素	
リソソーム内蓄積	セロイドリポフスチン沈着症乳児後期型 (CLN2、ヤンスキー・ビールショースキー病; 204500)	リソソームペプスタチン非感受性ペプチダーゼ	脂肪色素	10
リソソーム内蓄積	知的障害を伴うセロイドリポフスチン沈着症進行性癲癇(600143)	膜貫通 CLN8 タンパク質	脂肪色素	20
リソソーム内蓄積	セロイドリポフスチン沈着症バリエント乳児後期型(CLN6; 601780)	膜貫通 CLN6 タンパク質	脂肪色素	
リソソーム内蓄積	セロイドリポフスチン沈着症バリエント乳児後期型、フィンランド型 (CLN5; 256731)	リソソーム膜貫通 CLN5 タンパク質	脂肪色素	
リソソーム内蓄積	コレステリルエステル蓄積症(CESD)	リソソーム酸リパーゼ	脂質及びコレステロール	30
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG Ia (専ら神経性及び神経性-多臓器型; 212065)	ホスホマンノムターゼ-2	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG Ib (602579)	マンノース(Man)リン酸(P)イソメラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	40

【 0 8 5 2 】

【表 7 - 9】

リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG Ic (603147)	ドリコ-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-ドリコールグルコシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG Id (601110)	ドリコ-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-ドリコールマンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	10
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG Ie (608799)	ドリコール-P-マンノースシンターゼ	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG If (609180)	マンノース-P-ドリコール利用に関わるタンパク質	N-グリコシル化タンパク質	20
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG Ig (607143)	ドリキル-P-マンノース:Man-7-GlcNAc-2-PP-ドリキル- $\alpha$ -6-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG Ih (608104)	ドリキル-P-グルコース:Glc-1-Man-9-GlcNAc-2-PP-ドリキル- $\alpha$ -3-グルコシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	30
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG Ii (607906)	$\alpha$ -1,3-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG IIa (212066)	マンノシル- $\alpha$ -1,6-糖タンパク質- $\beta$ -1,2-N-アセチルグルコサミン転移酵素	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG IIb (606056)	グルコシダーゼ I	N-グリコシル化タンパク質	40

【 0 8 5 3 】

【表 7 - 1 0】

リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG IIc (ランバン・ハシャロン) (Rambam-Hasharon) 症候群;266265	GDP-フコーストランスポーター-1	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG II d (607091)	$\beta$ -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	10
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG II e (608779)	オリゴマーゴルジ複合体-7	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG II j (608093)	UDP-GlcNAc:ドリキル-P NAcGlc ホスホトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	20
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG II k (608540)	$\beta$ -1,4-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症 CDG II (608776)	$\alpha$ -1,2-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	30
リソソーム内蓄積	先天性 N-グリコシル化異常症、I 型(プレゴルジグリコシル化欠損)	$\alpha$ -1,2-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化タンパク質	
リソソーム内蓄積	シスチン蓄積症	シスチノシン(リソソームシスチントランスポーター)	システイン	
リソソーム内蓄積	ファブリー病(301500)	トリヘキソシルセラミド $\alpha$ -ガラクトシダーゼ	グロボトリアオシルセラミド	
リソソーム内蓄積	ファーバー病(皮下脂肪肉芽腫症; 228000)	セラミダーゼ	脂質	40
リソソーム内蓄積	フコシドーシス(230000)	$\alpha$ -L-フコシダーゼ	フコース及び複合糖類	

【表 7 - 1 1】

リソソーム内蓄積	ガラクトシアリドーシス (ゴールドバーグ症候群、混合型ノイラミニダーゼ及びβ-ガラクトシダーゼ欠損症; 256540)	保護タンパク質/カテプシン A (PPCA)	リソソーム内容物	
リソソーム内蓄積	ゴーシェ病	グルコシルセラミド β-グルコシダーゼ	スフィンゴ脂質	10
リソソーム内蓄積	グルタミルリボース-5-リン酸蓄積症(305920)	ADP-リボースタンパク質ヒドロラーゼ	グルタミルリボース 5-リン酸	
リソソーム内蓄積	糖原病 2 型(ポンペ病)	αグルコシダーゼ	グリコーゲン	
リソソーム内蓄積	GM1 ガングリオシドーシス、全身性	ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	酸性脂質物質、ガングリオシド	20
リソソーム内蓄積	GM2 アクチベータータンパク質欠損症(テイ・サックス病 AB バリエント、GM2A; 272750)	GM2 アクチベータータンパク質	ガングリオシド	
リソソーム内蓄積	GM2 ガングリオシドーシス	ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	ガングリオシド	
リソソーム内蓄積	乳児シアル酸蓄積症(269920)	Na リン酸共輸送体、シアリン	シアル酸	30
リソソーム内蓄積	クラッペ病(245200)	ガラクトシルセラミド β-ガラクトシダーゼ	スフィンゴ脂質	
リソソーム内蓄積	リソソーム酸リパーゼ欠損症(278000)	リソソーム酸リパーゼ	コレステリルエステル及びトリグリセリド	
リソソーム内蓄積	異染性白質ジストロフィー(250100)	アリールスルファターゼ A	スルファチド	
リソソーム内蓄積	ムコリピドーシス ML II (I 細胞病; 252500)	N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ (phosphotransferase) 触媒サブユニット	N 結合型糖タンパク質	40



【表 7 - 1 2】

リソソーム内蓄積	ムコリビドーシス ML III (偽性ハーラー・ポリジストロフィー)	N-アセチルグルコサミニル-1-ホスホトランスフェラーゼ (phosphotransferase)	N 結合型糖タンパク質	
リソソーム内蓄積	ムコリビドーシス ML III (偽性ハーラー・ポリジストロフィー) III 型-A (252600)	触媒サブユニット	N 結合型糖タンパク質	10
リソソーム内蓄積	ムコリビドーシス ML III (偽性ハーラー・ポリジストロフィー) III 型-C (252605)	基質認識サブユニット	N 結合型糖タンパク質	
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS I H/S (ハーラー・シャイエ症候群; 607015)	$\alpha$ -1-イズロニダーゼ	グリコサミノグリカン	20
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS I-H (ハーラー症候群; 607014)	$\alpha$ -1-イズロニダーゼ	グリコサミノグリカン	
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS II (ハンター症候群; 309900)	イズロン酸硫酸スルファターゼ	グリコサミノグリカン	
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群) III-A 型(252900)	ヘパラン-S-硫酸スルファミダーゼ	グリコサミノグリカン	30
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群) III-B 型(252920)	N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ	グリコサミノグリカン	
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群) III-C 型(252930)	アセチル-CoA-グルコサミニド N-アセチルトランスフェラーゼ	グリコサミノグリカン	40
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群) III-D 型(252940)	N-アセチル-グルコサミニン (glucosaminine)-6-硫酸スルファターゼ	グリコサミノグリカン	

【表 7 - 1 3】

リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS I-S (シャイエ症候群; 607016)	$\alpha$ -1-イズロニダーゼ	グリコサミノグリカン	
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS IV (モルキオ症候群) IV-A 型(253000)	ガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼ	グリコサミノグリカン	10
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS IV (モルキオ症候群) IV-B 型(253010)	$\beta$ -ガラクトシダーゼ	グリコサミノグリカン	
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS IX (ヒアルロニダーゼ欠損症; 601492)	ヒアルロニダーゼ欠損症	グリコサミノグリカン	
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS VI (マロトー・ラミー症候群; 253200)	N-アセチルガラクトサミン $\alpha$ -4-硫酸スルファターゼ(アリールスルファターゼ B)	グリコサミノグリカン	20
リソソーム内蓄積	ムコ多糖症 MPS VII (スライ症候群; 253220)	$\beta$ -グルクロニダーゼ	グリコサミノグリカン	
リソソーム内蓄積	ムコスルファチドーシス (多種スルファターゼ欠損症; 272200)	スルファターゼ修飾因子-1	スルファチド	30
リソソーム内蓄積	ニーマン・ピック病 A 型	スフィンゴミエリナーゼ	スフィンゴミエリン	
リソソーム内蓄積	ニーマン・ピック病 B 型	スフィンゴミエリナーゼ	スフィンゴミエリン	
リソソーム内蓄積	ニーマン・ピック病 C1 型/D 型((257220)	NPC1 タンパク質	スフィンゴミエリン	
リソソーム内蓄積	ニーマン・ピック病 C2 型(607625)	精巣上体分泌タンパク質 1 (HE1; NPC2 タンパク質)	スフィンゴミエリン	40
リソソーム内蓄積	プロサポシン欠損症 (176801)	プロサポシン	スフィンゴ脂質	

【表 7 - 1 4】

リソソーム内蓄積	ピクノディスオストーシス (265800)	カテプシン K	キニン	
リソソーム内蓄積	サンドホフ病; 268800	$\beta$ -ヘキソサミニダーゼ B	ガングリオシド	
リソソーム内蓄積	サポシン B 欠損症(スルファチドアクチベーター欠損症)	サポシン B	スフィンゴ脂質	10
リソソーム内蓄積	サポシン C 欠損症(ゴージェアクチベーター欠損症)	サポシン C	スフィンゴ脂質	
リソソーム内蓄積	シンドラー病 I 型(乳児重症型; 609241)	N-アセチルガラクトサミニダーゼ	糖タンパク質類	
リソソーム内蓄積	シンドラー病 II 型(カンザキ病、成人発症型; 609242)	N-アセチルガラクトサミニダーゼ	糖タンパク質類	20
リソソーム内蓄積	シンドラー病 III 型(中間型; 609241)	N-アセチルガラクトサミニダーゼ	糖タンパク質類	
リソソーム内蓄積	シアリドーシス(256550)	ノイラミニダーゼ 1(シアリダーゼ)	ムコ多糖類及びムコ脂質	
リソソーム内蓄積	シアル酸尿症フィンランド型(サラ病; 604369)	Na リン酸共輸送体、シアリン	シアル酸	30
リソソーム内蓄積	シアル酸尿症フランス型 (269921)	UDP-N-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼ/N-アセチルマンノサミンキナーゼ、シアリン	シアル酸	
リソソーム内蓄積	スフィンゴリピドーシス I 型(230500)	ガングリオシド $\beta$ -ガラクトシダーゼ	スフィンゴ脂質	
リソソーム内蓄積	スフィンゴリピドーシス II 型(若年型; 230600)	ガングリオシド $\beta$ -ガラクトシダーゼ	スフィンゴ脂質	40
リソソーム内蓄積	スフィンゴリピドーシス III 型(成人型; 230650)	ガングリオシド $\beta$ -ガラクトシダーゼ	スフィンゴ脂質	
リソソーム内蓄積	テイ・サックス病; 272800	$\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A	ガングリオシド	

【表 7 - 1 5】

リソソーム内蓄積	ウインチェスター症候群 (277950)	メタロプロテイナーゼ-2	ムコ多糖類	
リソソーム内蓄積	ウォルマン病	リソソーム酸リパーゼ	脂質及びコレステロール	
リソソーム内蓄積	$\alpha$ -マンノシドーシス (248500)、I型(重症) 又はII型(軽症)	$\alpha$ -D-マンノシダーゼ	炭水化物及び糖タンパク質類	10
リソソーム内蓄積	$\beta$ -マンノシドーシス (248510)	$\beta$ -D-マンノシダーゼ	炭水化物及び糖タンパク質類	
毒性分子	$\alpha$ 溶血素中毒	$\alpha$ 溶血素に対する抗体様バイ ンダー	$\alpha$ 溶血素	
毒性分子	炭疽毒素中毒	炭疽毒素に対する抗体様バイ ンダー	炭疽毒素	20
毒性分子	細菌毒素誘発性ショック	細菌毒素に対する抗体様バイ ンダー	細菌毒素	
毒性分子	ボツリヌス毒素中毒	ボツリヌス毒素に対する抗体 様バインダー	ボツリヌス毒素	
毒性分子	ヘモクロマトーシス(鉄中 毒)	鉄キレーター	分子鉄	
毒性分子	メタノール中毒	メタノールデヒドロゲナーゼ	メタノール	
毒性分子	神経ガス中毒	ブチリルコリンエステラーゼ	サリン	30
毒性分子	PRP によって引き起こさ れるプリオン病	プリオンタンパク質 PRP に対 する抗体様バインダー	プリオンタンパク質 PRP	
毒性分子	PRPc によって引き起こ されるプリオン病	プリオンタンパク質 PRPc に対 する抗体様バインダー	プリオンタンパク質 PRPc	
毒性分子	PRPsc によって引き起 こされるプリオン病	プリオンタンパク質 PRPsc に 対する抗体様バインダー	プリオンタンパク質 PRPsc	
毒性分子	PRPres によって引き起 こされるプリオン病	プリオンタンパク質 PRPres に 対する抗体様バインダー	プリオンタンパク質 PRPres	40

【 0 8 5 9】

【表 7 - 1 6】

毒性分子	敗血症又はサイトカイン ストーム	サイトカイン又はケモカインの ダッフィ抗原受容体(DARC) に対する抗体様バインダー	サイトカイン
毒性分子	クモ毒中毒	クモ毒に対する抗体様バイ ンダー	クモ毒
毒性分子	ウィルソン病	銅キレーター	分子銅

【 0 8 6 0】

【表 8】

表 8: 補体及び補体調節分子	
可溶性分子	
代替経路	後期成分
B 因子	C5
D 因子	C5a
プロパージン	C6
C3	C7
C3a	C8
C3b	C9
iC3b	
C3c	受容体
C3dg	CR1
C3dk	CR2
C3e	CR3
Bb	CR4
I 因子	C3aR
	C3eR
古典経路	崩壊促進因子(DAF)
C1q	メンブレンコファクタープロテイン(MCP)
C1r	CD59
C1s	C3 β 鎖受容体
C4	同種制限因子
C4a	
C4b	制御タンパク質
C2	C1 インヒビター
C4bp	C4 結合タンパク質
	I 因子
レクチン経路	H 因子
マンノース結合レクチン(MBL)	
MBL 関連セリンプロテアーゼ 1 (MASP1)	
MBL 関連セリンプロテアーゼ 2 (MASP2)	

10

20

30

40

【 図 1 】

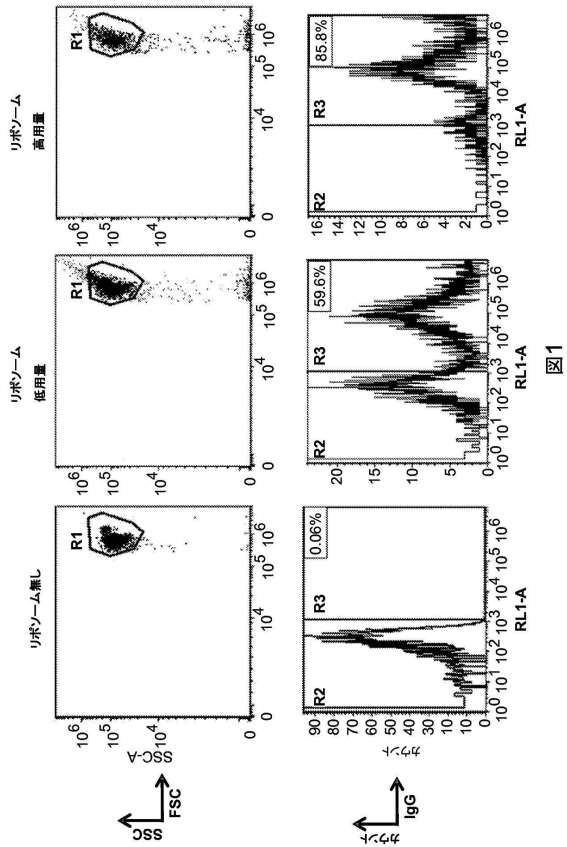


図 1

【 図 2 】

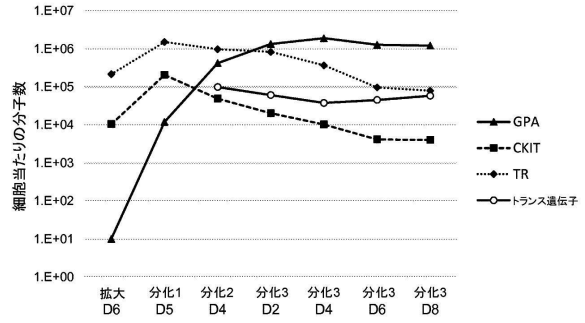
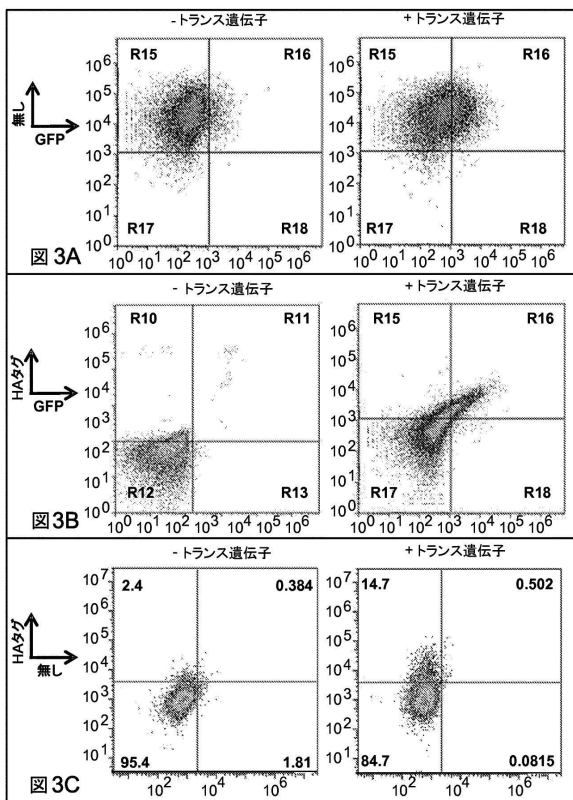
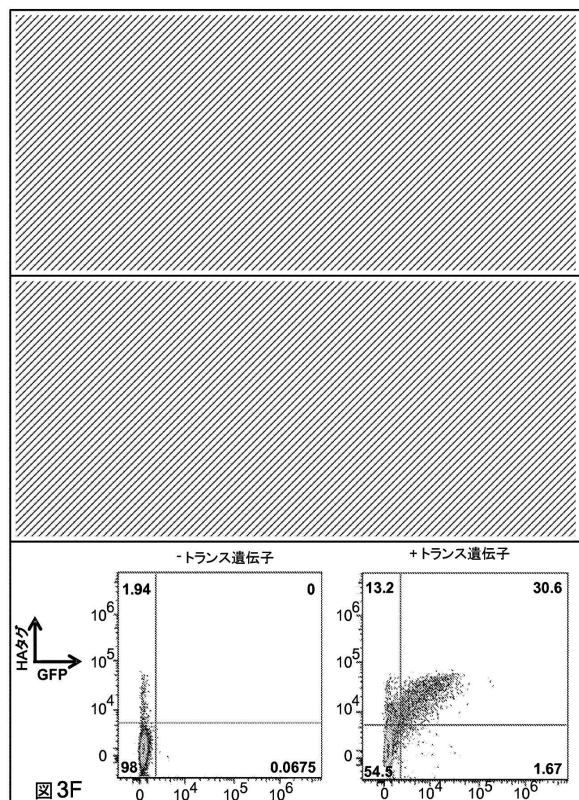


図 2

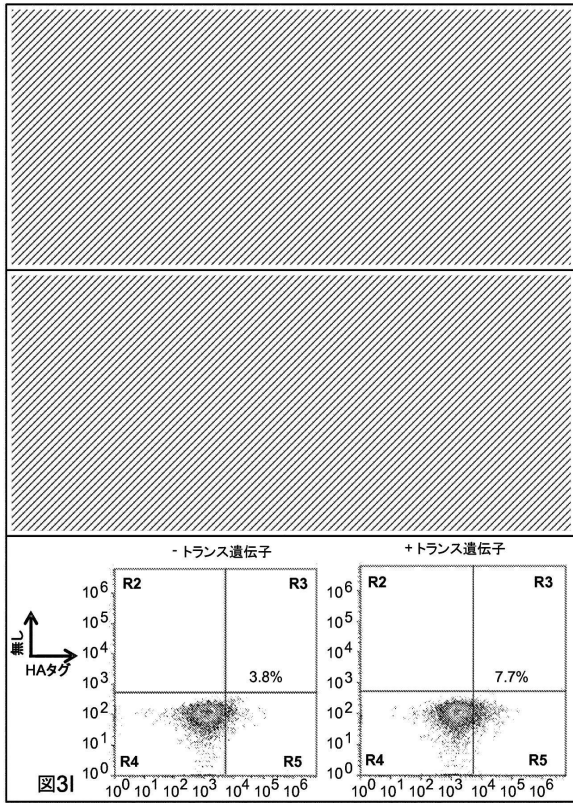
【 図 3 - 1 】



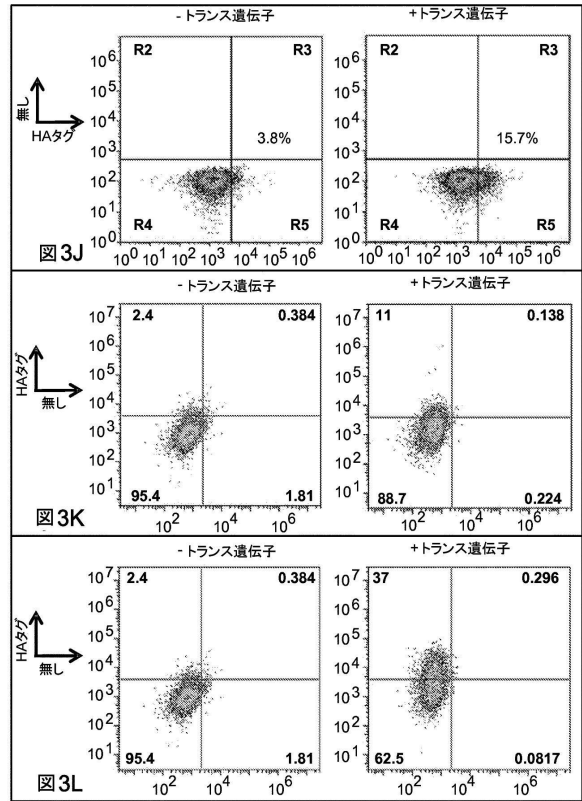
【 図 3 - 2 】



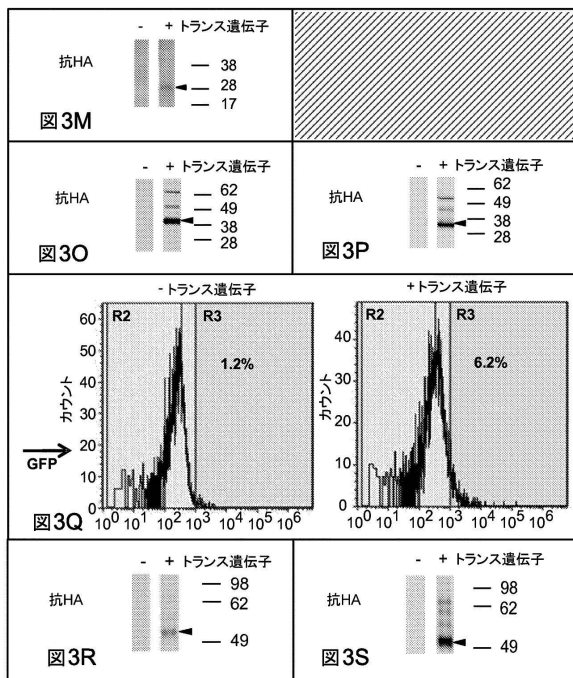
【 図 3 - 3 】



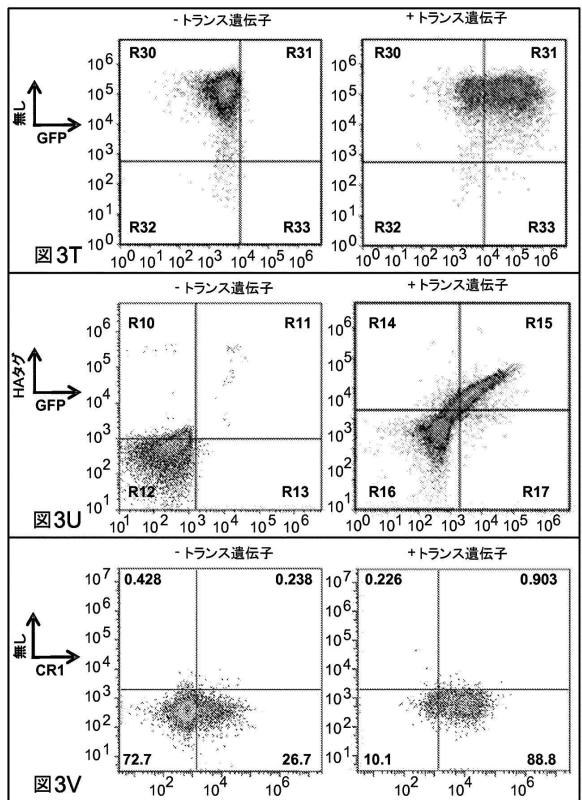
【 図 3 - 4 】



【 図 3 - 5 】

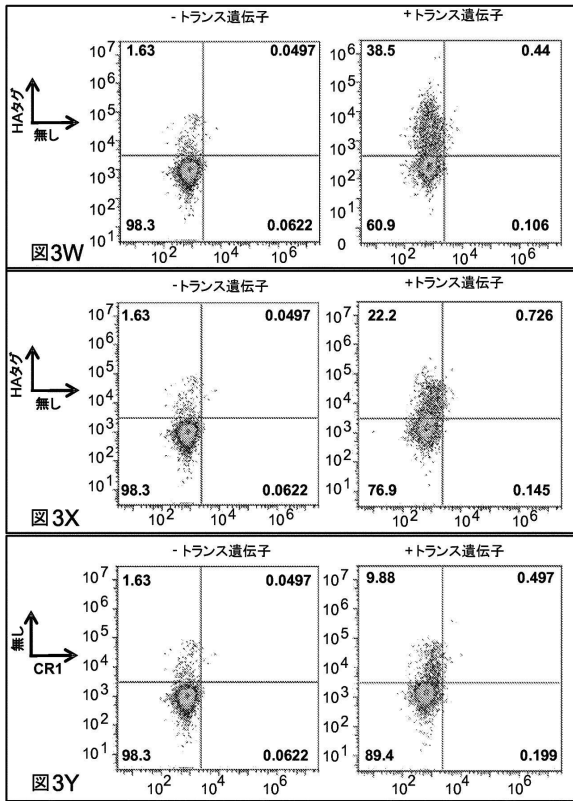


【 図 3 - 6 】

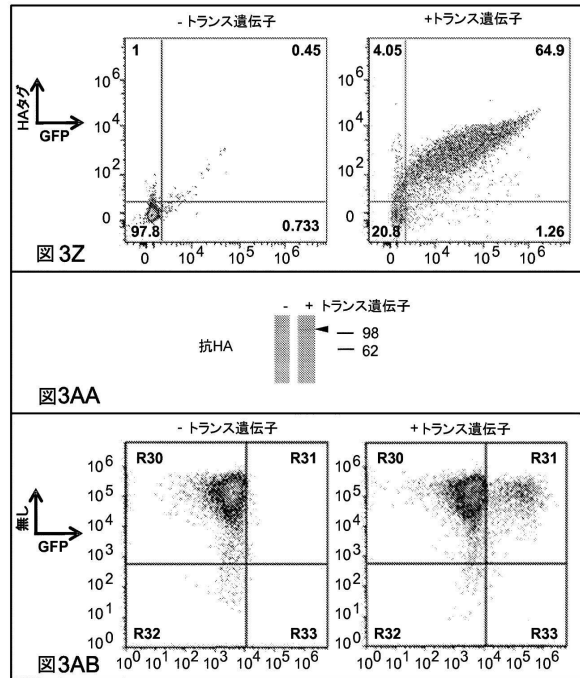




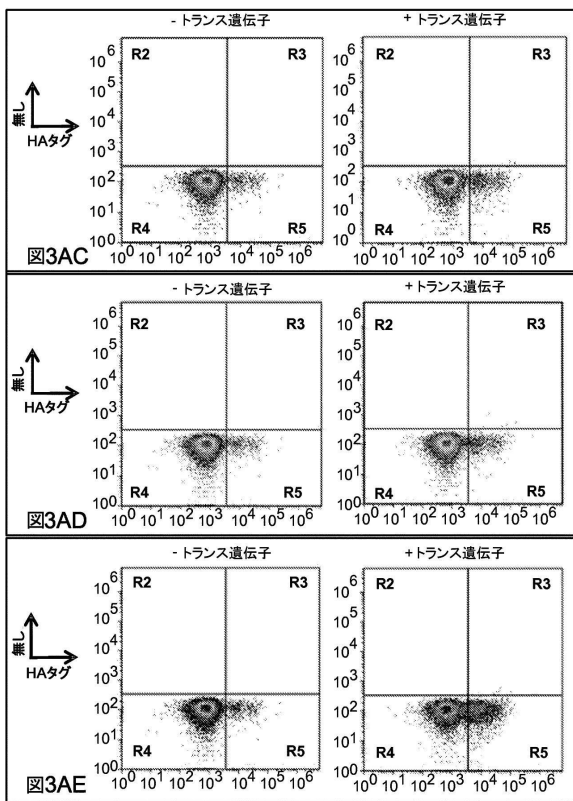
【 図 3 - 7 】



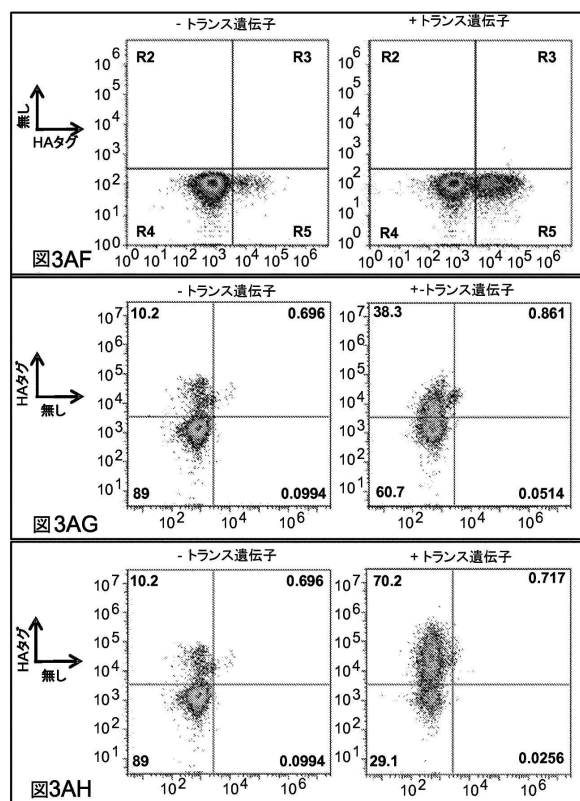
【 図 3 - 8 】



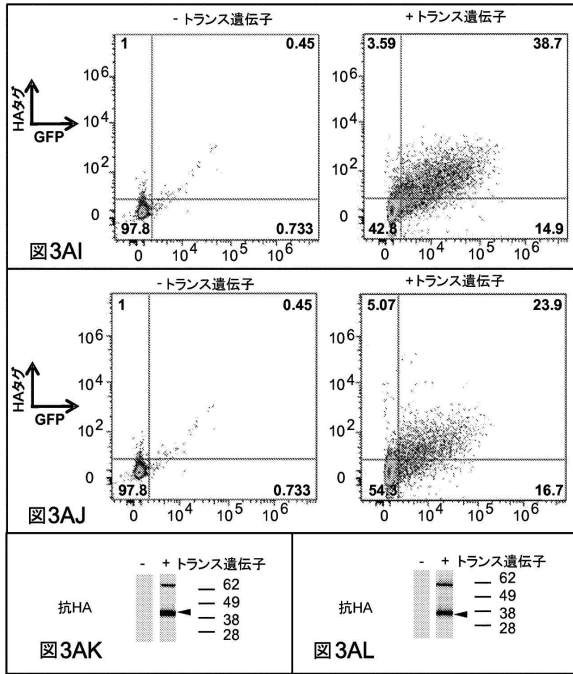
【 図 3 - 9 】



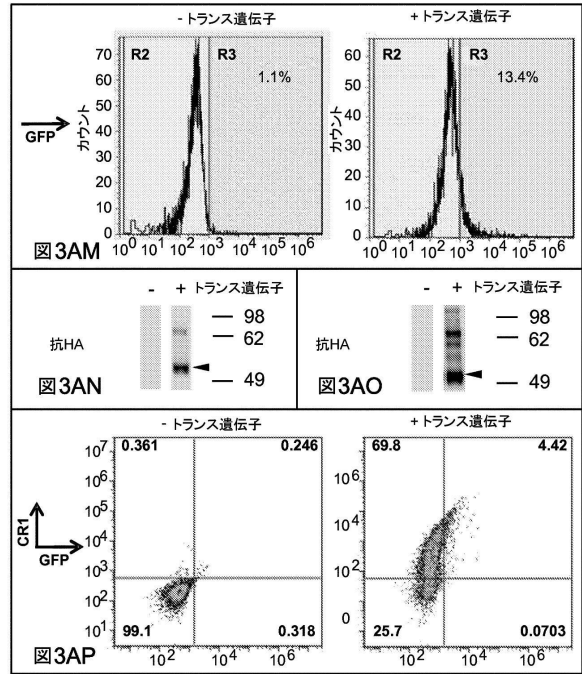
【 図 3 - 10 】



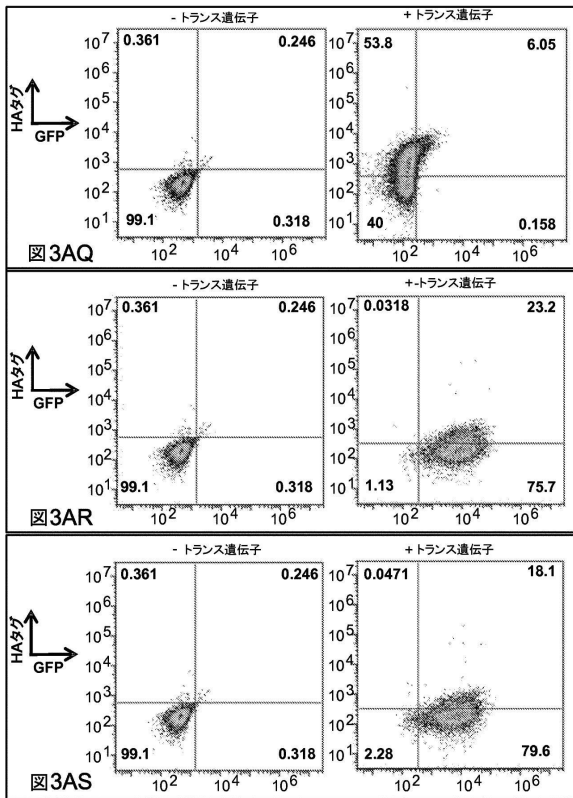
【 図 3 - 1 1 】



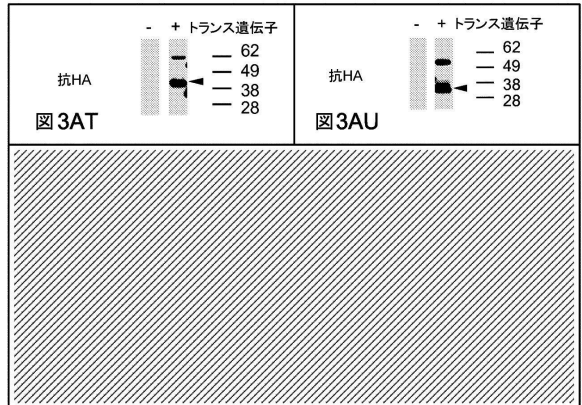
【 図 3 - 1 2 】



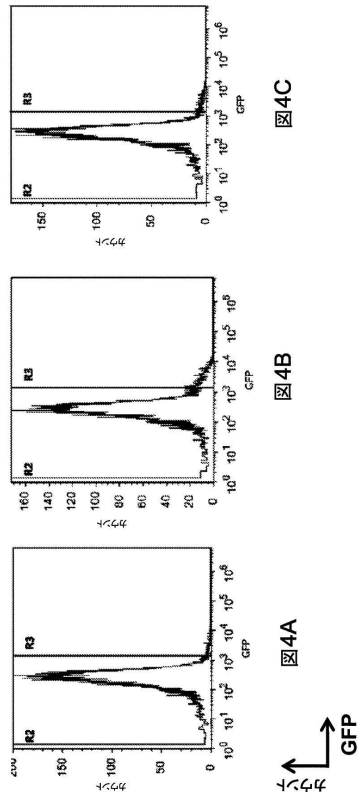
【 図 3 - 1 3 】



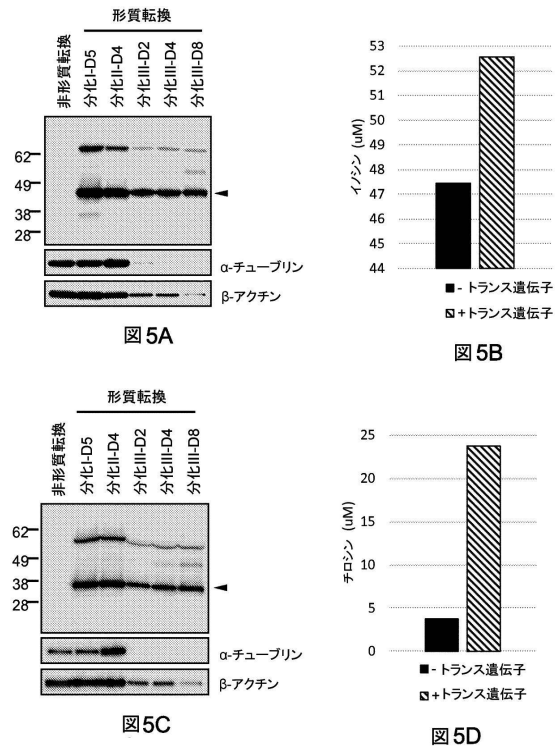
【 図 3 - 1 4 】



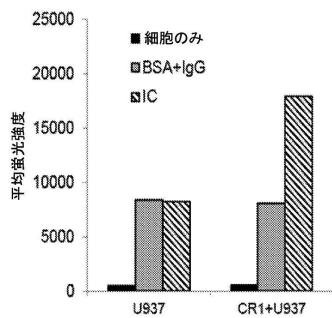
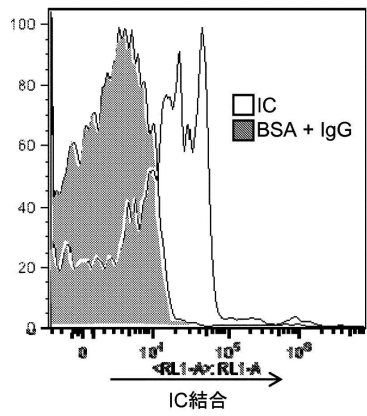
【 図 4 】



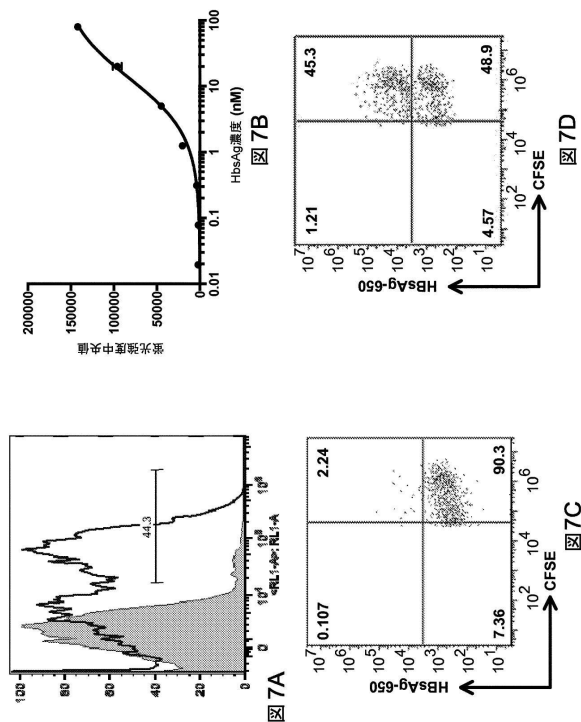
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 - 1 】

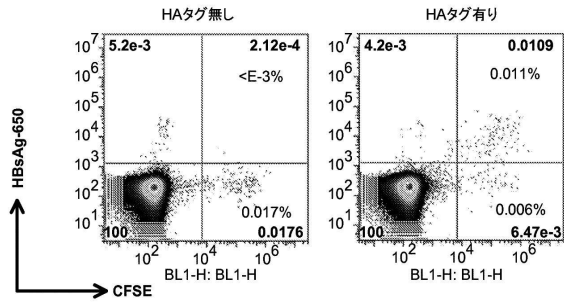


図 8A

【 図 8 - 2 】

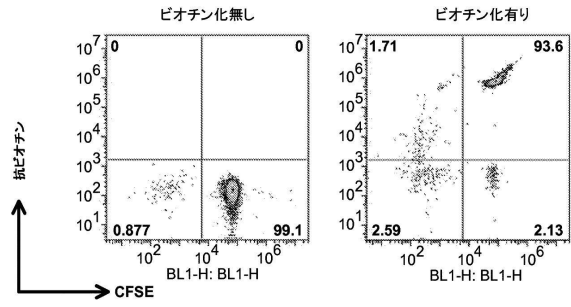


図 8C

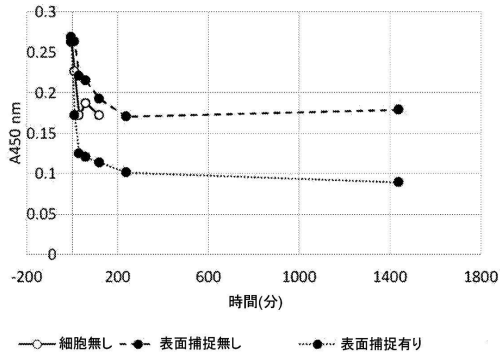


図 8B

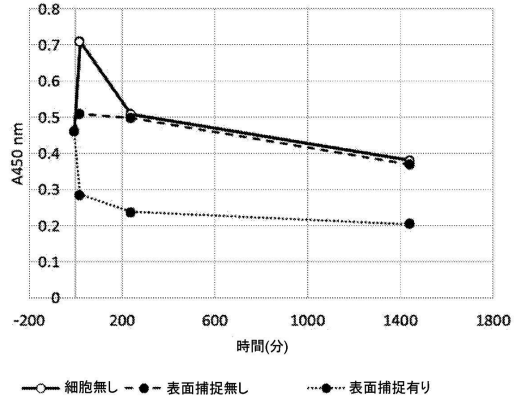


図 8D

【 図 9 】

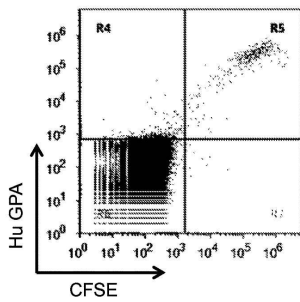


図 9A

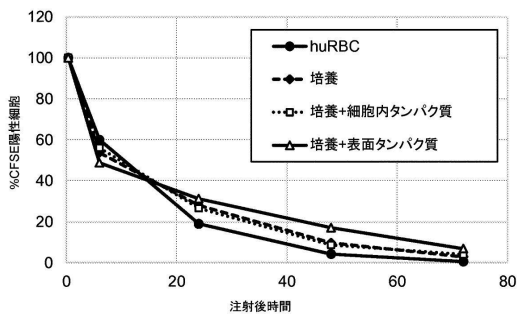


図 9B

【 図 10 】

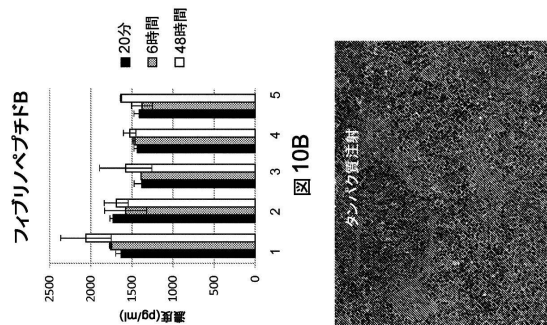


図 10B

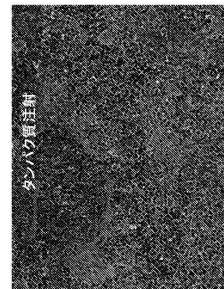


図 10D

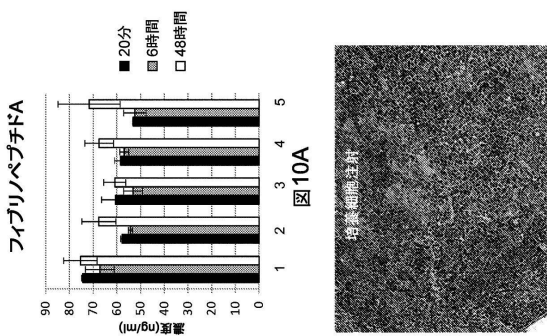


図 10A

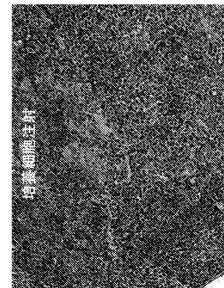


図 10C

【 図 1 1 】

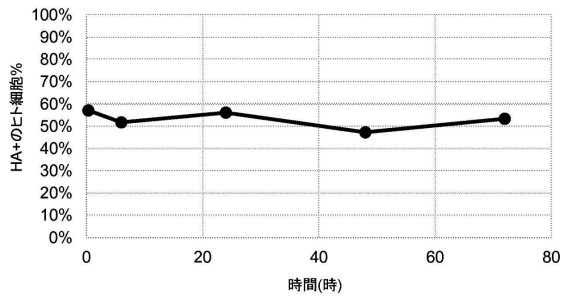


図 11A

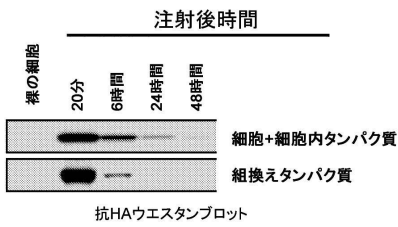


図 11B

【 図 1 2 】

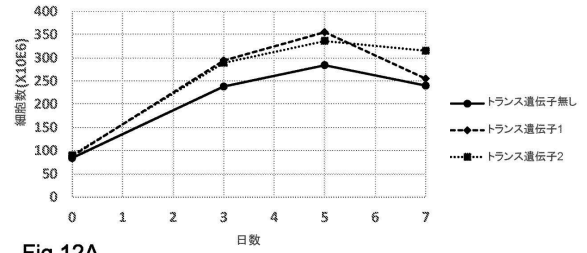


Fig 12A

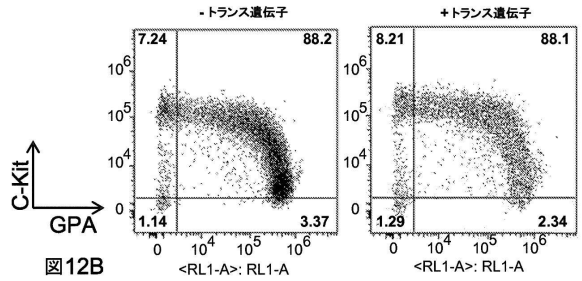


図 12B

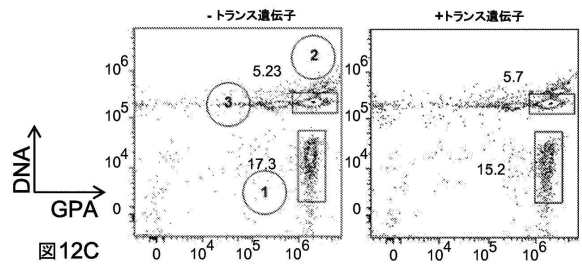


図 12C

【 図 1 3 】

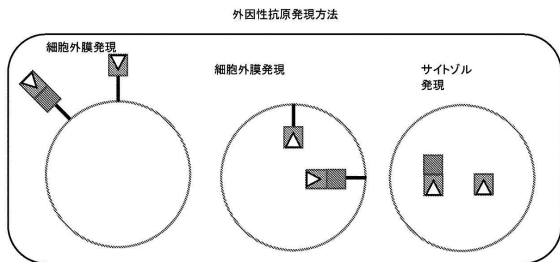


図 13A

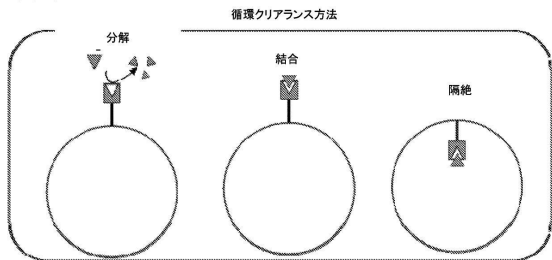


図 13B

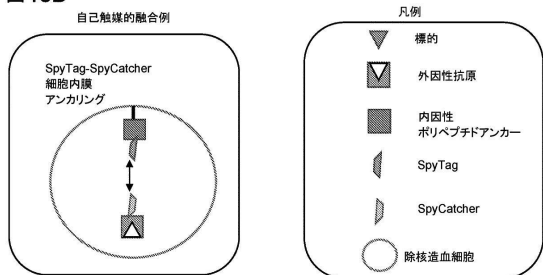


図 13C

**【配列表】**

0006735233000001.app

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 13/12
A 6 1 K 9/10 (2006.01)		A 6 1 K 9/10
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 P 17/00
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/10
C 0 7 K 14/705 (2006.01)		C 0 7 K 14/705
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/09

- (31)優先権主張番号 61/991,319  
(32)優先日 平成26年5月9日(2014.5.9)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/006,825  
(32)優先日 平成26年6月2日(2014.6.2)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/973,763  
(32)優先日 平成26年4月1日(2014.4.1)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US2014/065304  
(32)優先日 平成26年11月12日(2014.11.12)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/059,100  
(32)優先日 平成26年10月2日(2014.10.2)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/973,764  
(32)優先日 平成26年4月1日(2014.4.1)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/025,367  
(32)優先日 平成26年7月16日(2014.7.16)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/006,829  
(32)優先日 平成26年6月2日(2014.6.2)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 マタ - フィンク , ジョルディ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , メモリアル ドライブ 1  
, 7 ティーエイチ フロア , ルビウス セラピューティクス , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ラウンド , ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , メモリアル ドライブ 1

(72)発明者 , 7ティーエイチ フロア, ルビウス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付  
アフエヤン, ノーバー ビー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, メモリアル ドライブ 1  
(72)発明者 , 7ティーエイチ フロア, ルビウス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付  
カーベジアン, アバク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, メモリアル ドライブ 1  
, 7ティーエイチ フロア, ルビウス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

審査官 渡部 正博

(56)参考文献 特表2013-508442(JP,A)

特表2008-501333(JP,A)

米国特許出願公開第2007/0082392(US,A1)

B.P.Malik, et al., Blood, 1998年, Vol.91, No.8, p.2664-2671

Int J Pharm, 2013年, Vol.443, p.39-49

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 35/768

A61K 9/00 - 9/72

A61K 45/00 - 45/08

A61P 1/00 - 43/00

C12N 5/00 - 5/28

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/00 - 14/825

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)