

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6671069号
(P6671069)

(45) 発行日 令和2年3月25日 (2020.3.25)

(24) 登録日 令和2年3月5日 (2020.3.5)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

D

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 17/06 (2006.01)

A 6 1 P 37/02

請求項の数 3 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-126083 (P2018-126083)

(22) 出願日 平成30年7月2日 (2018.7.2)

(62) 分割の表示 特願2015-513481 (P2015-513481)
の分割

原出願日 平成25年10月22日 (2013.10.22)

(65) 公開番号 特開2018-193376 (P2018-193376A)

(43) 公開日 平成30年12月6日 (2018.12.6)

審査請求日 平成30年8月1日 (2018.8.1)

(31) 優先権主張番号 特願2013-89575 (P2013-89575)

(32) 優先日 平成25年4月22日 (2013.4.22)

(33) 優先権主張国・地域又は機関
日本国 (JP)

(73) 特許権者 504137912

国立大学法人 東京大学

東京都文京区本郷七丁目3番1号

(74) 代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74) 代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74) 代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74) 代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(74) 代理人 100152331

弁理士 山田 拓

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患の予防又は治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗TLR9抗体を含む、炎症性疾患の治療又は予防剤。

【請求項 2】

前記炎症性疾患が、自己免疫疾患である、請求項 1 に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤。

【請求項 3】

前記自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス、又は乾癬である、請求項 2 に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Toll様受容体 (Toll-like receptor; TLR) 7又は9に対する抗体を含む、炎症性疾患の予防又は治療剤等に関する。

【背景技術】

【0002】

TLRは病原体センサーの一つのファミリーを形成しており、病原体成分に応答して活性化シグナルを誘導し、感染防御反応を誘導する。TLRは感染防御に重要であるばかりでな

く、自己免疫疾患などの病態における炎症誘導にも関わっている。

【0003】

約10種類のTLRのうちTLR3、TLR7、TLR8及びTLR9は、細胞内小器官である小胞体に分布し、細菌やウイルス由来の核酸を認識する。TLR7とTLR8は1本鎖RNAを認識し、TLR9はCpGモチーフを含む非メチル化1本鎖DNA (CpG-DNA) を認識する。

しかし、ウイルス特有の2本鎖RNAとは異なり、一本鎖RNAやDNAは宿主由来の核酸と大きな違いはなく、TLRによるリガンド認識機構が厳密に制御されなければ、自己に対する反応を惹起し、自己免疫疾患に陥ってしまう。

【0004】

この点、TLR7による自己免疫反応は、核酸を認識する場所をエンドリソソームに限定することによって調節されている（非特許文献1）。定常時、細胞外にある自己の核酸は急速に分解されるため、細胞内のエンドリソソームには到達せず、TLR7には認識されない。一方、微生物核酸は細菌の細胞壁やウイルス粒子に保護されているのでエンドリソソームに到達し、そこで初めて放出され、TLR7に認識される。

これに対し、抗微生物ペプチドや自己抗体との相互作用によって自己の核酸が分解に耐性を有するようになり、エンドリソソームに到達できるようになると、TLR7依存性自己免疫反応が引き起こされる。実際、TLR7については、乾癬や全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus; SLE）との関連が示唆されている（非特許文献2～4）。

【0005】

したがって、TLR7は、乾癬やSLEなどのTLR7依存性自己免疫疾患の治療標的と考えられ、これまでにTLR7の発現や機能を抑制する様々な方法が提案されている。具体的には、TLR7に対して拮抗作用を持つオリゴDNAや、TLR7の発現を抑制するマイクロRNAなどを用いた方法が試みられてきた。しかしながら、一般に核酸医薬の安全性は未知数であり、また、TLR7の機能を完全に抑制すると、感染症などの危険性を招く可能性も否定できない。

安全性及び特異性の面では抗体医薬が望ましいが、上述のとおり、TLR7は、自己免疫反応を制限するためにエンドリソソームに局在し、細胞表面からは隔絶されていると考えられてきたため、細胞表面にのみ作用する抗体は使用できないと考えられており、抗体医薬を使用する試みはこれまでなされなかった。

【0006】

TLR9も、TLR7と同様に乾癬の病態に関わっていることが報告されている（非特許文献2）。

したがって、TLR9も、乾癬やSLEを含む自己免疫疾患の治療標的と考えられてきたが、同様に細胞表面には発現していないと考えられており、抗体医薬を使用する試みはこれまでなされなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Barton, G. et al. and Medzhitov, R. Nat Immunol 7, 49-56. (2006).

【非特許文献2】Lande, R. et al. Nature 449, 564-569 (2007).

【非特許文献3】Christensen, S. R. et al. Immunity 25, 417-428 (2006).

【非特許文献4】Ehlers, M. et al. J Exp Med 203, 553-561 (2006).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、安全性及び特異性の高い、TLR7分子又はTLR9分子を標的とする炎症性疾患の予防又は治療薬を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するために研究を重ねた結果、TLR7及びTLR9は細胞内に局在し細胞表面からは隔絶されているというこれまでの理解に反して、いずれも細胞表面

10

20

30

40

50

にも発現していることを見出した。

そして、抗TLR7抗体が、脾臓由来B細胞、骨髄由来マクロファージ（BM-MCs）、骨髄由来古典的樹状細胞（BM-cDCs）、及び骨髄由来形質細胞様樹状細胞（BM-pDCs）において、TLR7応答を阻害することを確認した。さらに、マウスの炎症性疾患モデルに対して抗TLR7抗体を投与すると、病態が有意に改善されること、抗TLR7抗体がin vivoでTLR7リガンドの投与によって産生される炎症性サイトカインを抑制すること、マウス乾癬モデルにおいても抗TLR7抗体が炎症を抑制することを実証し、これまでのその存在を認識されていなかった細胞表面TLR7及びTLR9が炎症性疾患の標的として有用であることを確認して、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、

〔 1 〕 抗TLR7抗体又は抗TLR9抗体を含む、炎症性疾患の治療又は予防剤；

〔 2 〕 前記抗TLR7抗体が、以下の少なくとも1つを含む、上記〔 1 〕に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤：

(a) 配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

(b) 配列番号： 4 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；

(c) 配列番号： 5 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；

(d) 配列番号： 6 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

(e) 配列番号： 7 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；

(f) 配列番号： 8 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；

(g) 配列番号： 3 ～ 8 のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び

(h) 配列番号： 3 ～ 8 のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR；

〔 3 〕 前記TLR7抗体が、以下のいずれかである、上記〔 1 〕に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤：

(1) 配列番号： 9 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号： 10 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体；

(2) 配列番号： 9 及び / 又は 10 で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び / 又は軽鎖を含む抗体；及び

(3) 配列番号： 9 及び / 又は 10 で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び / 又は軽鎖を含む抗体；

〔 4 〕 前記抗TLR7抗体が、配列番号： 1 で示されるTLR7のアミノ酸配列のうち、27位～457位の領域内に特異的に結合する、上記〔 1 〕に記載の炎症性疾患の治療剤又は予防剤；

〔 5 〕 前記抗TLR7抗体が、配列番号： 1 で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列、又は配列番号： 39 で示されるヒトTLR7のアミノ酸配列の228位～364位の領域内に特異的に結合する、上記〔 1 〕に記載の炎症性疾患の治療剤又は予防剤；

〔 6 〕 前記抗TLR7抗体が、配列番号： 1 で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列、又は配列番号： 39 で示されるヒトTLR7のアミノ酸配列の275位～313位の領域を含む領域に特異的に結合する、上記〔 1 〕に記載の炎症性疾患の治療剤又は予防剤；

〔 7 〕 前記抗TLR7抗体が、配列番号： 1 で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列、又は配列番号： 39 で示されるヒトTLR7のアミノ酸配列の313位～364位の領域を含む領域に特異的に結合する、上記〔 1 〕に記載の炎症性疾患の治療剤又は予防剤。

〔 8 〕 前記抗TLR9抗体が、以下の少なくとも1つを含む、上記〔 1 〕に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤：

(a) 配列番号： 11 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

(b) 配列番号： 12 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；

(c) 配列番号： 13 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；

(d) 配列番号： 14 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

(e) 配列番号： 15 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；

- (f) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；
- (g) 配列番号：11～16のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び
- (h) 配列番号：11～16のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR；
- 〔9〕前記抗TLR9抗体が、以下の少なくとも1つを含む、上記〔1〕に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤：
- (a) 配列番号：17で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
- (b) 配列番号：18で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；
- (c) 配列番号：19で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；
- (d) 配列番号：20で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
- (e) 配列番号：21で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；
- (f) 配列番号：22で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；
- (g) 配列番号：17～22のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び
- (h) 配列番号：17～22のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR；
- 〔10〕前記抗TLR9抗体が、以下の少なくとも1つを含む、上記〔1〕に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤：
- (a) 配列番号：23で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
- (b) 配列番号：24で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；
- (c) 配列番号：25で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；
- (d) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
- (e) 配列番号：27で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；
- (f) 配列番号：28で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；
- (g) 配列番号：23～28のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び
- (h) 配列番号：23～28のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR；
- 〔11〕前記TLR9抗体が、以下のいずれかである、上記〔1〕に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤：
- (1) 配列番号：29で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：30で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体；
- (2) 配列番号：29及び／又は30で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び／又は軽鎖を含む抗体；及び
- (3) 配列番号：29及び／又は30で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び／又は軽鎖を含む抗体；
- 〔12〕前記TLR9抗体が、以下のいずれかである、上記〔1〕に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤：
- (1) 配列番号：31で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：32で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体；
- (2) 配列番号：31及び／又は32で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び／又は軽鎖を含む抗体；及び
- (3) 配列番号：31及び／又は32で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び／又は軽鎖を含む抗体；
- 〔13〕前記TLR9抗体が、以下のいずれかである、上記〔1〕に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤：
- (1) 配列番号：33で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：34で表される

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体、

(2) 配列番号：33及び/又は34で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、及び

(3) 配列番号：33及び/又は34で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体；

〔14〕前記炎症性疾患が、自己免疫疾患である、上記〔1〕から〔13〕のいずれか1項に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤；

〔15〕前記自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス、又は乾癬である、上記〔14〕に記載の炎症性疾患の治療又は予防剤；

〔16〕以下のいずれかの抗TLR7抗体：

(i) 以下の少なくとも1つを含む抗体：(a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；(b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；(c) 配列番号：5で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；(d) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；(e) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；(f) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；(g) 配列番号：3～8のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び(h) 配列番号：3～8のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR；

(ii) 以下のいずれかの抗体：(1) 配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体；(2) 配列番号：9及び/又は10で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体；及び(3) 配列番号：9及び/又は10で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体；

(iii) 配列番号：1で示されるTLR7のアミノ酸配列のうち、27位～457位の領域内に特異的に結合するモノクローナル抗体；

(iv) 配列番号：1で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列、又は配列番号：39で示されるヒトTLR7のアミノ酸配列の228位～364位の領域内に特異的に結合する抗体；

(v) 配列番号：1で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列、又は配列番号：39で示されるヒトTLR7のアミノ酸配列の275位～313位の領域を含む領域に特異的に結合する抗体；又は

(vi) 配列番号：1で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列、又は配列番号：39で示されるヒトTLR7のアミノ酸配列の313位～364位の領域を含む領域に特異的に結合する抗体；及び

〔17〕以下のいずれかのTLR9抗体：

(i) 以下の少なくとも1つを含むモノクローナル抗体：(a) 配列番号：11で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；(b) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；(c) 配列番号：13で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；(d) 配列番号：14で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；(e) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；(f) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；(g) 配列番号：11～16のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び(h) 配列番号：11～16のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR；

(ii) 以下の少なくとも1つを含むモノクローナル抗体：(a) 配列番号：17で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；(b) 配列番号：18で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；(c) 配列番号：19で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；(d) 配列番号：20で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；(e) 配列番号：21で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；(f) 配列番号：22で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；(g) 配列番号：17～22のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失

10

20

30

40

50

、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び(h) 配列番号：17～22のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR；

(iii) 以下の少なくとも1つを含むモノクローナル抗体：(a) 配列番号：23で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；(b) 配列番号：24で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；(c) 配列番号：25で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；(d) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；(e) 配列番号：27で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；(f) 配列番号：28で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；(g) 配列番号：23～28のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び(h) 配列番号：23～28のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR；

10

(iv) 以下のいずれかの抗体：(1) 配列番号：29で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：30で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体；(2) 配列番号：29及び/又は30で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体；及び(3) 配列番号：29及び/又は30で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体；

(v) 以下のいずれかの抗体：(1) 配列番号：31で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：32で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体；(2) 配列番号：31及び/又は32で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体；及び(3) 配列番号：31及び/又は32で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体；

20

(vi) 以下のいずれかの抗体：(1) 配列番号：33で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：34で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体、(2) 配列番号：33及び/又は34で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、及び(3) 配列番号：33及び/又は34で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、に関する。

【発明の効果】

30

【0010】

本発明によれば、細胞表面TLR7又はTLR9の機能を特異的に阻害して、炎症性疾患を予防又は治療することが可能である。本発明に係る炎症性疾患の予防又は治療剤は、抗TLR7抗体又は抗TLR9抗体を有効成分とするので、安全性も高いと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】図1Aは、各種細胞における細胞表面TLR7をフローサイトメトリーで測定した結果である。白色のヒストグラムは、骨髓由来の形質細胞様樹状細胞(BM-pDCs)、古典的樹状細胞(BM-cDCs)、及びマクロファージ(BM-MCs)における細胞表面TLR7を示す。TLR7^{-/-}細胞をネガティブコントロールとして染色した。灰色のヒストグラムは二次試薬のみによる染色を示す。

40

【図1B】図1Bは、野生型及びUnc93b1^{3d/3d}、TLR7^{-/-}のBM-MCsの細胞表面をビオチン化し、抗TLR7抗体で免疫沈降を行い、ストレプトアビジンで細胞表面TLR7を(右)、抗TLR7抗体で内在性TLR7を(左)検出した。TLR7 full lengthは全長TLR7、TLR7Cはプロセッシングを受けた後のC末端側のTLR7フラグメントを、TLR7Nはプロセッシングを受けた後のN末端側のTLR7フラグメントを示す。

【図1C】図1Cは、脾臓由来DCの各サブセットにおける細胞表面TLR7をフローサイトメトリーで測定した結果を示す。白色のヒストグラムは、CD4⁺、CD4⁻CD8⁻、及びCD8⁺の脾臓由来DCに対して行った、抗TLR7抗体による細胞表面染色を示す。DCは、野生型又はUnc93b1^{3d/3d}マウスから調製した。

50

【図2】図2は、TLR7リガンドであるloxoribine又はRNA9.2、又はTLR9リガンドであるCpG-BでBM-MCsを刺激し、IL-6、TNF、RANTESの産生をELISAで測定した結果を示す。結果は、トリプリケートの結果を、平均値と標準偏差で示した。

【図3】図3は、TLR7リガンドであるloxoribine又はRNA9.2、又はTLR9リガンドであるCpG-BでBM-cDCsを刺激し、IL-6、TNF、RANTESの産生をELISAで測定した結果を示す。結果は、トリプリケートの結果を、平均値と標準偏差で示した。

【図4】図4は、TLR7リガンドであるloxoribine又はpolyU、又はTLR9リガンドであるCpG-AでBM-pDCsを刺激し、IFN、IL-12 p40、及びIL-6の産生をELISAで測定した結果を示す。結果は、トリプリケートの結果を、平均値と標準偏差で示した。

【図5】図5は、TLR7リガンドであるImiquimod、TLR9リガンドであるCpG-B、又は抗IgM抗体で脾臓由来B細胞を刺激し、B細胞の増殖をチミジン取り込みで測定した結果を示す。結果は、トリプリケートの結果を、平均値と標準偏差で示した。

【図6A】図6Aは、Unc93b1^{3d/3d}マウスに200 µgの抗TLR7抗体又はコントロール抗体を週1回投与し、末梢血の血小板を1週おきに測定した結果を示す。抗体を10回投与した前後の血小板の測定値を示す。各群7匹のマウスとした。*; p<0.01

【図6B】図6Bは、抗TLR7抗体又はコントロール抗体で10週間処理した後、マウスを犠死させ、フローサイトメトリーで脾臓赤芽球の割合を調べた結果を示す。

【図6C】図6Cは、抗TLR7抗体又はコントロール抗体で10週間処理した後、マウスを犠死させ、フローサイトメトリーでCD4⁺メモリーT細胞の割合を調べた結果を示す。

【図6D】図6Dは、抗TLR7抗体又はコントロール抗体で10週間処理した後、マウスを犠死させ、フローサイトメトリーでCD4⁺T細胞のICOSの発現を調べた結果を示す。

【図7A】図7Aは、マウスTLR3、7、8、9又はヒトTLR9を発現するBa/F3細胞に対し、図示された抗TLR9抗体又は抗flag抗体で膜透過性染色を行った結果を示す。TLR9は、C末端をflagエピトープで標識した。

【図7B】図7Bは、B細胞リンパ腫株M12 (lane 1) 又はPRAT4AノックダウンM12 (lane 2) でTLR9-GFPを発現させ、免疫沈降し、抗GFP抗体で検出した結果を示す。TLR9Fは全長TLR9、TLR9Cはプロセッシングを受けた後のC末端側のTLR9フラグメントを示す。*は非特異的なバンドを示す。

【図7C】図7Cは、TLR9CのN末端アミノ酸配列解析で判明した、同フラグメントのN末端アミノ酸を矢印で示す。対応するヒトTLR9アミノ酸配列も示した。

【図7D】図7Dは、TLR9エクストドメインにおける切断部位を示す概念図である。LRRはロイシンリッチリピートを示す。

【図7E】HAエピトープ、TLR9エクストドメイン (TLR9F、TLR9N、又はTLR9C)、及び膜透過部位を発現するBa/F3細胞を作製し、抗TLR9抗体又は抗HAエピトープ抗体による膜透過性染色に供した結果を示す。黒色のヒストグラムは、二次試薬のみで染色した結果を示す。実験は3回繰り返し、代表的なデータを示した。

【図8A】図8Aは、TLR9のみ、又はTLR9とUnc93B1を発現するBa/F3細胞を、3種類の抗TLR9モノクローナル抗体 (C34A1、B33A4、およびJ15A7) で染色した結果を示す。上段は細胞表面の染色を示し、下段は膜透過性染色を示す。

【図8B】図8Bは、野生型マウス、Unc93B1^{3d/3d}マウス、又はTlr9^{-/-}マウス由来の脾臓細胞を、抗TLR9モノクローナル抗体J15A7と、図示されたDCマーカーに対するmAbを用いて染色した。灰色のヒストグラムは、二次試薬による染色を示す。実験は2回繰り返し、代表的なデータを示した。

【図9A】図9Aは、TLR7エクストドメインにおける切断部位を示す概念図である。LRRはロイシンリッチリピートを示す。

【図9B】図9Bは、A94B10抗体の、TLR7N、TLR7C、TLR7Fへの結合を調べた結果を示す。

【図10】図10は、マウスにA94B10抗体を投与するとともに、TLR7リガンドであるR848を投与して炎症性サイトカイン産生を誘導し、A94B10抗体による炎症性サイトカイン産生の抑制を調べた結果を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 1】図 1 1 は、マウスにA94B10抗体を投与するとともに、TLR7リガンドであるImiquimodをマウスの耳に投与して皮膚の炎症を誘導し、A94B10抗体による炎症の抑制を調べた結果を示す。

【図 1 2】図 1 2 は、IL-23をマウスの耳に投与して乾癬モデルマウスを作製するとともに、A94B10抗体を投与し、A94B10抗体による炎症の抑制を調べた結果を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、TLR7の断片を作製し、その断片に対するA94B10抗体の結合を調べることによってA94B10抗体のエピトープを解析した結果を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、マウスTLR7とヒトTLR7のキメラTLR7を作製し、キメラTLR7に対するA94B10抗体の結合を調べることによってA94B10抗体のエピトープを解析した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

10

【0012】

〔炎症性疾患の治療又は予防剤〕

本発明に係る炎症性疾患の治療又は予防剤は、抗TLR7抗体又は抗TLR9抗体を含む。

【0013】

TLRはマウスでは12種類、ヒトでは10種類のファミリーが知られている。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6は細胞表面に分布し、細菌膜成分であるリポタンパク質、LPSなどの糖脂質、フラジェリンなどのタンパク質を認識する。TLR3、TLR7、TLR8、TLR9は細胞内小器官である小胞体に分布し、細菌やウイルス由来の核酸を認識する。

TLRはI型の膜タンパク質で細胞外にLeucine rich repeat(LRR)を有する。病原体成分を認識すると、細胞内のToll/IL-1R homology(TIR)ドメインによりシグナル伝達を行う。リガンドを認識したTLRはTIRドメインを介したシグナルを細胞内へ伝えることにより、最終的にNF- κ BやInterferon-Regulatory Factor(IRF)ファミリーなどの転写因子を活性化させ、炎症性サイトカイン(IL-6やIL-12、TNF など)や炎症性ケモカイン(RANTESなど)、I型インターフェロン(IFN α やIFN β)の産生を誘導し、局所において適切な自然免疫応答を引き起こす。これらのTLRを介した免疫応答は生体防御において必要不可欠であり、TLR応答に関連する分子が欠損すると、様々な病原体に感染し易くなることが報告されている。しかし、何らかの原因で、自己に由来する物質がTLRの内因性リガンドとなると、慢性的な炎症を引き起こす可能性が指摘されている。

20

【0014】

実際、TLR7は、SLEや乾癬の発症に関与することが知られている。

30

抗TLR7抗体は、後述する実施例に示すとおり、細胞表面TLR7に結合し、当該細胞のTLR7応答を阻害することにより、免疫の異常な活性化を防いで炎症性疾患の治療又は予防に寄与する。TLR7は、配列番号：1に示すアミノ酸配列を有するI型の膜タンパク質である。

【0015】

TLR9は、もTLR7と同様に乾癬の病態に関与することが知られる。従って、抗TLR9抗体は、細胞表面TLR9に結合し、当該細胞のTLR9応答を阻害することにより、免疫の異常な活性化を防いで炎症性疾患の治療又は予防に寄与すると考えられる。

TLR9は、配列番号：2に示すアミノ酸配列を有するI型の膜タンパク質である。

【0016】

(抗TLR7抗体)

40

【0017】

また、本発明に用いられる抗TLR7抗体の一態様は、以下のCDRのうち少なくとも1つを含む。

- (a) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；
- (b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；
- (c) 配列番号：5で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；
- (d) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
- (e) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；
- (f) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；
- (g) 配列番号：3～8のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、

50

置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び

(h) 配列番号：3～8のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR。

【0018】

本発明に用いられる抗TLR7抗体は、上記(a)～(f)の重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のうち、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又はすべてを含む抗体であってもよい。

配列番号：3～8で表されるアミノ酸配列からなるCDRを有する抗体は、実施例に示されるとおり、免疫細胞におけるTLR7応答を阻害し、マウスの炎症性疾患モデルの病態を改善させる。

【0019】

本発明に用いられる抗TLR7抗体は、上記(a)～(f)の重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3の少なくとも1つが、そのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するものであってもよい。

本明細書において用語「アミノ酸」は、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸のみならずアミノ酸変異体及び誘導体といったような非天然アミノ酸を含む。アミノ酸の例としては、天然タンパク質性L-アミノ酸；D-アミノ酸；アミノ酸変異体及び誘導体などの化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、 α -アラニン、オルニチンなどの天然非タンパク質性アミノ酸；及びアミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物などが挙げられるがこれらに限定されない。非天然アミノ酸の例としては、 β -メチルアミノ酸（ β -メチルアラニンなど）、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（2-アミノ-ヒスチジン、 β -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、 β -フルオロメチル-ヒスチジン及び β -メチル-ヒスチジンなど）、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）及び側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸など）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0020】

本明細書において、「1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有する」という場合、欠失、置換等されるアミノ酸の個数は、結果として得られるCDRのセットが抗原認識機能を保持する限り特に限定されない。各CDRにおける欠失、置換又は付加の位置は、結果として得られるCDRのセットが抗原認識機能を保持する限り、N末端でも、C末端でも、その中間であってもよい。

【0021】

本発明に用いられる抗TLR7抗体は、上記(a)～(f)の重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3の少なくとも1つが、配列番号：3～8に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるものであってもよい。

本明細書において、「配列番号：Xに示すアミノ酸配列に対してY%以上の同一性を有する」とは、2つのポリペプチドのアミノ酸配列の一致が最大になるように整列（アライメント）させたときに、共通するアミノ酸残基数の、配列番号：Xに示す全アミノ酸数に対する割合が、Y%以上であることを意味する。

本発明に用いられる抗TLR7抗体においては、結果として得られるCDRのセットが抗TLR7抗体のCDRとしての機能を保持する限り、配列番号：3～8に示されるアミノ酸配列と90%以上、95%以上、98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるものとすることができる。

【0022】

本発明に用いられる抗TLR7抗体は、以下のいずれかであってもよい。

(1) 配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体、

(2) 配列番号：9及び/又は10で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、

(3) 配列番号：9及び/又は10で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有する

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を重鎖及び／又は軽鎖を含む抗体。及び

(4) 上記(1)から(3)のいずれかの抗体と同じエピトープを認識する抗体

【0023】

本明細書において、「配列番号：9及び／又は10で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び／又は軽鎖を含む抗体」という場合、重鎖が配列番号：9で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有する配列からなること、及び／又は、軽鎖が配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有する配列からなることを意味する。欠失、置換又は付加する個数は、結果として得られる重鎖と軽鎖を含む抗体が、TLR9に特異的に結合する限り特に限定されず、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個とすることができる。欠失、置換又は付加する位置も、結果として得られる重鎖と軽鎖を含む抗体が、TLR9に特異的に結合する限り特に限定されない。後述する配列番号：29～34についても同様である。

10

【0024】

本明細書において、「配列番号：29及び／又は30で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び／又は軽鎖を含む抗体」という場合、重鎖が配列番号：29で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有すること、及び／又は、軽鎖が配列番号：30で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有することを意味する。同一性は、結果として得られる重鎖と軽鎖を含む抗体が、TLR9に特異的に結合する限り特に限定されないが、例えば、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上とすることができる。後述する配列番号：29～34についても同様である。

20

【0025】

配列番号：9で表されるアミノ酸配列は、後述する実施例に示されるA94B10抗体の重鎖のアミノ酸配列であり、配列番号：10で表されるアミノ酸配列は、A94B10抗体の軽鎖のアミノ酸配列である。

したがって、上記(1)～(4)で示される抗体は、A94B10抗体と同様に、免疫細胞におけるTLR7応答を阻害すると考えられる。

【0026】

本発明に用いられる抗TLR7抗体は、配列番号：1で示されるTLR7のアミノ酸配列のうち、27位～457位の領域内（以下「TLR7N」と呼ぶ場合もある。）に結合するものとしてもよい。実施例に示されるとおり、この領域に結合する抗TLR7抗体は、免疫細胞におけるTLR7応答を阻害する。

30

【0027】

本発明に用いられる抗TLR7抗体は、配列番号：1で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列のうち、228位～364位の領域内（以下「TLR7N」と呼ぶ場合もある。）に結合するものとしてもよい。実施例に示されるとおり、この領域に結合する抗TLR7抗体は、免疫細胞におけるTLR7応答を阻害する。

【0028】

本発明に用いられる抗TLR7抗体は、配列番号：1で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列のうち、275位～313位の領域を含む領域に結合するものとしてもよい。実施例に示されるとおり、この領域に結合する抗TLR7抗体は、免疫細胞におけるTLR7応答を阻害する。

40

配列番号：1で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列のうち275位～313位の領域を含む領域としては、例えば、275位～313位の領域を含む120アミノ酸以下の領域、110アミノ酸以下の領域、100アミノ酸以下の領域、90アミノ酸以下の領域とすることができる。

【0029】

本発明に用いられる抗TLR7抗体は、配列番号：1で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列のうち、313位～364位の領域を含む領域に結合するものとしてもよい。実施例に示されるとおり、この領域に結合する抗TLR7抗体は、免疫細胞におけるTLR7応答を阻害する。

配列番号：1で示されるマウスTLR7のアミノ酸配列のうち313位～364位の領域を含む領

50

域としては、例えば、313位～364位の領域を含む120アミノ酸以下の領域、110アミノ酸以下の領域、100アミノ酸以下の領域、90アミノ酸以下の領域、80アミノ酸以下の領域、70アミノ酸以下の領域、60アミノ酸以下の領域、とすることができる。

【0030】

また、本発明に用いられる抗TLR7抗体は、配列番号：39で示されるヒトTLR7のアミノ酸配列のうち、228位～364位の領域内に結合するものとしてもよい。本発明に用いられる抗TLR7抗体は、配列番号：39で示されるヒトTLR7のアミノ酸配列のうち、275位～313位の領域を含む領域に結合するものとしてもよい。本発明に用いられる抗TLR7抗体は、配列番号：39で示されるヒトTLR7のアミノ酸配列のうち、313位～364位の領域を含む領域に結合するものとしてもよい。ヒトTLR7とマウスTLR7は配列同一性が高いことが知られている。

10

【0031】

(抗TLR9抗体)

【0032】

以下、抗TLR9抗体の説明において、抗TLR7抗体の説明にも用いられた表現及び用語は、特に断りがない限り、抗TLR7抗体の説明と同義で用いられる。

【0033】

また、本発明に用いられる抗TLR9抗体は、以下のCDRのうち少なくとも1つを含むものであってもよい。

(a) 配列番号：11で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

20

(b) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；

(c) 配列番号：13で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；

(d) 配列番号：14で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

(e) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；

(f) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；

(g) 配列番号：11～16のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び

(h) 配列番号：11～16のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR。

上記(a)～(f)のCDRは、実施例に示されるJ15A7抗体の6つのCDRである。

30

【0034】

また、本発明に用いられる抗TLR9抗体は、以下のCDRのうち少なくとも1つを含むものであってもよい。

(a) 配列番号：17で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

(b) 配列番号：18で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；

(c) 配列番号：19で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；

(d) 配列番号：20で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；

(e) 配列番号：21で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；

(f) 配列番号：22で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；

(g) 配列番号：17～22のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び

40

(h) 配列番号：17～22のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR。

上記(a)～(f)のCDRは、実施例に示されるB33A4抗体の6つのCDRである。

【0035】

また、本発明に用いられる抗TLR9抗体は、以下のCDRのうち少なくとも1つを含むものであってもよい。

(a) 配列番号：23で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR1；

(b) 配列番号：24で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；

(c) 配列番号：25で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；

50

- (d) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；
- (e) 配列番号：27で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；
- (f) 配列番号：28で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3；
- (g) 配列番号：23～28のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR；及び
- (h) 配列番号：23～28のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR。

上記(a)～(f)のCDRは、実施例に示されるC34A1抗体の6つのCDRである。

【0036】

本発明に用いられる抗TLR9抗体は、細胞表面抗TLR9に結合する限り、以下のいずれかであってよい。

(1) 配列番号：29で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：30で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体、

(2) 配列番号：29及び/又は30で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、及び

(3) 配列番号：29及び/又は30で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、及び

(4) 上記(1)から(3)のいずれかの抗体と同じエピトープを認識する抗体。

配列番号：29で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：30で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体は、J15A7抗体である。

【0037】

本発明に用いられる抗TLR9抗体は、細胞表面抗TLR9に結合する限り、以下のいずれかであってよい。

(1) 配列番号：31で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：32で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体、

(2) 配列番号：31及び/又は32で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、及び

(3) 配列番号：31及び/又は32で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、及び

(4) 上記(1)から(3)のいずれかの抗体と同じエピトープを認識する抗体。

配列番号：31で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：32で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体は、B33A4抗体である。

【0038】

本発明に用いられる抗TLR9抗体は、細胞表面抗TLR9に結合する限り、以下のいずれかであってよい。

(1) 配列番号：33で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：34で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む抗体、

(2) 配列番号：33及び/又は34で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列を含む重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、及び

(3) 配列番号：33及び/又は34で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を重鎖及び/又は軽鎖を含む抗体、及び

(4) 上記(1)から(3)のいずれかの抗体と同じエピトープを認識する抗体。

配列番号：33で表されるアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号：34で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体は、C34A1抗体である。

【0039】

本発明に用いられる抗TLR7抗体及び抗TLR9抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。また、本発明に用いられる抗TLR7抗体、及び抗TLR9抗体

10

20

30

40

50

は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEのいずれのアイソタイプであってもよい。

【0040】

本発明に用いられる抗TLR7抗体及び抗TLR9抗体は、細胞表面TLR7及びTLR9にそれぞれ結合してその機能を阻害する限り、マウス抗体、ヒト型CDR移植抗体、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体であってもよく、低分子抗体であってもよいが、これらに限定されない。

【0041】

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のCDRを、ヒト抗体のCDRで置換した抗体である。ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体に由来する可変領域と、ヒト抗体に由来する定常領域からなる抗体である。また、ヒト化抗体とは、ヒト以外の動物の抗体において、安全性の高い一部の領域を残して、ヒトの抗体に由来する部分を組み込んだものをいい、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体を含む概念である。

10

【0042】

本明細書において「低分子抗体」とは、抗体の断片又は抗体の断片に任意の分子を結合させたものであって、もとの抗体と同一のエピトープを認識するものを意味する。具体的には、VL、VH、CL及びCH1領域からなるFab；2つのFabがヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結されているF(ab')₂；VL及びVHからなるFv；VL及びVHを人工のポリペプチドリinkerで連結した一本鎖抗体であるscFvのほか、sdFv、Diabody、sc(Fv)₂が挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

20

〔抗体〕

本発明は、上述した炎症性疾患の治療剤又は予防剤に含まれる抗TLR7抗体又は抗TLR9抗体自体も提供するものである。

【0044】

〔抗体の作製方法〕

本発明で用いられる抗TLR7抗体又は抗TLR9抗体の作製方法は限定されないが、例えば、抗TLR7モノクローナル抗体は、TLR7又はその断片で免疫した非ヒト哺乳動物から抗体産生細胞を単離し、これを骨髓腫細胞等と融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマが産生した抗体を精製することによって得ることができる。また、抗TLR7ポリクローナル抗体は、TLR7はその断片で免疫した動物の血清から得ることができる。免疫に用いるTLR7の断片は、得られる抗体が細胞表面TLR7に結合してその機能を阻害する限り特に限定されないが、例えば、配列番号：1の27位～457位アミノ酸のTLR7断片が挙げられる。

30

抗TLR9モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体も同様に作製することができる。

【0045】

特定のアミノ酸配列を有する抗TLR7抗体を作製する場合は、例えば、抗TLR7抗体をコードする核酸を含む発現ベクターで適当な宿主を形質転換し、この形質転換体を適当な条件で培養して抗体を発現させ、公知の方法に従って単離精製することによって、抗TLR7抗体を作製することができる。単離精製方法としては、例えば、プロテインA等を用いたアフィニティカラム、その他のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析が挙げられ、これらを適宜組み合わせることができる。抗TLR9抗体も同様に作製することができる。

40

【0046】

また、「ある抗体Xと同一のエピトープに特異的に結合する抗体Y」は、次のようにエピトープの配列を決定してから作製することができる。

例えば、多数のランダムな配列のペプチドを固相担体に固定してアレイ化し、抗体Xと反応させ、酵素標識2次抗体で結合を検出して、抗体Xが特異的に結合するペプチドのアミノ酸配列を調べ、このアミノ酸配列と抗原タンパク質のアミノ酸配列の相同性を検索することによって、抗原タンパク質上のエピトープを決定することが可能である。固相担体に固定するペプチドを、予め、抗原タンパク質の部分ペプチド群としてもよい。

また、抗原タンパク質の種々の部分ペプチドの存在下で、抗体Xと抗原タンパク質との

50

結合をELISA法で検出し、競合活性の有無を調べることによって、抗原タンパク質上のエピトープを決定することが可能である。

エピトープの配列を決定することができれば、これに特異的に結合する抗体Yは、公知の方法にしたがって当業者が作製することができる。例えば、エピトープ配列を含むペプチドを固相担体に固定し、当該ペプチドと種々の抗体の結合を検出することにより、同エピトープに特異的に結合する抗体を得ることができる。

ここで、「種々の抗体」としては、動物を抗原タンパク質又はその部分ペプチドで免疫することによって得たものを用いてもよいし、ファージディスプレイ法によって作製した抗体ライブラリ又は抗体フラグメントライブラリを用いてもよい。ファージディスプレイ法によるライブラリを用いる場合、エピトープ配列を含むペプチドを固相担体に固定しパニングを繰り返すことによって、同エピトープに特異的に結合する抗体Yを得ることもできる。

【0047】

また、ヒトキメラ抗体及びヒトCDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体を産生するハイブリドーマのmRNAから抗体遺伝子をクローン化し、これをヒト抗体遺伝子の一部と遺伝子組換え技術で連結することによって作製することができる。

例えば、ヒト型キメラ抗体の場合、マウス抗体を産生するハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素によりcDNAを合成し、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(LH)をPCRでクローニングして配列を解析する。次に、一致率の高い抗体塩基配列から、リーダー配列を含む5'プライマーを作製し、5'プライマーと可変部3'プライマーによって上記cDNAから、シグナル配列から可変領域の3'末端までをPCRでクローニングする。一方で、ヒトIgG1の重鎖及び軽鎖の定常領域をクローニングし、重鎖と軽鎖それぞれについて、マウス抗体由来可変領域と、ヒト抗体由来定常領域とをPCRによるOverlapping Hanging法で連結し、増幅する。得られたDNAを適当なベクターに挿入し、これを形質転換して、ヒト型キメラ抗体を得ることができる。

【0048】

CDR移植抗体の場合、使用するマウス抗体可変部と最も相同性の高いヒト抗体可変部を選択してクローン化し、メガプライマー法を用いた部位選択的突然変異導入により、CDRの塩基配列を改変する。なお、フレームワーク領域を構成するアミノ酸配列をヒト化すると抗原との特異的な結合ができなくなる場合には、フレームワークの一部のアミノ酸をヒト型からラット型に変換してもよい。

「配列番号：Xに示されるアミノ酸配列において1又は2個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDR」や、「配列番号：Xに示されるアミノ酸配列に対してY%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR」は、部位特異的変異導入法、ランダム変異導入法、チェーンシャフリング法、CDRウォーキング法などの公知の方法を用いて作製され得る。

これらの方法により、ファージディスプレイ法によってCDRに種々の変異を有する抗体又は抗体断片をファージ表面に提示させ、抗原を使用してスクリーニングすることにより、より親和性が成熟したCDRを得られることが当業者によく知られている(例えば、Wu et al., PNAS, 95:6037-6042(1998); Schier, R. et al., J. Mol. Bio. 263:551-567(1996); Schier, R. et al., J. Mol. Biol. 255:28-43(1996); Yang, W.P. et al., J. Mol. Biol., 254:392-403(1995)。)。本発明は、このような方法で成熟させたCDRを含む抗体も包含する。

【0049】

その他の抗体の製造方法として、トリコスタチンA処理ニワトリB細胞由来DT40細胞株から抗体産生株を取得するAdlib法(Seo, H. et al., Nat. Biotechnol., 6:731-736, 2002)、マウス抗体遺伝子が破壊されヒト抗体遺伝子が導入されたマウスであるKMマウスを免疫してヒト抗体を作製する方法(Itoh, K. et al., Jpn. J. Cancer Res., 92:1313-1321, 2001; Koide, A. et al., J. Mol. Biol., 284:1141-1151, 1998)等があり、これらも本発明に係る抗体の産生に応用することができる。

【0050】

本発明の抗TLR7抗体又は抗TLR9抗体が低分子抗体である場合、当該低分子抗体をコードするDNAを用いて上記方法で発現させてもよいし、また、全長の抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理して作製してもよい。

【0051】

本発明で用いられる抗体は、作製方法や精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖の有無、形態などが異なり得る。しかしながら、得られた抗体が、本発明の抗体と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の抗体を、大腸菌等の原核細胞で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明は、かかる抗体も包含する。

10

【0052】

〔予防又は治療剤〕

ある抗TLR7抗体又は抗TLR9抗体を、本発明に係る炎症性疾患の予防又は治療剤に用いることができるか否かは、当業者が適宜決定することができる。

例えば、実施例に示される方法にしたがって、(i) 得られた抗体が細胞表面のTLR7又はTLR9に結合するか否か；(ii) 免疫細胞をTLR7又はTLR9のリガンドによって刺激しつつ、得られた抗体と接触させたときに、免疫細胞から分泌される炎症性サイトカイン量が抑制されるか否か；(iii) B細胞をTLR7又はTLR9のリガンドによって刺激しつつ、得られた抗体と接触させたときに、B細胞の増殖が抑制されるか否か；及び、(iv) 炎症性疾患モデル動物に得られた抗体を投与することによって、病態が改善されるか否か、の少なくとも1つを確認することにより、得られた抗体から、自己免疫疾患の予防剤又は治療剤として用いられるものを選択することが可能である。

20

【0053】

本発明に係る抗TLR7抗体又は抗TLR9抗体を含む治療剤又は予防剤は、炎症性疾患の治療に有用である。本発明に係る治療剤又は予防剤が特に有用な炎症性疾患としては、各種の自己免疫疾患（関節リウマチ（RA）、SLE、強皮症、多発性筋炎、シェーグレン症候群、ANCA関連性血管炎、ベーチェット病、川崎病、混合性クリオグロブリン血症、多発性硬化症、ギランバレー症候群、筋無力症、1型糖尿病、パセドウ病、橋本病、アジソン病、IPEX、APS type-II、自己免疫性心筋炎、間質性肺炎、気管支喘息、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、アトピー性皮膚炎、溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、特発性若年性関節炎の多関節炎型等）が挙げられる。

30

中でも、その発症の機序にTLR7及び/又はTLR9が関与することが報告されている、SLEや乾癬に有用と考えられる。

【0054】

本発明に係る炎症性疾患の治療剤又は予防剤は、本発明に係る抗体を有効成分として含み、薬学的に許容できる担体や添加物を含む。

【0055】

担体及び添加物の例として、水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等薬学的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、界面活性剤等が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0056】

本発明に係る炎症性疾患の治療剤又は予防剤は、様々な形態、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤などとすることができる。好ましい態様は、注射剤であり、非経口（例えば、静脈内、経皮、腹腔内、筋内）で投与すること

50

が好ましい。

【0057】

本明細書において、治療剤又は予防剤とは、疾患の治療、寛解に加え、発症の防止又は遅延、疾患の進行の防止又は遅延、疾患に関連する少なくとも1つの症状の緩和などのうち、少なくとも1つを生じさせる医薬を意味する。

【0058】

本発明の医薬組成物を、哺乳類（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ウマ、サル、ブタ等）、特にヒトに投与する場合の投与量は、症状、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与間隔、有効成分の種類、製剤の種類によって異なり、特に限定されないが、例えば、30 µg ~ 1000mg、100 µg ~ 500mg、100 µg ~ 100mgを1回又は数回に分けて投与することができる。注射投与の場合、患者の体重により、1 µg/kg ~ 5000 µg/kg、3 µg/kg ~ 3000 µg/kgを1回又は数回に分けて投与してもよい。

10

【0059】

（治療方法）

本発明は、対象に本発明に係る抗体を投与する工程を含む自己免疫疾患の治療又は予防方法も包含する。

【0060】

本明細書において引用されるすべての特許文献及び非特許文献の開示は、全体として本明細書に参照により組み込まれる。

【実施例】

20

【0061】

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができるが、かかる変更も本発明の範囲に含まれる。

【0062】

実施例1：抗TLR7抗体の樹立、細胞表面TLR7の検出、及び抗TLR7抗体によるTLR7応答阻害実験

〔材料と方法〕

マウスと細胞

野生型C57BL/6マウスおよび野生型Balb/cマウスは日本SLCより購入した。Unc93B1^{D34A}変異マウス（Unc93b1^{D34A/D34A}）は福井竜太郎助教より提供頂いた。TLR7欠損マウス（TLR7^{-/-}）は審良静男博士（大阪大学）より提供頂いた。マウスはSPF環境にて飼育し、東京大学の倫理規定に基づいて実験を行った。プロB細胞由来の細胞株であるBa/F3細胞はRPMI培養液（10%FCS、50 µM 2ME、ペニシリン/ストレプトマイシン/1-グルタミン混合溶液、IL-3を含む）を用いて培養した。C末端側にFlag-His6を付加させたマウスおよびヒトTLR3、TLR7、TLR8、TLR9は福井竜太郎助教から分与して頂いた（Fukui, R. et al., J Exp Med 2009）。PRAT4AがノックダウンされたM12細胞は柴田琢磨特任助教から分与して頂いた（Takahashi, K. et al. J Exp Med 2007）。

30

【0063】

試薬と抗体

40

CpGB(5' -TCCATGACGTTCTGATGCT- 3')DNA（配列番号：35）及びCpGA(5' - GGGGTCAAC GTTGAGGGGG-3')DNA（配列番号：36）、PolyU（5' -UUUUUUUUUUUUUUUUUU-3'）（配列番号：37）、RNA9.2s-DR（5' -UGUCCUCAAUGUCCUCAA-3'）（配列番号：38）は北海道システムサイエンスに合成を委託した。

LipidAは深瀬浩一博士（大阪大学）に合成を依頼し、提供を受けた。

Pam3CSK4、Poly(I:C)、Loxoribine（ロキシリピン）、およびImiquimod（イミキモド）はinvivogenより購入した。

リコンビナントマウスgranulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)およびリコンビナントマウスmacrophage colony-stimulating factor(M-CSF)、マウスFlt3リガンドはpeprotechより購入した。

50

ピューロマイシン、ネオマイシンはSIGMAより購入した。RPMI培養液、DMEM培養液はGIBCOより購入した。リコンビナントマウスIL-3はCHO細胞を使用して当研究室により作製したものを使用した。

【 0 0 6 4 】

TLR7の切断アミノ酸部位の決定

TLR7は切断されることが報告されている(Ewald et al. Nature 2008)。そこで、TLR7の切断アミノ酸部位を決定するためにEdman分解法によりN末端アミノ酸配列分析を行った。サンプルの調整方法を以下のように示す。

N末端アミノ酸配列分析に使用した細胞はC末端側にGreen Fluorescent Protein(GFP)を付加させたTLR7 (TLR7-GFP)を強制発現させたRAW264.7細胞を用いて、 1×10^{10} まで増やし、回収した。

回収した細胞を氷冷 lysis buffer (組成は表1) により30分かけて溶解し、遠心後の lysate を回収した。回収した lysate を抗GFP抗体 (FM264) ビーズに加え、4 で12時間攪拌させ免疫沈降した。免疫沈降したビーズを回収し、Washing buffer (0.1% Triton X-100, 30 mM Tris/HCl pH 7.4, 150mM NaCl) により4回洗浄し、Elution buffer (0.1% Triton X-100, 30 mM Glycine/HCl pH 2.5, 150mM NaCl) でTLR7-GFPを溶出した。溶出したタンパク質はポリアクリルアミド電気泳動をして、クマシーブリリアントブルー染色によりTLR7-GFPを確認した。溶出したタンパク質を確認した後、TLR7-GFPが含まれた溶液をdialysis buffer (0.1% Triton X-100, 10mM NaCl) により透析した。透析した溶液は回収した後、4.5時間かけて凍結乾燥させた。凍結乾燥させたタンパク質を50 μ l Sample buffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 10 % Glycerol, 2 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025 % bromophenol blue, 5 % 2-mercaptoethanol) で溶解させ、ポリアクリルアミド電気泳動して、CAPS transfer buffer (1 x CAPS pH 11.0, 10 % methanol) の中でPVDF膜に転写した。転写したTLR7はクマシーブリリアントブルー染色により可視化し、切断されたTLR7 C末端タンパク質のバンドを切り取った。切り取ったPVDF膜はCAPS bufferにより2回洗浄した後、そのサンプルはEdman分解法によるN末端アミノ酸配列決定を行うために、APRO社に解析を依頼した。

【 0 0 6 5 】

抗TLR7モノクローナル抗体の作製

抗マウスTLR7抗体A94B10は以下のように作製した。

免疫動物にはC57BL/6バックグラウンドのTLR7欠損マウスをBalb/cマウスへ6回戻し交配を行い、Balb/cバックグラウンドのTLR7欠損マウスを用いた。抗原には、Flag-His6エピトープを付加したマウスTLR7(mTLR7-fH)を遺伝子導入したBa/F3細胞を使用した。

免疫は、免疫原をマウスの腹腔内に投与することで行った。免疫初日にCFAと混合した抗原を、免疫8日目にIFAと混合した抗原を、更に1週間毎に1 x PBSで希釈した抗原を3回免疫した。最終免疫日から5日目に脾臓を摘出し、得られた脾臓細胞をマウスミエローマ由来のSp2/o細胞と細胞融合させた。このハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体を、A94B10抗体と呼ぶ場合もある。

マウスTLR7を特異的に認識する抗体を培養上清中に産生するハイブリドーマのクローンを選択するために、抗原であるmTLR7-fHを強制発現させたBa/F3細胞に対し、0.1%サポニン含有FACS溶液(1 x PBS、2.5%FBS、0.1%NaN₃)を用いて細胞内染色を行い、フローサイトメトリーにより選別した。得られたハイブリドーマ細胞の中から抗マウスTLR7抗体を産生するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株A94B10を樹立した。

得られたクローンA94B10のアイソタイプはIgG1であった。また、この抗マウスTLR7抗体はBM-MCsおよびBM-cDCs、BM-pDCs、脾臓細胞由来のB細胞に発現している内在性TLR7をフローサイトメトリー、免疫沈降および共焦点顕微鏡で検出することができた。これらの事実は、樹立したハイブリドーマ株がマウスTLR7特異的な抗体を産生していることを示す。

【 0 0 6 6 】

BM-MCsおよびBM-cDCs、BM-pDCsの誘導

マウス的大腿骨および脛骨より採取した骨髓細胞を溶血処理した後、BM-MCsおよびBM-c

DCs、BM-pDCsを誘導した。BM-MCsは骨髄細胞を 5×10^6 /径10cmバクテリアシャーレ(greiner Bio-one)に調整して播き、100ng/mlのリコンビナントマウスM-CSF(peprotech)を含むDMEM培養液で7日間培養することにより誘導した。BM-cDCsは骨髄細胞を 1×10^7 /径10cm細胞培養用シャーレ(greiner Bio-one)に調整して播き、10ng/mlのマウスGM-CSF(peprotech)を含むRPMI培養液で7日間培養することにより誘導した(Kaisho, T. et al., J Immunol 2001)。BM-cDCsの誘導では、2日毎に上記培養液を半量ずつ新たなGM-CSF含有RPMI培養液に交換し、細胞増殖とともに培養液を増やした。

BM-pDCsは骨髄細胞を 1×10^7 /径10cm細胞培養用シャーレに調整して播き、30ng/mlのマウスFlt3リガンド(peprotech)を含むRPMI培養液で7日間培養することにより誘導した。BM-cDCsの誘導では、誘導期間中毎日、誘導している培養液を半量ずつ新たなFlt3リガンド含有RPMI培養液に交換し、細胞増殖とともに培養液を増やした。BM-pDCsは細胞表面マーカーとしてCD11c陽性B220陽性細胞集団であることが知られている。そこで、誘導したBM-pDCをanti-mouse CD11c-PEおよびanti-mouse B220-APCを用いて染色し、FACS Aria(BD)によりCD11c陽性B220陽性細胞を単離した。

【0067】

Bリンパ球の精製

CD43は休止期や通常の末梢B細胞には発現しない。これを利用し、CD43陰性の脾臓細胞分画を回収することで脾臓B細胞を精製した(Nagai, Y. et al., J Immunol 2005)。野生型マウスより脾臓を摘出し、スライドガラスを用いて脾臓組織より細胞を単離した。溶血処理後、脾臓細胞にCD43 MicroBeads(Miltenyi Biotec株式会社)を加え、4で30分間混和した。Running buffer(1 x PBS、2% FBS、2mM EDTA)により2回洗浄した後、AutoMACSのdeplete programでCD43陰性細胞群を分離した。B細胞の分離効率はFACS Calibur(BD)を用いたフローサイトメトリーにより確認した。分離したB細胞の培養は10%FBS添加RPMI培養液で行った。

【0068】

チミジン取り込みアッセイ

細胞増殖能は細胞への[3H]thymidine取り込み量を測定することで定量した。脾臓細胞より精製したB細胞を 1×10^5 /wellで調整し、96穴平底プレートに播種し、複数種のTLRリガンドで刺激した。72時間刺激後に[3H]thymidine $1 \mu\text{Ci/ml}$ 存在下で更に5時間培養し、セルハースターシステム(Inotech)を用いて細胞内に取り込まれた[3H]thymidine量を測定した(Nagai et al. J Immunol 2005)。

【0069】

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

96穴平底プレートに 1×10^5 /wellで調整した細胞に、複数種のTLRリガンドを添加した。24時間後の培養上清をサンドイッチELISAに供し、TNF、IL-6、IL-12p40、RANTESの濃度をELISA Kit(R&D Systems)およびIFN- γ の濃度をELISA Kit(PBL Interferon Source)により測定した。

【0070】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーはFACS Calibur(BD)で解析した。解析する細胞をFACS溶液で洗浄した後、染色に使用した。抗体は以下を用いた。

Fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse CD4(L3T4), Phycoerythrin(PE)-conjugated anti-mouse CD62L(MEL-14), Allophycocyanin(APC)-conjugated anti-mouse CD8 (53-6.7), APC-conjugated anti-mouse Ly6G(1A8), PEcy7-conjugated anti-mouse CD19(1D3), Streptavidin-APCはBD pharmingenより購入した。Biotin conjugated anti-mouse ICOS(7E.17G9), Biotin mouse IgG1, Isotype ctrl antibody(MOPC-21), FITC-conjugated anti-mouse B220(RA3-6B2), FITC-conjugated anti-mouse CD11b(M1/70), FITC-conjugated anti-mouse CD71(R17217), PE-conjugated anti-mouse Ter119(TER119), PerCP/Cy5.5-conjugated anti-mouse CD11c(N418), APC-conjugated anti-mouse/human CD44(IM7), APC-conjugated anti-mouse B220(RA3-6B2), Alexa488-conjugated anti-mouse GL-7(GL-7

10

20

30

40

50

)はeBioscienceより購入した。PE-conjugated anti-mouse CD11c(N418), PerCP/Cy5.5-conjugated anti-mouse Ly6C(HK1.4), PerCP-conjugated anti-mouse CD4(GK1.5), APC-conjugated anti-mouse IgD(11-26c,2a), Pacific Blue-conjugated anti-mouse PDCA-1(927), Streptavidin-PEはBiolegendより購入した。R-PE conjugated goat anti-mouse IgG(H+L) (Absorbed against human immunoglobulins), APC-conjugated anti-mouse Lamp1(1D4B)はSouthern Biotechより購入した。Biotin-conjugated anti-mouse Flag(M2)はSigma Aldrichより購入した。Biotin-conjugated anti-mouse TLR4/MD2(MTS510)は当研究室により作製したものを使用した(Akashi, S. et al., J Immunol 2000)。

【 0 0 7 1 】

レトロウイルスベクターとノックダウンベクターの作製および細胞への遺伝子導入

10

C末端側にFlag-His6を付加させたヒトTLR7は薬剤耐性遺伝子のないレトロウイルスベクターpMXsに組み込んだ。

抗TLR7モノクローナル抗体のエピトープ決定を行うために、TLR7の切断アミノ酸部位を境にN末端領域TLR7(27番目のフェニルアラニンから457番目のプロリン)およびC末端領域TLR7(461番目のグルタミン酸から837番目のアスパラギン酸)を作製し、InFusion酵素(TaKaRa)によりpDisplayベクター(Invitrogen)に組み込み、さらにピューロマイシン耐性遺伝子済みのレトロウイルスベクターpMXpに組み込んだ。このベクターは組み込んだ遺伝子により発現した目的タンパク質を細胞表面に表示させ、そのN末端にHA抗原を付加することが可能である。

レトロウイルスベクターのレトロウイルス粒子への取り込みにはHEK293由来パッケージング細胞株であるPlat-E細胞にFuGene6(Roche)を用いて遺伝子導入した。導入後24時間後に培養上清を回収し、ウイルス懸濁液として確保した。このウイルス懸濁液にDOTAP(Roche)を混和させ、遺伝子を導入する対象の細胞に加えて2000rpmで1時間の遠心を行った。

20

遺伝子導入後、pMXpを遺伝子導入した細胞にはピューロマイシン2μg/ml、pSSCNを遺伝子導入した細胞にはネオマイシン4μg/mlを添加することで遺伝子導入細胞の選択を行った。

レトロウイルス作製に必要なpMXとその派生レトロウイルスベクター(pMX, pMXp)およびパッケージング細胞株であるPlat-Eは東京大学医科学研究所 北村俊雄教授より分与して頂いた。

【 0 0 7 2 】

30

免疫沈降およびウエスタンブロット

TLR7のタンパク質発現をウエスタンブロットにより解析した。細胞は1×PBSにより2回洗浄し、回収した。タンパク質発現の検出は回収した細胞を氷冷溶解用緩衝液(1% Digitonin, 20mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10% Glycerol, 1mM DTT 及びComplete protease Inhibitor Cocktail (Roche))により30分かけて溶解し、遠心後のlysateを回収した。回収したlysateを抗TLR7モノクローナル抗体(A94B10)と結合させたN-hydroxysuccinimide-activated Sepharose 4FFビーズに加え、2時間、4℃で攪拌した。この行程により、細胞内に発現しているTLR7を免疫沈降した。攪拌後、ビーズを氷冷した洗浄用緩衝液(0.1% Digitonin, 20mM Tris/HCl(pH 7.4)、150mM NaCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1% Glycerol、1mM DTT)で3回洗浄した。洗浄したビーズにSDSサンプル緩衝液(125 mM Tris/HCl [pH 6.8], 20% glycerol, 4% SDS, 10% 2-ME, 0.005% bromo phenol blue)を加え、96℃で5分間加熱してタンパク質を変性処理した。これら調整したサンプルはポリアクリルアミド電気泳動して、タンパク質をPVDF膜に転写し、ウエスタンブロットした。

40

ウエスタンブロットに使用した抗体は以下の通りである。Rabbit anti-mouse Grb2 (C-23)はSanta Cruz Biotechnologyから購入した。抗マウスTLR7ポリクローナル抗体(TLR7 N)はeBioscienceから購入した。

細胞表面をビオチン化した免疫沈降およびウエスタンブロットは以下のような方法で行った。

EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo scientific)をBiotin labeling buffer (1×PBS

50

, 15mM HEPES, 150mM NaCl)で10mg/mlに調整したビオチン化試薬を用いて、HBSS(-)で2回洗浄した細胞の表面を 5×10^7 細胞あたり0.1mgでビオチン化した。ビオチン化した細胞をHBSS(-)で3回洗浄し、回収した。回収した細胞を氷溶解用緩衝液により30分かけて溶解し、遠心後のlysateを回収した。回収したlysateを抗TLR7モノクローナル抗体(A94B10)と結合させたN-hydroxysuccinimide-activated Sepharose 4FFビーズに加え、12時間、4で攪拌した。この行程により、内在性TLR7を免疫沈降した。攪拌後、ビーズを氷冷した洗浄用緩衝液で3回洗浄した。洗浄したビーズにSDSサンプル緩衝液を加え、調整した。これら調整したサンプルはポリアクリルアミド電気泳動して、タンパク質をPVDF膜に転写し、ウエスタンブロットした。

細胞表面ビオチン化によるウエスタンブロットに使用した抗体はストレプトアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ(StAv-HRP)により検出した。抗マウスTLR7ポリクローナル抗体(TLR7N)はeBioscienceから購入した。

【0073】

統計処理

抗体によるマウス投与実験において、抗TLR7モノクローナル抗体投与群とコントロール抗体投与群の間におけるデータの有為差検定はStudent t検定により算定した。T検定における危険率が0.01未満の場合、比較群間の差が優位であると判定した。

【0074】

抗TLR7モノクローナル抗体によるTLR7応答阻害実験

(試験管内試験)

細胞はBM-MCs、BM-cDCs、BM-pDCsおよび脾臓細胞から単離したB細胞を用いた。96well平底プレートにBM-MCs、BM-cDCs、BM-pDCsを 1×10^5 播種し、抗TLR7抗体を各々の濃度で添加した。抗体を添加してから4時間後、TLRリガンドを播種した培養細胞に加えた。TLRリガンド添加した24時間後、培養上清液を回収した。回収した培養上清液はリガンド刺激によって、産生されたサイトカインを測定するためにELISA法により検出した。

(生体試験)

また、Unc93B1 D34A変異マウスはTLR7過剰応答により、血小板減少症および脾腫を呈することが報告されている(Fukui et al. immunity 2011)。

そこで、Unc93B1 D34A変異マウスが血小板の減少を認めた12週齢から16週齢(野生型マウスが $85.3[10^4/\mu l]$ に対して、Unc93B1 D34A変異マウスが $32.4[10^4/\mu l]$)において、抗体投与を開始した。投与抗体量は静脈注射により200 μ g/マウスで行った。用いた抗体はA94B10抗体およびコントロール抗体であり、その投与頻度は毎週行った。抗体投与による血小板減少の影響を精査するために、抗体を投与してから2週間毎に尾採血を行い、血球計数器(MEK-6450セルタック; NIHON KOHDEN)により血小板値を測定した。抗体投与から10週後、D34A変異マウスから脾臓を摘出し、重量を測定した。さらに、同マウスから摘出した脾臓、リンパ節(上腕部、液窩、鼠径リンパ節)はフローサイトメトリーにより細胞集団を解析した。

【0075】

抗体及びCDRのアミノ酸配列解析

QIAGENから購入したRNeasy Mini Kitを用いてハイブリドーマ株A94B10、B33A4、C34A1よりtotal RNAを単離、精製した。Clontechから購入したSMARTer RACE cDNA Amplification Kitを用いてtotal RNAより重鎖アイソタイプ及び軽鎖特異的な1stストランドcDNA合成を行った後5'-RACE PCRを行い、可変領域を含む全長重鎖及び軽鎖cDNAを合成した。これらcDNAをTaKaRaより購入したMighty TA-cloning Kitを用いてpMD20-T vectorへ挿入し、FASMACへ塩基配列解析を依頼し、塩基配列よりアミノ酸配列を決定した。CDR配列は、チューリッヒ大学より提供されているデータベースAho's Amazing Atlas of Antibody Anatomyを用いて、アミノ酸配列を比較する事により決定した。

〔結果〕

抗TLR7モノクローナル抗体の樹立と細胞表面TLR7の検出

一次免疫細胞(primary immune cell)の内因性TLR7の細胞内局在を調べるため、マウ

10

20

30

40

50

スTLR7に対するモノクローナル抗体A94B10抗体を樹立した。TLR7は細胞内小胞に局在すると信じられていたが、抗TLR7モノクローナル抗体は、骨髄由来マクロファージの細胞表面にTLR7が存在することを明らかにした（図1A）。

染色の特異性は、TLR7ノックアウトマウスの骨髄由来マクロファージが染色されないことによって確認した。さらに、TLR7の細胞表面での発現を確認するため、細胞表面をビオチン化し、TLR7を骨髄由来マクロファージから免疫沈降させた。沈降したTLR7はストレプトアビジン又は抗TLR7抗体で検出された。TLR7はエンドリソソームでタンパク質分解的に切断された。全長TLR7と切断されたTLR7はいずれも、野生型細胞でストレプトアビジンによって検出されたが、TLR7ノックアウト細胞では検出されなかった（図1B）。このことは、プロセッシングを受けたTLR7も受けていないTLR7も細胞表面に発現していることを示す。全長及び切断されたTLR7は、それぞれゴルジ装置又はエンドリソソームに由来するものと考えられる。

細胞表面TLR7は、骨髄由来の古典的又は形質細胞様樹状細胞ではほとんど検出されなかったが（図1A）、脾臓由来のレジデントpDC又はcDCでは検出された。in vitroの分化したDCとin vivoのレジデントDCでの細胞表面TLR7の違いの理由は不明である。脾臓におけるCD11b+マクロファージ/単核球及び好中球も細胞表面TLR7を発現していたが、脾臓由来DCよりはかなり少なかった（データ示さず）。B細胞もTLR7リガンドに反応したが、細胞表面TLR7は検出されなかった（データ示さず）。

TLR7及び9の、小胞体（ER）からエンドリソソームへの輸送には、2つのERレジデントタンパク質PRAT4A及びUnc93B1を必要とする。細胞表面TLR7は、Unc93B1機能欠損マウスであるUnc93B1^{3d/3d}マウス（図1C）又はPRAT4A^{-/-}マウス（データ示さず）由来の脾臓DCでは検出されなかった。このことは、PRAT4A及びUnc93B1がいずれもTLR7の細胞表面への輸送に必要とされることを示す。細胞表面TLR7は、脾臓MyD88^{-/-} cDCでは検出された（データ示さず）。このことは、TLRシグナルは、TLR7の細胞表面での発現に必要とされないことを示す。B細胞におけるTLR7発現は、I型インターフェロンにより持続することが知られる。しかしながら、IFNAR^{-/-} cDCは、TLR7の細胞表面での発現に変化は見られなかった。I型インターフェロンは、TLR7の細胞表面発現には必要とされていない。

また、TLR7の切断部位を調べたところ、460番目のロイシンと461番目のグルタミン酸および461番目のグルタミン酸と462番目のアラニンの間で切断されていることが明らかになった（図9A）。A94B10抗体は、N末端領域TLR7（TLR7N；27番目のフェニルアラニンから457番目のプロリン）に結合し、C末端領域TLR7（TLR7C；461番目のグルタミン酸から837番目のアスパラギン酸）には結合しないことがわかった（図9B）。

【0076】

抗TLR7モノクローナル抗体によるTLR7応答阻害実験（1）

TLR7は、エンドリソソームでRNAを認識すると考えられていた（Ewald, S. E. et al. J Exp Med 2011）。RNA認識における細胞表面TLR7の役割を調べるために、抗TLR7モノクローナル抗体を、様々な免疫細胞に加えた。

予想に反して、抗TLR7モノクローナル抗体は、低分子のTLR7リガンドであるIoxoribine、又は合成RNAで刺激した骨髄由来マクロファージによるIL-6、TNF- α 、IL-12、及びRANTES（CCL5）の産生を濃度依存的に阻害した（図2A）。TLR9リガンドであるCpG-BによるTLR9依存性サイトカイン産生は変化しなかった。予想に反して、TLR7特異的阻害は、細胞表面TLR7がほとんど検出されなかったBM-cDCs及びBM-pDCs（それぞれ図2及び図3）でも見られた。ポリウリジル酸（PolyU）に対するBM-pDCs反応は、中程度ではあるが有意に阻害された（図4）。さらに、低分子のTLR7リガンドであるimiquimod応答性のB細胞増殖も、大きく阻害された（図5）。これらの結果は、抗TLR7モノクローナル抗体が、BM-cDCs BM-pDCs、BM-MCs及び脾臓由来B細胞のTLR7応答を阻害できることを示した。

【0077】

抗TLR7モノクローナル抗体によるTLR7応答阻害実験（2）

次に、抗TLR7モノクローナル抗体の阻害効果を、TLR7依存性炎症性疾患を有するマウスで調べた。Unc93b1遺伝子の34位のアスパラギン酸がアラニンに置換されたUnc93b1^{D34A/D}

10

20

30

40

50

^{34A}マウスは、TLR7の過反応による全身性の致死性の炎症を生じる(Fukui et al. immunity 2011)。

全身性の炎症は、末梢血で簡単に監視できる血小板減少症を引き起こす。抗TLR7抗体の治療効果を調べるため、すでに血小板減少症を発症した3~4月齢のUnc93b1^{D34A/D34A}マウスにモノクローナル抗体を注射投与した。マウス当たり200 µgのモノクローナル抗体を週1回注射し、末梢血の血小板を1週間おきに測定した。10回の治療後、抗TLR7モノクローナル抗体投与群のマウスの血小板は増加したが、コントロール抗体を投与した群では次第に減少した(図6A)。

抗TLR7モノクローナル抗体で10週間治療した後、マウスを犠牲させ、病態を分析した。Unc93b1^{D34A/D34A}マウスでは、脾臓の骨髓細胞の赤芽球が増加した。脾臓における赤芽球の割合は、コントロール抗体投与群よりも、抗TLR7抗体投与群において著しく低かった(図6B)。T細胞は活性化され、細胞表面の共刺激分子ICOSの発現の亢進に伴って、メモリーT細胞へと分化した。Unc93b1^{D34A/D34A}マウスにおけるCD4+細胞上のメモリーT細胞とICOSの発現の割合は、コントロール抗体で処理した群に比較して著しく低かった(図6C及び6D)。これらの結果は、抗TLR7抗体が、Unc93b1^{D34A/D34A}マウスのTLR7依存性全身性炎症を改善することを示す。

【0078】

抗TLR7モノクローナル抗体によるTLR7応答阻害実験(2)

次に、抗TLR7モノクローナル抗体が、in vivoでTLR7リガンドによって誘導されるサイトカイン産生を抑制するかどうか調べた。図10上段に示すスケジュールでA94B10抗体と、TLR7リガンドであるR848を投与し、血液中のIL-6とIFN の濃度を測定した。

結果を図10下段に示す。A94B10抗体は、R848投与によって誘導されるサイトカイン産生を、濃度依存的に有意に抑制することが確認された。

【0079】

抗TLR7モノクローナル抗体によるTLR7応答阻害実験(3)

次に、抗TLR7モノクローナル抗体が、in vivoでTLR7リガンドによって誘導される皮膚の炎症を抑制するかどうか調べた。図11上段に示すスケジュールでA94B10抗体を投与するとともに、TLR7リガンドであるImiquimodをマウスの耳に皮内投与(Intradermal;i.d.)し、耳介厚を測定することによって炎症の程度を評価した。

結果を図11に示す。A94B10抗体は、Imiquimodによって誘導される皮膚の炎症を有意に抑制することが確認された。

【0080】

抗TLR7モノクローナル抗体によるTLR7応答阻害実験(4)

次に、抗TLR7モノクローナル抗体が、乾癬モデルマウスにおいて炎症を抑制するかどうか調べた。図12上段に示すスケジュールで、マウスにIL-23を耳に投与して乾癬モデルを作製し、A94B10抗体を投与した。IL-23をマウスに投与するとTLR7発現が亢進し(図12左下)、ヒトの乾癬に非常に近いモデルとなることが知られている。耳介厚を測定することによって炎症の程度を評価した。

結果を図12右下に示す。A94B10抗体は、IL-23で誘導した乾癬モデルマウスの炎症を有意に抑制することが確認された。

【0081】

抗体、CDR、及びエピトープのアミノ酸配列解析

ハイブリドーマ株A94B10から得られるモノクローナル抗体の重鎖アミノ酸配列を配列番号: 9に、軽鎖アミノ酸配列を配列番号: 10に示す。また、同抗体の重鎖CDR1~3のアミノ酸配列を配列番号: 3~5に、軽鎖CDR1~3のアミノ酸配列を配列番号: 6~8に示す。

【0082】

A94B10のエピトープ解析

A94B10抗体のエピトープを決定するために、図13上段に示すように、配列番号: 1に示すTLR7のアミノ酸27位から457位、27位から364位、27位から312位、及び27位から226位

10

20

30

40

50

までの断片を細胞株に発現させ、各断片とA94B10抗体との結合をフローサイトメトリーで測定した。

結果を図13下段に示す。TLR7N₂₇₋₃₁₂にはA94B10抗体が結合しなかったが、TLR7N₂₇₋₃₆₄には結合したことから、A94B10抗体は、TLR7のアミノ酸配列の313位から364位の領域付近にエピトープを有すると考えられた。

【0083】

また、A94B10抗体のエピトープを決定するための別の実験として、図14上段に示すように、マウスTLR7とヒトTLR7からなる各種キメラTLR7を作製し、各キメラTLR7とA94B10抗体との結合をフローサイトメトリーで測定した。

mTLR7₁₋₂₂₇、mTLR7₁₋₂₇₅、及びmTLR7₁₋₃₁₃では、それぞれN末端から1位～227位、1位～275位、及び1位～313位をマウスTLR7の配列とし、C末端側をヒトTLR7の配列とした。また、mTLR7₂₂₈₋₃₁₃、mTLR7₂₂₈₋₂₇₅、mTLR7₂₇₅₋₃₁₃では、N末端とC末端をヒトTLR7の配列とし、中央をマウスTLR7の配列とした。

結果を図14下段に示す。マウスTLR7₁₋₂₇₄を含むキメラTLR7にはA94B10抗体が結合しなかったが、マウスTLR7₁₋₃₁₃およびマウスTLR7₂₇₅₋₃₁₃を含むキメラTLR7には結合したことから、A94B10抗体は、TLR7のアミノ酸配列の275位から313位の領域付近にエピトープを有すると考えられた。

【0084】

実施例2：抗TLR9抗体の樹立、及び細胞表面TLR9の検出

〔材料と方法〕

抗マウスTLR9モノクローナル抗体の樹立

マウスTLR9に対するモノクローナル抗体(mAb)を樹立するために、BALB/c TLR9^{-/-}マウスを、マウスTLR9を発現するBa/F3細胞(Ba/F3_mTLR9)で免疫した。最後の免疫の4日後、脾臓細胞をSP2/O骨髓腫細胞と融合させた。抗マウスTLR9 mAbを産生するハイブリドーマを、フローサイトメトリーにより、免疫に用いたBa/F3細胞の染色によって選択した。3つのモノクローナル抗体J15A7(IgG1/)、C34A1(IgG2a/)、及びB33A4(IgG2a/)が樹立された。

【0085】

細胞染色

BM細胞及び脾臓細胞の染色のため、細胞は抗CD16/CD32抗体(clone:93)とプレインキュベートし、蛍光物質で標識した以下のマーカーに特異的な抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーを行った：CD4(GK1.5)、CD8(53-6.7)、CD11c(HL3)、B220(RA3-6B2)、PDCA-1(927, 129c1)。

脾臓細胞の単一細胞懸濁液をShibataらの方法に従って調製した(Shibata, T., et al. Int Immunol 2012)。細胞をビオチン化mAbと4でインキュベートし、染色用緩衝液(1×PBS、2.5% FBS及び0.1% NaN₃)で希釈した後、ストレプトアビジン結合抗体とインキュベートした。細胞内の染色のため、細胞は、染色用緩衝液中の0.05%又は0.1%のサポニン(Sigma-Aldrich (S5421)又はWAKO (193-00162))で透過処理し、続く工程もサポニン緩衝液中で行った。染色された細胞は、FACSCallibur又はFACSArifローサイトメーター(BD Biosciences)で解析した。

【0086】

免疫沈降及びウェスタンブロッティング

細胞を溶解用緩衝液(1% Digitonin, 20mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10% Glycerol, 1mM DTT 及びComplete protease Inhibitor Cocktail (Roche))で洗浄及び溶解した。氷上でインキュベートした後、溶解物を遠心処理し、不純物を除去した。免疫沈降のために、抗HA matrix(Roche clone: 3F10)又はN-ヒドロキシスクシンイミドで活性化した抗マウスTLR9mAb結合セファロース4FFビーズを、細胞溶解物に加え、4でインキュベートした。0.1%ジギトニンでビーズを3回洗浄し、結合したタンパク質を沸騰したSDSサンプル緩衝液(125 mM Tris/HCl [pH 6.8], 20% glycerol, 4% SDS, 10% 2-ME, 0.005% bromophenol blue)中で溶出させた。電気泳動後、サンプルをPVDF

10

20

30

40

50

膜に移行し、イムノブロットングに供した。

【 0 0 8 7 】

〔 結果 〕

TLR9N又はTLR9C特異的な抗TLR9モノクローナル抗体の樹立

内因性TLR9の研究のため、TLR9に対する3つのモノクローナル抗体を樹立した。モノクローナル抗体の特異性は、TLR3、7、8及び9を発現するBa/F3細胞の膜透過性染色によって確認した。抗マウスTLR9抗体は、マウスTLR9と特異的に反応し、ヒトTLR9に対する交差反応性はなかった（図7A）。

DNAセンシングにおけるTLR9のエクトドメインのタンパク質切断を考慮すると、これらのモノクローナル抗体のエピトープがTLR9NとTLR9Cのいずれであるかを決定することが重要であることから、まず、TLR9の切断部位を決定した。M12B細胞リンパ腫でTLR9 - GFPを発現させ、PRAT41の発現を抑制したM12細胞で発現させた場合と比較した。PRAT4Aは、TLR特異的シャペロンであり、PRAT4A非存在下では、TLR9は、小胞体から出ることができないため、プロセッシングを受けない。したがって、PRAT4A発現抑制M12細胞では見られない断片が、TLR9Cである可能性が高いと考えた（図7B）。

検出されたTLR9C断片を精製し、N末端アミノ酸配列を決定した。TLR9Cは、461T又は467Fから始まることがわかった（図7C）。決定した切断部位は、ロイシンリッチリピート14（LRR14）及びLRR15の間の領域であり（図7D）、過去の報告に基づく予想と一致した。N末端が2種類存在することは、TLR9がアスパラギンエンドペプチダーゼとカテプシンによって順次プロセッシングを受けることにより説明される。このN末端アミノ酸配列にしたがって、N末端HAエピトープ、TLR9エクトドメイン、及び膜透過ドメインからなるキメラタンパク質をBa/F3細胞で発現させた。樹立した細胞を抗TLR抗体で染色した。2つのモノクローナル抗体J15A7及びB33A4はTLR9Nと反応したが、C34A1はTLR9Cに結合した（図7E）。J15A7のTLR9Nへの結合は、B33A4の結合よりもかなり弱かった。

【 0 0 8 8 】

TLR9の脾臓由来DC表面における発現

TLR9は、細胞表面から分泌されると考えられていたが、一次免疫細胞表面で内因性TLR9が発現していることは、これまで報告されていなかったが、抗TLR9抗体を用いて、細胞表面のTLR9発現を調べた。

まず、Ba/F3細胞でTLR9を過剰発現させたところ、予想通り、TLR9発現Ba/F3細胞表面にTLR9は検出されず、膜透過性染色によってエンドソームのTLR9が検出されただけであった（図8A、上段）。Unc93B1は、TLR9を小胞体からエンドリソソームに輸送する。Unc93B1がTLR9を細胞表面にも輸送している可能性を考えて、TLR9を発現するBa/F3細胞でUnc93B1も過剰発現させた。J15A7とC34A1は細胞表面TLR9を検出したが、抗TLR9NのB33A4は検出なかった（図8A、下段）。J15A7は、脾臓由来pDC、CD8⁺ cDC、CD4⁺ cDC、及びCD4-CD8-cDCにおいても、細胞表面TLR9を検出した。J15A7染色の特異性は、Tlr9^{-/-} DCで確認した。Unc93B1遺伝子に機能喪失型の変異を有するUnc93b1^{3d/3d}マウスの脾臓由来DCでは、細胞表面TLR9は検出されなかった。Unc93B1の過剰発現が、Ba/F3細胞における細胞表面TLR9の発現を誘導することを示すこれらの結果から、Unc93B1はTLR9の細胞表面への輸送において重要な役割を果たすことがわかった。

【 0 0 8 9 】

抗体及びCDRのアミノ酸配列解析

ハイブリドーマ株J15A7抗体から得られるモノクローナル抗体の重鎖アミノ酸配列を配列番号：29に、軽鎖アミノ酸配列を配列番号：30に示す。また、同抗体の重鎖CDR1～3のアミノ酸配列を配列番号：11～13に、軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を配列番号：14～16に示す。

ハイブリドーマ株B33A4抗体から得られるモノクローナル抗体の重鎖アミノ酸配列を配列番号：31に、軽鎖アミノ酸配列を配列番号：32に示す。また、同抗体の重鎖CDR1～3のアミノ酸配列を配列番号：17～19に、軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を配列番号：20～22に示す。

10

20

30

40

50

ハイブリドーマ株C34A1抗体から得られるモノクローナル抗体の重鎖アミノ酸配列を配列番号：33に、軽鎖アミノ酸配列を配列番号：34に示す。また、同抗体の重鎖CDR1～3のアミノ酸配列を配列番号：23～25に、軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を、配列番号：26～28に示す。

【配列表フリーテキスト】

【0090】

配列番号：1は、マウスTLR7のアミノ酸配列を表す。

配列番号：2は、マウスTLR9のアミノ酸配列を表す。

配列番号：3は、A94B10抗体の重鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

配列番号：4は、A94B10抗体の重鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

10

配列番号：5は、A94B10抗体の重鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：6は、A94B10抗体の軽鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

配列番号：7は、A94B10抗体の軽鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

配列番号：8は、A94B10抗体の軽鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：9は、A94B10抗体の重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号：10は、A94B10抗体の軽鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号：11は、J15A7抗体の重鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

配列番号：12は、J15A7抗体の重鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

配列番号：13は、J15A7抗体の重鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：14は、J15A7抗体の軽鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

20

配列番号：15は、J15A7抗体の軽鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

配列番号：16は、J15A7抗体の軽鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：17は、B33A4抗体の重鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

配列番号：18は、B33A4抗体の重鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

配列番号：19は、B33A4抗体の重鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：20は、B33A4抗体の軽鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

配列番号：21は、B33A4抗体の軽鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

配列番号：22は、B33A4抗体の軽鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：23は、C34A1抗体の重鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

配列番号：24は、C34A1抗体の重鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

30

配列番号：25は、C34A1抗体の重鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：26は、C34A1抗体の軽鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

配列番号：27は、C34A1抗体の軽鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

配列番号：28は、C34A1抗体の軽鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：29は、J15A7抗体の重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号：30は、J15A7抗体の軽鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号：31は、B33A4抗体の重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号：32は、B33A4抗体の軽鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号：33は、C34A1抗体の重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号：34は、C34A1抗体の軽鎖のアミノ酸配列を表す。

40

配列番号：35は、CpGBのDNA配列を表す。

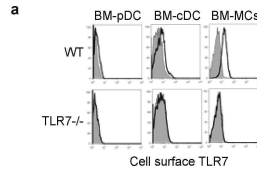
配列番号：36は、CpGAのDNA配列を表す。

配列番号：37は、PolyUのRNA配列を表す。

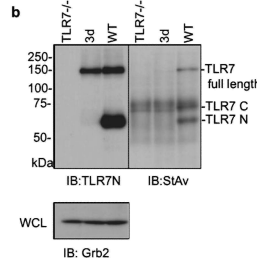
配列番号：38は、RNA9.2s-DRのRNA配列を表す。

配列番号：39は、ヒトTLR7上のアミノ酸配列を表す。

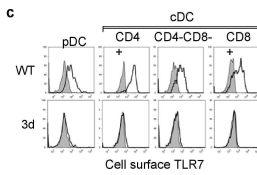
【図 1 A】



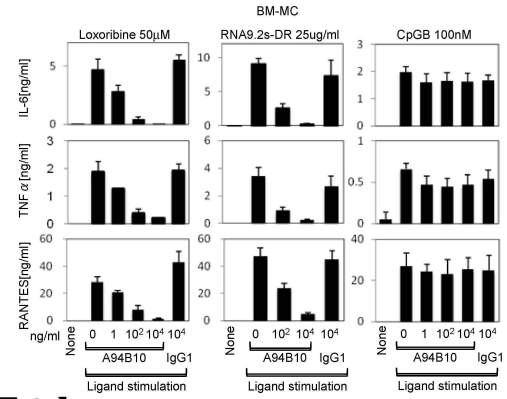
【図 1 B】



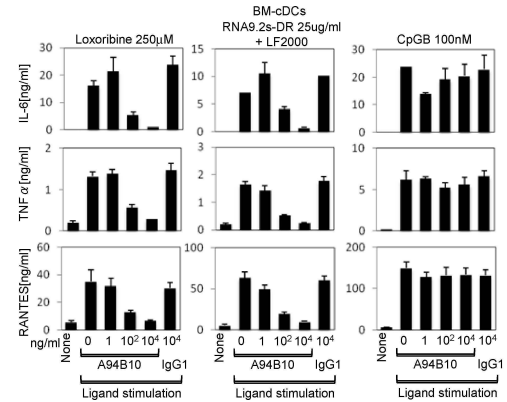
【図 1 C】



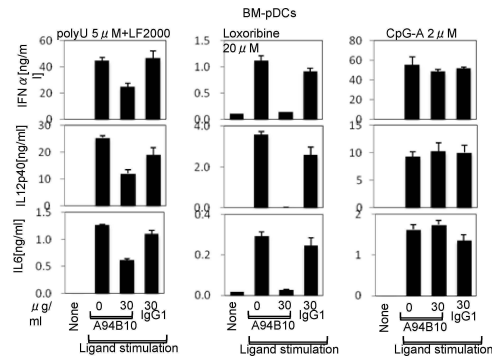
【図 2】



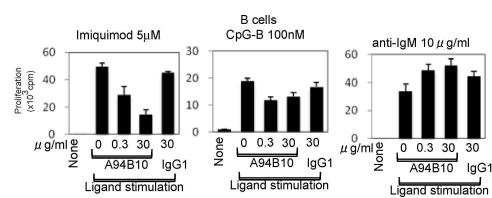
【図 3】



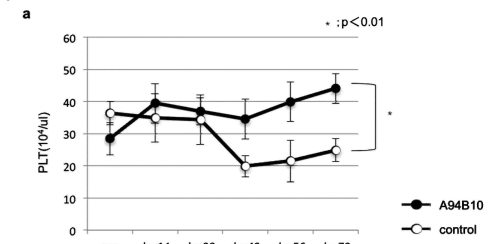
【図 4】



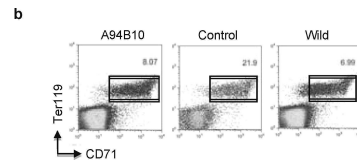
【図 5】



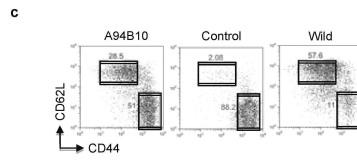
【図 6 A】



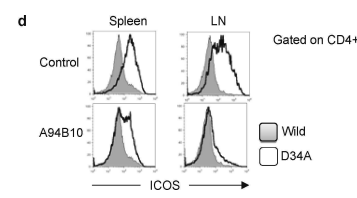
【図 6 B】



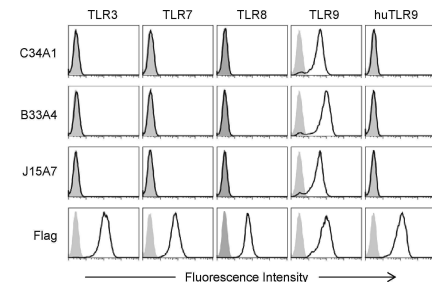
【図 6 C】



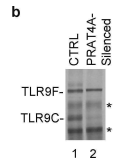
【図 6 D】



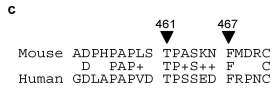
【図 7 A】



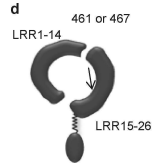
【図 7 B】



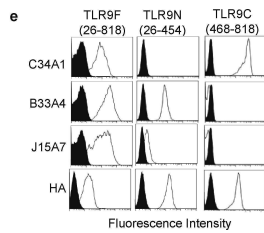
【図 7 C】



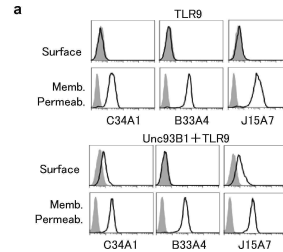
【図 7 D】



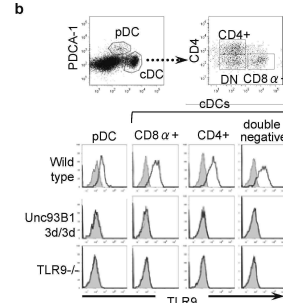
【図 7 E】



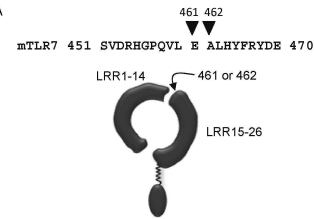
【図 8 A】



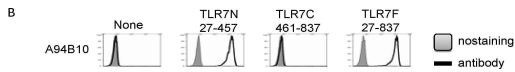
【図 8 B】



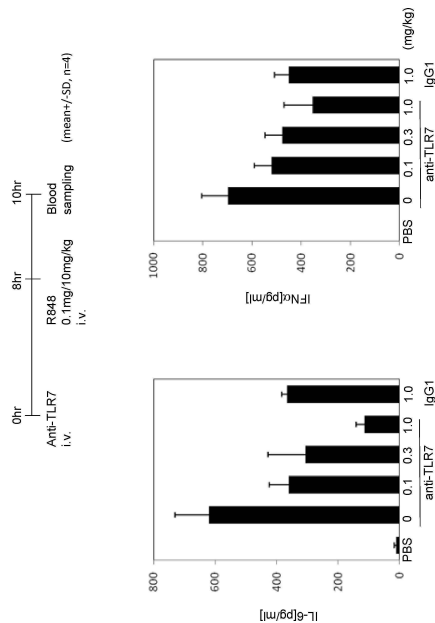
【図 9 A】



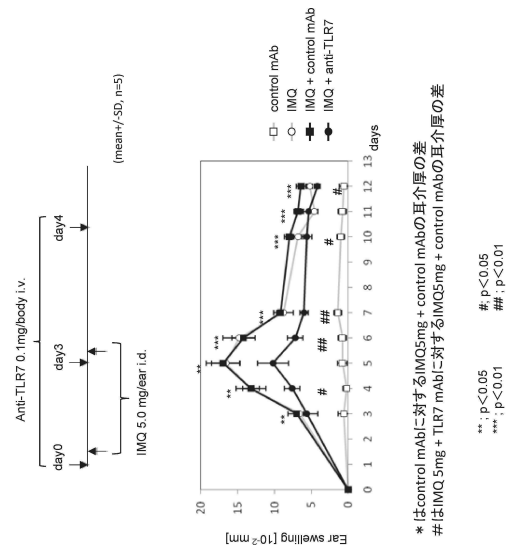
【図 9 B】



【図 10】



【図 11】

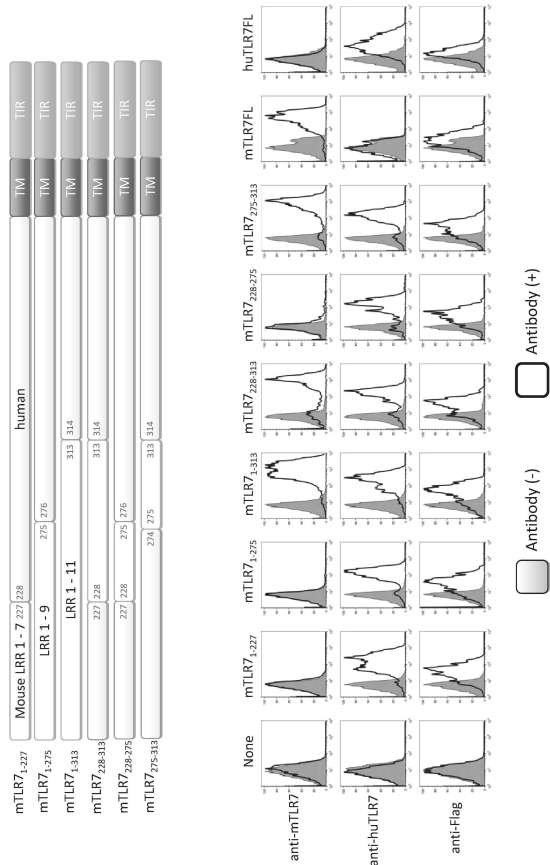


* は control mAb に対する IMQ5mg + control mAb の耳介厚の差
は IMQ5mg + TLR7 mAb に対する IMQ5mg + control mAb の耳介厚の差

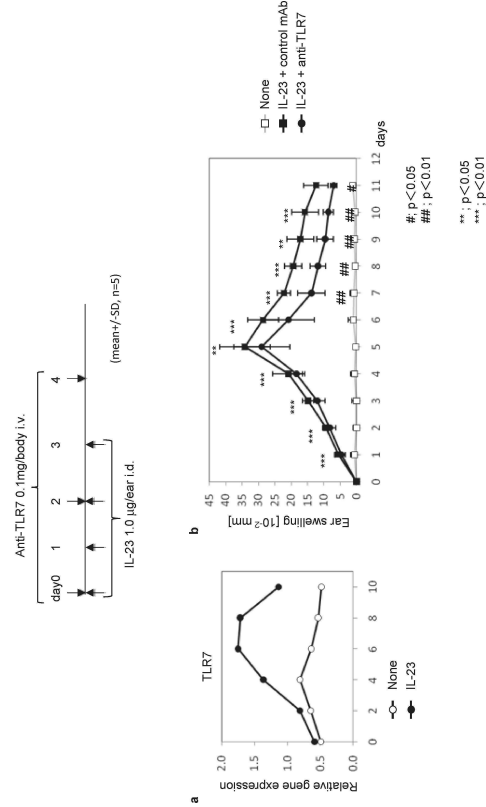
** : p<0.05
*** : p<0.01
: p<0.05
: p<0.01

The epitope mapping of A94B10 on chimeric TLR7

【 1 4 】

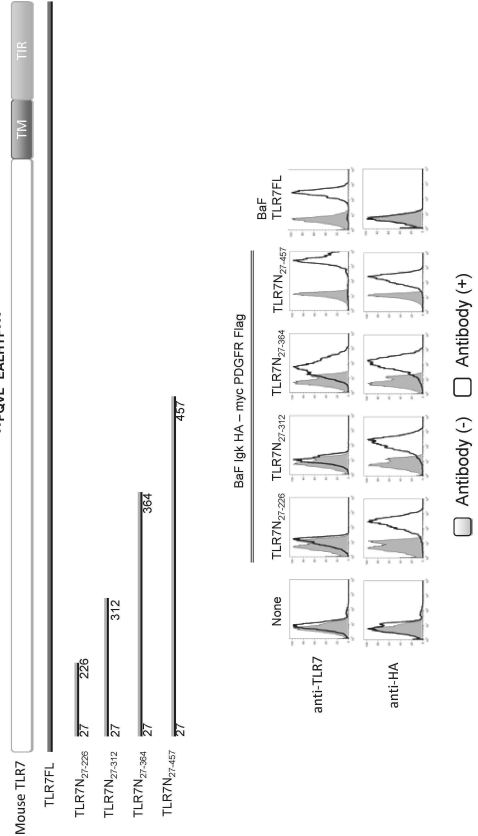


【 1 2 】



The epitope of TLR7 mAbs

【 1 3 】



【配列表】

0006671069000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 0 7 K 16/28 (2006.01) A 6 1 P 17/06
 C 0 7 K 16/28 Z N A

特許法第30条第2項適用 第12回国際エンドトキシン自然免疫学会2012(IEIIS2012)要旨集
 (平成24年10月22日)第130ページ(PA-052)に発表

特許法第30条第2項適用 第12回国際エンドトキシン自然免疫学会2012(IEIIS2012)要旨集
 (平成24年10月22日)第131ページ(PA-053)に発表

特許法第30条第2項適用 2012日本免疫学会総会・学術集会記録 第41巻(平成24年11月12日)
 特定非営利活動法人日本免疫学会発行第166ページ(3-C-W46-4-O/P)に発表

特許法第30条第2項適用 2012日本免疫学会総会・学術集会記録 第41巻(平成24年11月12日)
 特定非営利活動法人日本免疫学会発行第168ページ(3-C-W46-11-P)に発表

早期審査対象出願

前置審査

(72)発明者 三宅 健介
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
 (72)発明者 菅野 敦夫
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
 (72)発明者 本井 祐二
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
 (72)発明者 恩地 正浩
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特表2013-509869(JP,A)
 Immunity, (2011), 35, p.721-732
 Immunology, (2008), 125, p.430-437
 J. Anat., (2013.3.22), 222, p.495-503
 Biochim. Biophys. Acta, (2011), 1812, [9], p.1104-1110
 Eur. J. Immunol., (2007), 37, p.3582-3586
 Immunol. Rev., (2008), 223, p.271-283
 Mediators Inflamm., (2010), Article ID:437246
 フナコシニュース2010年5月1日号, (20110), p.19

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
 P u b M e d
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)