

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-525655

(P2017-525655A)

(43) 公表日 平成29年9月7日(2017.9.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 C	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 L	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 31/7105 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7105	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-570807 (P2016-570807)	(71) 出願人	509004712
(86) (22) 出願日	平成27年6月2日 (2015.6.2)		ベイラー リサーチ インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成29年1月12日 (2017.1.12)		BAYLOR RESEARCH INS
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/033696		TITUTE
(87) 国際公開番号	W02015/187637		アメリカ国 テキサス75204 ダラス
(87) 国際公開日	平成27年12月10日 (2015.12.10)		スイート501 ライブオークストリー
(31) 優先権主張番号	62/006,575	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成26年6月2日 (2014.6.2)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギーおよび炎症性疾患を治療するための方法および組成物

## (57) 【要約】

アレルギー性疾患および炎症性疾患の治療のためのTh2経路の免疫調節物質を用いる治療方法が本明細書に記載されている。本開示の局面は、それを必要とする対象においてTh2型細胞応答を低下させるための方法であって、該対象に、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片の治療的有効量を投与する段階を含む、方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

それを必要とする対象においてアレルギー性障害を予防または治療するための方法であって、該対象に、Pam3CSK4とコンジュゲートされた抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片の治療的有効量を投与する段階を含む、方法。

**【請求項 2】**

それを必要とする対象においてアレルギー性障害を予防または治療するための方法であって、該対象に、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片の治療的有効量を投与する段階を含む、方法。

**【請求項 3】**

前記TLRアゴニストが、TLR2アゴニスト、TLR7アゴニスト、およびTLR8アゴニストより選択される、請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記TLRアゴニストがTLR2アゴニストである、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記TLR2アゴニストがPam3CSK4である、請求項4に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記TLRアゴニストがTLR7アゴニストまたはTLR8アゴニストである、請求項3に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記TLRアゴニストがssRNAおよびR848より選択される、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記TLRが、前記抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片とコンジュゲートされている、請求項2～7のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記TLRが、前記抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片と化学的にコンジュゲートされている、請求項1または8に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記抗体または前記抗原結合性断片が、デクチン-1と特異的に結合してデクチン-1を活性化する、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記抗体または前記抗原結合性断片が、抗原提示細胞上のデクチン-1を特異的に結合させて活性化する、請求項10に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記樹状細胞が血液中に存在する、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記樹状細胞が末梢血中に存在する、請求項13に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記樹状細胞が真皮樹状細胞である、請求項12に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記樹状細胞が骨髄樹状細胞である、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記樹状細胞がIL-12を分泌する、請求項12～16のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記樹状細胞がmDC-1細胞である、請求項12～16のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記抗体またはその抗原結合性断片がヒトデクチン-1と結合する、請求項10～18のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 2 0】  
前記抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、抗体誘導体、ベニア抗体 (veneered antibody)、ダイアボディ、モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体である、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 2 1】  
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項20に記載の方法。
- 【請求項 2 2】  
前記抗体がヒト化抗体である、請求項20に記載の方法。
- 【請求項 2 3】  
前記抗体がマウス/ヒトのキメラ抗体である、請求項20に記載の方法。 10
- 【請求項 2 4】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 2、4、6、8、10、および12の配列より選択されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 2 5】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 13～30のいずれか1つに対応するアミノ酸配列を有するCDRを含む、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 2 6】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 13～15に対応するアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖、およびSEQ ID NO : 16～18に対応するアミノ酸配列を有する軽鎖を含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。 20
- 【請求項 2 7】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 19～21に対応するアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖、およびSEQ ID NO : 22～24に対応するアミノ酸配列を有する軽鎖を含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 2 8】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 25～27に対応するアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖、およびSEQ ID NO : 28～30に対応するアミノ酸配列を有する軽鎖を含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 2 9】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 1、3、5、7、9、および11の配列より選択されるアミノ酸配列を有する重鎖または軽鎖を含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。 30
- 【請求項 3 0】  
前記抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片が 4定常領域を含む、請求項1～29のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 3 1】  
前記 4定常領域が、残基235でのロイシンからグルタミン酸への置換を含む、請求項30に記載の方法。
- 【請求項 3 2】  
前記 4定常領域が、ヒンジ領域内の残基228でのセリンからプロリンへの置換を含む、請求項30または31に記載の方法。 40
- 【請求項 3 3】  
前記対象がヒト対象である、請求項1～32のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 3 4】  
前記対象が、2型糖尿病に罹患しているかまたは2型糖尿病に罹患するリスクを有する、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 3 5】  
前記対象がアレルギー性障害を有する、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 3 6】  
前記アレルギー性障害がTH2媒介アレルギー性障害である、請求項35に記載の方法。 50

- 【請求項 37】  
前記対象がTH2媒介炎症性障害を有する、請求項1～36のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 38】  
前記TH2媒介炎症性障害が、喘息、慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease）、間質性肺疾患、慢性的閉塞性肺疾患（chronic obstructive lung disease）、慢性気管支炎、好酸球性気管支炎、好酸球性肺炎、肺炎、炎症性腸疾患、アトピー性皮膚炎、アトピー、アレルギー、アレルギー性鼻炎、特発性肺線維症、硬皮症、肺気腫、乳癌、および潰瘍性大腸炎などより選択される、請求項37に記載の方法。
- 【請求項 39】  
前記TH2媒介炎症性障害が乳癌である、請求項38に記載の方法。 10
- 【請求項 40】  
前記TH2媒介炎症性障害が潰瘍性大腸炎である、請求項38に記載の方法。
- 【請求項 41】  
前記TLRアゴニストと機能的に連結された抗体またはその抗原結合性断片が、アレルギー反応の発現前に投与される、請求項35または36に記載の方法。
- 【請求項 42】  
前記抗体またはその抗原結合性断片が、アレルギー反応の発現後に投与される、請求項35または36に記載の方法。
- 【請求項 43】  
前記TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片が、前記対象におけるTh1細胞、Th17細胞、およびTreg細胞のうち1つまたは複数の増大のために有効な量で投与される、請求項1～42のいずれか一項に記載の方法。 20
- 【請求項 44】  
前記抗体が皮内注射によって投与される、請求項1～43のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 45】  
前記抗体が静脈内注射によって投与される、請求項1～43のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 46】  
前記抗体または前記抗原結合性断片が改変をさらに含む、請求項1～45のいずれか一項に記載の方法。 30
- 【請求項 47】  
前記改変が、VHおよび/またはVLのCDR1領域内、CDR2領域内、および/またはCDR3領域内の保存的アミノ酸突然変異である、請求項46に記載の方法。
- 【請求項 48】  
前記改変が、Fcヒンジ領域内の保存的アミノ酸突然変異である、請求項46に記載の方法。
- 【請求項 49】  
前記改変がベグ化である、請求項46に記載の方法。
- 【請求項 50】  
前記改変が血清タンパク質とのコンジュゲーションである、請求項46に記載の方法。 40
- 【請求項 51】  
前記改変がヒト血清アルブミンとのコンジュゲーションである、請求項46に記載の方法。
- 【請求項 52】  
前記改変が、検出可能な標識とのコンジュゲーションである、請求項46に記載の方法。
- 【請求項 53】  
前記改変が診断剤とのコンジュゲーションである、請求項46に記載の方法。
- 【請求項 54】  
前記改変が酵素とのコンジュゲーションである、請求項46に記載の方法。
- 【請求項 55】 50

前記改変が、蛍光物質、発光物質、または生物発光物質とのコンジュゲーションである、請求項46に記載の方法。

【請求項56】

前記改変が放射性物質とのコンジュゲーションである、請求項46に記載の方法。

【請求項57】

前記改変が治療剤とのコンジュゲーションである、請求項46に記載の方法。

【請求項58】

前記抗体が、薬学的組成物の状態で投与される、請求項1～57のいずれか一項に記載の方法。

【請求項59】

前記薬学的組成物が抗原もアレルゲンも含有しない、請求項58に記載の方法。

10

【請求項60】

前記薬学的組成物が、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片から本質的になる、請求項58に記載の方法。

【請求項61】

前記抗体またはその抗原結合性断片が抗原とコンジュゲートされていない、請求項1～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項62】

前記抗体が、ドックリン(dockerin)分子ともコヒーシン分子ともコンジュゲートされていない、請求項1～61のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項63】

TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片の治療的有効量を含む、薬学的組成物。

【請求項64】

前記TLRアゴニストが、TLR2アゴニスト、TLR7アゴニスト、およびTLR8アゴニストより選択される、請求項63に記載の薬学的組成物。

【請求項65】

前記TLRアゴニストがTLR2アゴニストである、請求項64に記載の薬学的組成物。

【請求項66】

前記TLR2アゴニストがPam3CSK4である、請求項65に記載の薬学的組成物。

30

【請求項67】

前記TLRアゴニストがTLR7アゴニストまたはTLR8アゴニストである、請求項64に記載の薬学的組成物。

【請求項68】

前記TLRアゴニストがssRNAおよびR848より選択される、請求項67に記載の薬学的組成物。

【請求項69】

前記TLRが、前記抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片とコンジュゲートされている、請求項63～68のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項70】

前記TLRが、前記抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片と化学的にコンジュゲートされている、請求項69に記載の薬学的組成物。

40

【請求項71】

前記抗体または前記抗原結合性断片が、デクチン-1と特異的に結合してデクチン-1を活性化する、請求項63～70のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項72】

前記抗体または前記抗原結合性断片が、抗原提示細胞上のデクチン-1を特異的に結合させて活性化する、請求項71に記載の薬学的組成物。

【請求項73】

前記抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項72に記載の薬学的組成物。

50

- 【請求項 7 4】  
前記樹状細胞が血液中に存在する、請求項73に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 7 5】  
前記樹状細胞が末梢血中に存在する、請求項74に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 7 6】  
前記樹状細胞が真皮樹状細胞である、請求項73に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 7 7】  
前記樹状細胞が骨髄樹状細胞である、請求項73～76のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 7 8】 10  
前記樹状細胞がIL-12を分泌する、請求項73～77のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 7 9】  
前記樹状細胞がmDC-1細胞である、請求項73～77のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 0】  
前記抗体またはその抗原結合性断片がヒトデクチン-1と結合する、請求項71～79のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 1】 20  
前記抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、抗体誘導體、ペニア抗体、ダイアボディ、モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体である、請求項63～80のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 2】  
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項81に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 3】  
前記抗体がヒト化抗体である、請求項81に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 4】  
前記抗体がマウス/ヒトのキメラ抗体である、請求項81に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 5】 30  
前記抗体が、SEQ ID NO : 2、4、6、8、10、および12の配列より選択されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項63～44のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 6】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 13～30のいずれか1つに対応するアミノ酸配列を有するCDRを含む、請求項63～85のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 7】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 13～15に対応するアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖、およびSEQ ID NO : 16～18に対応するアミノ酸配列を有する軽鎖を含む、請求項63～86のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 8】 40  
前記抗体が、SEQ ID NO : 19～21に対応するアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖、およびSEQ ID NO : 22～24に対応するアミノ酸配列を有する軽鎖を含む、請求項63～86のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 8 9】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 25～27に対応するアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖、およびSEQ ID NO : 28～30に対応するアミノ酸配列を有する軽鎖を含む、請求項63～86のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 9 0】  
前記抗体が、SEQ ID NO : 1、3、5、7、9、および11の配列より選択されるアミノ酸配列を有する重鎖または軽鎖を含む、請求項63～86のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 9 1】 50

前記抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片が 4定常領域を含む、請求項63～90のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項92】

前記 4定常領域が、残基235でのロイシンからグルタミン酸への置換を含む、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

前記 4定常領域が、ヒンジ領域内の残基228でのセリンからプロリンへの置換を含む、請求項91または92に記載の薬学的組成物。

【請求項94】

前記TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片が、対象におけるTh1細胞、Th17細胞、およびTreg細胞のうち1つまたは複数の増大のために有効な量である、請求項63～93のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

10

【請求項95】

皮内注射用に製剤化されている、請求項63～94のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項96】

静脈内注射用に製剤化されている、請求項63～94のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項97】

前記抗体または前記抗原結合性断片が改変をさらに含む、請求項63～96のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

20

【請求項98】

前記改変が、VHおよび/またはVLのCDR1領域内、CDR2領域内、および/またはCDR3領域内の保存的アミノ酸突然変異である、請求項97に記載の薬学的組成物。

【請求項99】

前記改変が、Fcヒンジ領域内の保存的アミノ酸突然変異である、請求項97に記載の薬学的組成物。

【請求項100】

前記改変がペグ化である、請求項97に記載の薬学的組成物。

【請求項101】

前記改変が血清タンパク質とのコンジュゲーションである、請求項97に記載の薬学的組成物。

30

【請求項102】

前記改変がヒト血清アルブミンとのコンジュゲーションである、請求項97に記載の薬学的組成物。

【請求項103】

前記改変が、検出可能な標識とのコンジュゲーションである、請求項97に記載の薬学的組成物。

【請求項104】

前記改変が診断剤とのコンジュゲーションである、請求項97に記載の薬学的組成物。

【請求項105】

前記改変が酵素とのコンジュゲーションである、請求項97に記載の薬学的組成物。

40

【請求項106】

前記改変が、蛍光物質、発光物質、または生物発光物質とのコンジュゲーションである、請求項97に記載の薬学的組成物。

【請求項107】

前記改変が放射性物質とのコンジュゲーションである、請求項97に記載の薬学的組成物。

【請求項108】

前記改変が治療剤とのコンジュゲーションである、請求項97に記載の薬学的組成物。

【請求項109】

50

抗原もアレルゲンも含有しない、請求項63～108のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項110】

TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片から本質的になる、請求項63～109のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項111】

前記抗体またはその抗原結合性断片が抗原とコンジュゲートされていない、請求項63～110のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項112】

前記抗体がドックリン分子ともコヒーシン分子ともコンジュゲートされていない、請求項63～111のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項113】

それを必要とする対象においてTh2型細胞応答を低下させるための方法であって、該対象に、請求項63～112のいずれか一項に記載の薬学的組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、方法。

【請求項114】

それを必要とする対象においてIgEレベルを低下させるための方法であって、該対象に、請求項63～112のいずれか一項に記載の薬学的組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、方法。

【請求項115】

それを必要とする対象においてアレルギー性障害を予防または治療するための方法であって、該対象に、請求項63～112のいずれか一項に記載の薬学的組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、方法。

【請求項116】

それを必要とする対象においてアレルギー性障害を予防もしくは治療するため、IgEレベルを低下させるため、および/またはTh2型細胞応答を低下させるための医薬の製造における、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項117】

それを必要とする対象においてアレルギー性障害を予防もしくは治療するため、IgEレベルを低下させるため、および/またはTh2型細胞応答を低下させるための、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2014年6月2日に提出された米国仮特許出願第62/006,575号に対する優先権の恩典を主張し、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)によって授与された助成金1R21AI101810-01の下で、政府の援助を受けて行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

1. 発明の分野

本発明は全体として、医学の分野に関する。より詳細には、本発明は、それを必要とする対象において病原性のまたは亢進したTh2型細胞応答を治療するための薬学的組成物に関する。

【背景技術】

【0004】

2. 背景

喘息およびアレルギー疾患、例えば、アレルギー性鼻炎(花粉症)、食物アレルギー、

10

20

30

40

50

およびアトピー性皮膚炎（湿疹）などは、米国ではあらゆる年齢層でよくみられる。例えば、喘息には1700万人を上回る成人および700万人を上回る小児が罹患している。花粉症、呼吸器アレルギーおよび他のアレルギーには、18歳未満の小児のおよそ10パーセントが罹患している。加えて、食物アレルギーにも、5歳未満の小児の推定5パーセントと、5～17歳の小児および成人の4パーセントが罹患している。

#### 【0005】

アレルギーは免疫系の過敏性障害である。症状には、眼充血、掻痒、鼻汁、湿疹、蕁麻疹、または喘息発作が含まれる。アレルギーは喘息などの状態において主な役割を果たしている。ある種の人々では、環境アレルゲンもしくは食物アレルゲンに対するまたは薬物療法に対する重度のアレルギーが、アナフィラキシーと呼ばれる命にかかわる反応を生じさせることがある。食物アレルギー、ならびにアシナガバチおよびハチなどの刺咬昆虫の毒液に対する反応には、これらの重度の反応が伴うことが相対的に多い。反応または不耐症のすべてがアレルギーの形態というわけではない。

10

#### 【0006】

アレルギー反応は、ある人の免疫系が環境内の通常は無害な物質に反応した場合に起こる。アレルゲン誘発性の病原性免疫応答は、アレルギー性アトピーおよび皮膚炎、アレルギー性鼻炎、ならびにアレルギー性喘息を含む、複数の種類のアレルギー疾患の主因である。そのようなアレルギー性免疫障害の病態生理は複雑であり、いくつかの要因、例えば、遺伝的感受性、年齢、ならびにアレルゲン曝露の経路および量などが関連していることが多い。アレルギー反応は、免疫グロブリンE（IgE）と呼ばれる抗体の一種による、マスト細胞および好塩基球と呼ばれる特定の白血球の過度の活性化がみられることから、他と明確に区別できる。この反応は、不快な程度から危険なものまでの範囲にわたる炎症反応をもたらす。

20

#### 【0007】

アレルギーのための治療には、既知のアレルゲンの回避、免疫系を非特異的に緩和するステロイド薬、ならびに症状を軽減する抗ヒスタミン薬および充血緩和剤などの薬物療法が含まれる。これらの薬物療法の多くは経口的に服用されるが、アナフィラキシー反応を治療するために用いられるエピネフリンは注射される。非特異的免疫抑制剤を用いるとアレルギー反応は軽減されうるが、病原性感染症に対する宿主の免疫が損なわれる可能性がある。その上、抗ヒスタミン薬などの薬物療法はアレルギー反応の症状を軽減するためには有用でありうるが、限られた期間しか、または集団のサブセットに対してしか作用しないことがある。このため、アレルギー反応の治療のための有効で特異的な治療法に対しては、当技術分野において必要性がある。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

本開示は、当技術分野においてアレルギー性疾患および炎症性疾患の治療のためのTh2経路の免疫調節物質による治療方法を提供することにより、前述の必要性に応える。本開示の局面は、それを必要とする対象においてTh2型細胞応答を低下させるための方法であって、対象に、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片の治療的有効量を投与する段階を含む、方法に関する。

40

#### 【0009】

「機能的に連結された」という用語は、標的部位での結合の前に2つの構成要素が組み合わされて活性複合体を形成する状況のことを指す。例えば、コヒーシン-ドックリン（dockerin）複合体を構成する二つのうち片方とコンジュゲートされた抗体と、コヒーシン-ドックリン複合体のもう片方と複合体化したTLRは、コヒーシン分子とドックリン分子の複合体化を通じて機能的に連結される。この用語は、2つの分子を一緒にコンジュゲートさせる共有結合または化学結合のことも指す。

#### 【0010】

1つのさらなる局面は、それを必要とする対象においてIgEレベルを低下させるための方法であって、対象に、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその

50

抗原結合性断片の治療的有効量を投与する段階を含む、方法に関する。

【0011】

他の局面は、それを必要とする対象においてアレルギー性障害を予防または治療するための方法であって、対象に、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片の治療的有効量を投与する段階を含む、方法に関する。アレルギー性障害は、亢進したもしくは病原性のTh2型細胞応答または増大したIgEレベルを有すると特徴づけられるものであってよい。

【0012】

TLRアゴニストは、本明細書に記載されるかまたは当技術分野において公知であるものであってよい。ある特定の態様において、TLRアゴニストは、TLR2アゴニスト、TLR7アゴニスト、またはTLR8アゴニストより選択される。1つの態様において、TLRアゴニストはTLR2アゴニストである。1つのさらなる態様において、TLRアゴニストはPam3CSK4である。他の態様において、TLRアゴニストはTLR7アゴニストまたはTLR8アゴニストである。いくつかの態様において、TLR7またはTLR8アゴニストは、ssRNAおよびR848より選択される。いくつかの態様において、TLRアゴニストは抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片とコンジュゲートされている。さらなる態様において、TLRアゴニストは抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片と化学的にコンジュゲートされている。

10

【0013】

Pam3CSK4は、細菌LPのアシル化アミノ末端を模した合成トリアシル化リポペプチド(LP)である。Pam3CSK4は、炎症誘発性転写因子NF- $\kappa$ Bの強力な活性化物質である。活性化は、細菌LPに特徴的な構造である3つの脂肪酸を有するLPを認識する、TLR2とTLR1との相互作用によって媒介される。Pam3CSK4の化学名は、N-パルミトイル-S-[2,3-ビス(パルミトイルオキシ)-(2RS)-プロピル]-[R]-システニル-[S]-セリル-[S]-リシル-[S]-リシル-[S]-リシル-[S]-リジンである。Pam3CSK4はまた、本明細書および当技術分野において「Pam3」と称されることもある。

20

【0014】

ある特定の態様において、抗体または抗原結合性断片は、デクチン-1と特異的に結合して、デクチン-1を介して細胞を活性化する。さらなる態様において、抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトデクチン-1と結合してヒトデクチン-1を活性化する。デクチン-1は、ヒトにおいてCLEC7A遺伝子によってコードされるタンパク質である。この遺伝子は、C型レクチン/C型レクチン様ドメイン(CTL/CTLD)スーパーファミリーのメンバーをコードする。コードされる糖タンパク質は細胞外C型レクチン様ドメインフォールド、および免疫受容活性化チロシンモチーフを有する細胞質ドメインを有する、小型のII型膜受容体である。これは真菌由来および植物由来の種々の-1,3結合型グルカンおよび-1,6結合型グルカンを認識するパターン認識受容体として機能し、このようにして先天性免疫応答において役割を果たす。発現は、骨髄樹状細胞上、単球上、マクロファージ上、およびB細胞上で認められる。いくつかの態様において、抗体または抗原結合性断片は、抗原提示細胞上のデクチン-1を特異的に結合させて活性化する。さらなる態様において、抗原提示細胞は樹状細胞である。さらに別の態様において、樹状細胞は、血液中に存在するか、末梢血中に存在するか、真皮樹状細胞であるか、骨髄樹状細胞、IL-12を分泌する樹状細胞であるか、またはmDC-1細胞である。デクチン-1は、免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)様モチーフをその細胞内尾部(これは細胞活性化に關与する)に含み、かつ単一のC型レクチン様ドメイン(糖質認識ドメイン、CRD)を細胞外領域(T細胞上の-グルカンおよび内因性リガンドを認識した)に含む、膜貫通タンパク質である。CRDはストーク領域によって膜から隔てられている。CLEC7Aは、ストーク領域内にN結合型グリコシル化部位と推定される部位を含む。

30

40

【0015】

さらなる態様において、デクチン-1抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、SEQ ID NO: 1~12(またはこの中から派生する任意の範囲)のいずれかのデクチン-1抗体または抗原結合性断片に対して、少なくともまたは最大で70%、75%、80%、85%、90%

50

、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるかまたは類似しているアミノ酸配列を含む。さらなる態様において、デクチン-1抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、SEQ ID NO：2、4、6、8、10、および12のいずれかのデクチン-1抗体コンジュゲート抗体または抗原結合性断片に対して、少なくともまたは最大で70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%（またはその中に導き出せる任意の範囲で）同一であるかまたは類似しているアミノ酸配列を含む可変領域を含む。さらなる態様において、抗体は、SEQ ID NO：13～30のいずれか1つに対応するアミノ酸配列を有するCDRを含む。さらなる態様において、デクチン-1抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、SEQ ID NO：1、3、5、7、9、および11のいずれかのデクチン-1抗体または抗原結合性断片に対して、少なくともまたは最大で70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%（またはこの中から派生する任意の範囲）同一であるかまたは類似している重鎖または軽鎖アミノ酸配列を含む。ある特定の態様において、抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、デクチン-1抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域由来のCDR1、CDR2、および/またはCDR3を含む。いくつかの態様において、抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、SEQ ID NO：13～15、19～21、または25～27のCDRを含む重鎖を含む。いくつかの態様において、抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、SEQ ID NO：16～18、22～24、または28～30のCDRを含む軽鎖を含む。ある特定の態様において、抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、デクチン-1抗体の軽鎖可変領域由来の3つすべてのCDRおよび/または重鎖可変領域由来の3つすべてのCDRを含む。いくつかの態様において、抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、SEQ ID NO：13～15のCDRを含む重鎖、およびSEQ ID NO：16～18のCDRを含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、SEQ ID NO：19～21のCDRを含む重鎖、およびSEQ ID NO：22～24のCDRを含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、抗体コンジュゲートまたはその抗原結合性断片は、SEQ ID NO：25～27のCDRを含む重鎖、およびSEQ ID NO：28～30のCDRを含む軽鎖を含む。

10

20

#### 【0016】

本明細書に記載のデクチン-1抗体コンジュゲートまたは1つもしくは複数の抗原結合性断片は、SEQ ID NO：1～12のいずれかの少なくともまたは最大で3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000個、もしくはそれ以上の連続したアミノ酸の中に、またはこの中から派生する任意の範囲の中に、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、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個、またはそれ以上の変異体アミノ酸（またはこの中から派生する任意の範囲）を含みうる。

30

40

50

## 【0017】

他の態様において、抗体が 4定常領域を含んでもよい。1つの関連した態様において、4定常領域は残基235でのロイシンからグルタミン酸への置換を含む。別の態様において、4定常領域はヒンジ領域内の残基228でのセリンからプロリンへの置換を含む。

## 【0018】

本明細書に記載の方法の1つの態様において、対象はヒト対象である。「対象」、「個体」、または「患者」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、脊椎動物、例えば霊長動物、哺乳動物、または好ましくはヒトのことを指す。哺乳動物には、ウマ科動物、イヌ科動物、ウシ科動物、ヒツジ、ネズミ科動物、ラット、サル、ヒト、家畜、競技用動物、および愛玩動物が非限定的に含まれる。

10

## 【0019】

ある特定の態様において、対象は、アレルギー性障害またはTh2媒介アレルギー性障害に罹患しているか、またはそれらに罹患するリスクを有するものである。他の態様において、対象は、炎症性障害またはTh2媒介炎症性障害に罹患しているか、またはそれらに罹患するリスクを有する。さらなる態様において、Th2応答はTh2媒介炎症反応である。特定の態様において、対象は炎症性障害の1つもしくは複数の症状を呈するか、または炎症性障害に罹患した病歴を有する。

## 【0020】

ある特定の態様において、Th2媒介炎症性障害は、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease)、間質性肺疾患、慢性的閉塞性肺疾患 (chronic obstructive lung disease)、慢性気管支炎、好酸球性気管支炎、好酸球性肺炎、肺炎、炎症性腸疾患、アトピー性皮膚炎、アトピー、アレルギー、アレルギー性鼻炎、特発性肺線維症、硬皮症、肺気腫、乳癌、および潰瘍性大腸炎などより選択される。具体的な態様において、Th2媒介炎症性障害は乳癌である。さらなる態様において、Th2媒介炎症性障害は潰瘍性大腸炎である。列挙されたTh2媒介炎症性障害の1つまたは複数が、本明細書において考察される態様において除外されうることも明確に想定している。

20

## 【0021】

さらになお他の態様が、1型糖尿病に罹患しているかまたは1型糖尿病を発症するリスクがある対象を治療する方法を含んでもよい。本明細書に記載の組成物および抗体コンジュゲートを、1型糖尿病の炎症性局面および/またはTh2媒介局面を治療するために用いてもよい。

30

## 【0022】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、投与は、アレルギーおよび/または炎症反応の発現の前に行われる。さらなる態様において、投与は、アレルギーおよび/または炎症反応の発現後に行われる。

## 【0023】

さらなる態様において、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片は、対象におけるTh1細胞、Th17細胞、およびTreg細胞のうち1つまたは複数の増大のために有効な量で投与される。ある特定の態様において、Th2細胞応答はCD4<sup>+</sup> T細胞を含む。

40

## 【0024】

TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片は薬学的組成物の状態で投与されてもよい。ある特定の局面において、薬学的組成物は抗原もアレルギーも含有しない。いくつかの態様において、薬学的組成物は、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片から本質的になる。さらなる態様において、TLRアゴニストと機能的に連結された抗体またはその抗原結合性断片は、抗原とコンジュゲートされておらず、ドックリン分子ともコヒーシン分子ともコンジュゲートされていない。さらなる態様において、TLRアゴニストと機能的に連結された抗体またはその抗原結合性断片は、抗原とも、ドックリン分子ともコヒーシン分子とも共有結合的にも機能的にも連結されていない。

50

## 【0025】

本明細書には、上記のようなTLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片を含む薬学的組成物も記載される。

## 【0026】

本開示はまた、それを必要とする対象においてアレルギー性障害を予防もしくは治療するため、IgEレベルを低下させるため、および/またはTh2型細胞応答を低下させるための医薬の製造における、本明細書に記載されたTLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片にも関する。

## 【0027】

本開示はまた、それを必要とする対象においてアレルギー性障害を予防もしくは治療するため、IgEレベルを低下させるため、および/またはTh2型細胞応答を低下させるための、本明細書に記載されたTLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片の使用にも関する。

10

## 【0028】

本明細書において用いる場合、「1つ(a)」または「1つの(an)」は、1つまたは複数を意味しうる。特許請求の範囲において用い、「含む(comprising)」という語とともに用いる場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」という語は、1つまたは複数を意味しうる。

## 【0029】

本開示は選択肢のみおよび「および/または」を指すという定義を支持しているが、特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、選択肢のみを指すように明示されているかまたはその選択肢が相互排他的である場合を除いて、「および/または」を意味するために使用される。本明細書で用いられる場合、「別の」とは少なくとも第2またはそれ以上のものを意味しうる。

20

## 【0030】

本出願の全体を通じて、「約」という用語は、ある値が、その値を決定するために使用される方法、装置の固有の誤差の変動、または研究対象に存在する変動を含むことを指し示すために用いられる。

## 【0031】

本発明の他の目的、特徴、および利点は以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし、本発明の趣旨および範囲内にあるさまざまな変更および修正がこの詳細な説明から当業者に明らかであるため、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい態様を示してはいるが、例としてのみ提供されていることが理解されるべきである。列挙された態様において具体的に列記されたいずれかの要素を、ある特定の態様から明確に除外することも想定している。例えば、ある特定の態様は、抗原を含む組成物に関しうる。さらなる態様は、抗原も抗原の投与も含まない組成物および方法に関する。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0032】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のある特定の局面をさらに示すために含まれる。本発明は、これらの図面の1つまたは複数を、本明細書に提示された具体的な態様の詳細な説明と組み合わせて参照することによって、より十分に理解されうる。

40

【図1-1】抗デクチン-1抗体に対するPam3の化学的コンジュゲーションの例示的な方法が示されている。溶解性を高める一助として、かつ複数のpam3分子の架橋を防ぐために、リンカーをpam3CSK4に付着させる。ホスフィン基をデクチン-1に付加すると、それはPam3CSK3上の遊離アジドと反応することができ、それ故に2つの化合物同士のコンジュゲートが生じる。

【図1-2】抗デクチン-1抗体に対するPam3の化学的コンジュゲーションの例示的な方法が示されている。溶解性を高める一助として、かつ複数のpam3分子の架橋を防ぐために、リンカーをpam3CSK4に付着させる。ホスフィン基をデクチン-1に付加すると、それはPam3CSK3上の遊離アジドと反応することができ、それ故に2つの化合物同士のコンジュゲ

50

トが生じる。

【図1-3】抗デクチン-1抗体に対するPam3の化学的コンジュゲーションの例示的な方法が示されている。溶解性を高める一助として、かつ複数のpam3分子の架橋を防ぐために、リンカーをpam3CSK4に付着させる。ホスフィン基をデクチン-1に付加すると、それはPam3CSK3上の遊離アジドと反応することができ、それ故に2つの化合物同士のコンジュゲーションが生じる。

【図1-4】抗デクチン-1抗体に対するPam3の化学的コンジュゲーションの例示的な方法が示されている。溶解性を高める一助として、かつ複数のpam3分子の架橋を防ぐために、リンカーをpam3CSK4に付着させる。ホスフィン基をデクチン-1に付加すると、それはPam3CSK3上の遊離アジドと反応することができ、それ故に2つの化合物同士のコンジュゲーションが生じる。

10

【図2】デクチン-1-pam3では結合性が全く失われておらず、TLR2活性も比較的不変である。(図2A) PBMCにおける抗体およびpam3コンジュゲートの結合能。(図2B) 漸増量のデクチン-1、pam3またはデクチン-1-pam3のいずれかを用いた場合のTLR2レポーター細胞。

【図3】抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートが、mDCを含む抗原提示細胞を効率的に活性化しうることを示している。

【図4A】デクチン-1-pam3コンジュゲートが、血中mDC上のTSLP誘発性OX40L発現を減少させることを示している。mDCをまずパuffyコートから精製し、続いて、20ng/mLのTSLP、および100ng/mLのpam3、10μg/mLの抗デクチン-1または10μg/mLのデクチン-1-pam3のいずれかとともに培養した。細胞を採取して、48時間後に染色した。mDC染色。

20

【図4B】デクチン-1-pam3コンジュゲートが、血中mDC上のTSLP誘発性OX40L発現を減少させることを示している。mDCをまずパuffyコートから精製し、続いて、20ng/mLのTSLP、および100ng/mLのpam3、10μg/mLの抗デクチン-1または10μg/mLのデクチン-1-pam3のいずれかとともに培養した。細胞を採取して、48時間後に染色した。まとめ結果。

【図5】抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートの処理により、Th2型T細胞応答の低下が起こったことを示している。

【図6-1】PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>CK-ビオチン産物のクロマトグラムおよび質量スペクトルを示している。

30

【図6-2】PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>CK-ビオチン産物のクロマトグラムおよび質量スペクトルを示している。

【図7-1】PAM3-ビオチン-DBCO産物のクロマトグラムを示している。

【図7-2】PAM3-ビオチン-DBCO産物のクロマトグラムを示している。

【図8A】デクチン-1活性化に対するTLR2-Lの添加が、HA-1特異的Th2型CD4<sup>+</sup>T細胞応答の低下を招くことを示している。CFSE標識したCD4<sup>+</sup>T細胞を、デクチン-1-HAのみまたはデクチン-1-HA+TLR2-Lのいずれかを添加したDCと7日間共培養した。

【図8B】デクチン-1活性化に対するTLR2-Lの添加が、HA-1特異的Th2型CD4<sup>+</sup>T細胞応答の低下を招くことを示している。T細胞をHA1ペプチドで再刺激して、サイトカインレベルをLuminexによって分析した。

40

【図9A-1】デクチン-1-Pam3は、細胞を漸増量依存的な様式で活性化する。PBMCを24~48時間培養し、続いて上清をLuminex分析のために採取した。

【図9A-2】デクチン-1-Pam3は、細胞を漸増量依存的な様式で活性化する。PBMCを24~48時間培養し、続いて上清をLuminex分析のために採取した。

【図9B-1】デクチン-1-Pam3は、細胞を漸増量依存的な様式で活性化する。mDCを24~48時間培養し、続いて上清をLuminex分析のために採取した。

【図9B-2】デクチン-1-Pam3は、細胞を漸増量依存的な様式で活性化する。mDCを24~48時間培養し、続いて上清をLuminex分析のために採取した。

【図10A】デクチン-1-pam3コンジュゲートはTSLP-mDC誘発性T<sub>H</sub>2型CD4<sup>+</sup>T細胞応答を

50

低下させることができるが、その一方で $T_H1$ 型および $T_H17$ 型の $CD4^+$  T細胞応答は促進する。mDCをまず40ng/mLのTSLP、および20 ug/mLのデクチン-1またはデクチン-1-pam3のいずれかによって初回刺激した。24時間後に、ナイーブ $CD4^+$  T細胞をmDCに添加して、さらに6日間培養した。PMA/イオノマイシンで6時間、プレフェルジンAで4時間刺激した細胞において、細胞内サイトカインレベルを細胞内染色によって分析した。

【図10B】デクチン-1-pam3コンジュゲートはTSLP-mDC誘発性 $T_H2$ 型 $CD4^+$  T細胞応答を低下させることができるが、その一方で $T_H1$ 型および $T_H17$ 型の $CD4^+$  T細胞応答は促進する。mDCをまず40ng/mLのTSLP、および20 ug/mLのデクチン-1またはデクチン-1-pam3のいずれかによって初回刺激した。24時間後に、ナイーブ $CD4^+$  T細胞をmDCに添加して、さらに6日間培養した。細胞をCD3/CD28ビーズで48時間刺激することによって細胞上清のサイトカインレベルを測定した。

10

【図11A】デクチン-1-pam3処理により、インビボでのNHPにおけるHDMA特異的血清IgEが減少する。動物をHDMAに感作させることにより、アトピーのNHPモデルを作製した。矢印はデクチン-1-pam3を与えた時点を示している。

【図11B】デクチン-1-pam3処理により、インビボでのNHPにおけるHDMA特異的血清IgEが減少する。HDMA特異的血清IgEレベル。矢印はデクチン-1-pam3を与えた時点を示している。

【図12】カードランによって活性化されたDCは、抗原特異的 $TH2$ 応答の低下をもたらす。抗原(Flu HA1)およびカードランを樹状細胞および $CD4^+$  T細胞とともにインキュベートし、その後HA-1由来ペプチドで再刺激した。IFN、IL-4、IL-5およびIL-13などのFlu HA1特異的 $CD4^+$  T細胞応答。

20

【図13】カードランは全体的な $TH2$ 応答を下方制御する。抗DC受容体抗原(Flu HA1)を樹状細胞および $CD4^+$  T細胞とともにインキュベートし、その後PMA/イオノマイシンで再刺激した。続いて細胞をIL-13およびIL-5に関して免疫染色した。カードランで処理した培養物ではIL-13+細胞のパーセンテージが有意に低下した。

【図14】図11Aに図示したアトピーのNHPモデルの血清からの細胞内サイトカイン染色のデータを示している。

【発明を実施するための形態】

【0033】

例示的な態様の説明

30

本明細書に記載の方法および組成物は、炎症性障害およびアレルギー性障害を治療するために用いることができる。TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体の投与は、アレルギー特異的 $Th2$ 型免疫応答を抑制するために有用であることが発見された。図5に示されているように、Pam3とコンジュゲートされた抗デクチン-1は $Th2$ 型T細胞応答を低下させたが、抗デクチン-1およびPam3を含むコンジュゲートされていない対応する組成物は $Th2$ 型T細胞応答を低下させることができなかった。いかなる科学的理論にも限定されることはないが、そのような抗体コンジュゲートは細胞の特定サブセット(すなわち、デクチン-1およびTLRを発現する細胞)を標的とする能力があると考えられており、コンジュゲートされていない対応物と比較して、治療効果を達成するために必要な有効濃度が低くなりうる。その上、細胞の特定サブセットを標的とする能力により、コンジュゲート

40

【0034】

I. 抗体

本開示の方法および組成物は、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体およびその抗体結合性断片に関する。本明細書において用いる場合、「抗体」には、全長抗体およびそれらの任意の抗原結合性断片または単鎖が含まれる。したがって、「抗体」という用語には、免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含む任意のタンパク質またはペプチド含有分子が含まれる。そのようなものの例には、重鎖もしくは軽鎖もしくはそれらのリガンド結合部分の相補性決定領域(CDR)、重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域、

50

重鎖定常領域もしくは軽鎖定常領域、フレームワーク（FR）領域もしくはその任意の部分、または結合性タンパク質の少なくとも1つの部分が非限定的に含まれる。

【0035】

抗体は本明細書に記載のさまざまな抗体のいずれであってもよく、そのようなものの非限定的な例には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ベニア抗体（veneered antibody）、ダイアボディ、ヒト化抗体、抗体誘導體、組換えヒト化抗体、またはそれらのそれぞれの誘導體もしくは断片が含まれる。

【0036】

抗体は、当技術分野において公知であって文献中に十分に記載されている従来の手法を用いて作製することができる。ポリクローナル抗体の作製のためには、いくつかの方法が存在する。例えば、ポリクローナル抗体は典型的には、適した哺乳動物、例えば、限定はされないが、ニワトリ、ヤギ、モルモット、ハムスター、ウマ、マウス、ラットおよびウサギなどの免疫処置によって作製される。抗原を哺乳動物に注入し、抗原に対して特異的な免疫グロブリンを産生するようにBリンパ球を誘導する。免疫グロブリンを哺乳動物の血清から精製する。この方法の一般的な変法には、最適な産生および動物の人道的な処置のための、アジュバント、投与の経路および部位、部位あたりの注射体積および動物あたりの部位数の変更が含まれる。例えば、アジュバントは典型的には、抗原に対する免疫応答を改善または増強するために用いられる。ほとんどのアジュバントは注射部位に抗原デポーをもたらし、これは流入領域リンパ節内への抗原の徐放を可能にする。他のアジュバントには、広い表面積にわたるタンパク質抗原分子および免疫賦活性分子の濃縮を促進する界面活性剤が含まれる。ポリクローナル抗体を産生するためのアジュバントの非限定的な例には、フロイントアジュバント、Ribiアジュバント系、およびTitermaxが含まれる。ポリクローナル抗体は、米国特許第7,279,559号；同第7,119,179号；同第7,060,800号；同第6,709,659号；同第6,656,746号；同第6,322,788号；同第5,686,073号；および同第5,670,153号に記載された方法を用いて作製することができる。

10

20

【0037】

別に指定する場合を除き、抗体はポリクローナル性またはモノクローナル性であってもよく、任意の適した生物供給源、例えば、ネズミ科動物、ラット、メンヨウ（sheep）、またはイヌ科動物などから単離することができる。

【0038】

1つの具体的な態様において、抗体はモノクローナル抗体である。本明細書において用いる場合、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体集団から得られた抗体のことを指す。モノクローナル抗体は、それぞれのモノクローナル抗体が抗原上の単一の決定基を対象とするので、高度に特異的である。抗体は、例えば、放射性同位体、検出可能な産物を生成する酵素、蛍光タンパク質などを用いて検出可能に標識することができる。抗体は、さらに他のモイエティー、例えば、特異的結合対のメンバー、例えば、ビオチン（ビオチン-アビジン特異的結合対のメンバー）などとコンジュゲートさせることができる。また、抗体を、ポリスチレン製のプレートまたはビーズなどを非限定的に含む固体支持体と結合させることもできる。

30

【0039】

モノクローナル抗体は、当技術分野において公知であって文献中に十分に記載されている従来のハイブリドーマ手法を用いて作製することができる。例えば、ハイブリドーマは、適した不死細胞株（例えば、骨髓腫細胞株、例えば、限定はされないが、Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L.5、P3X63Ag8,653、Sp2 SA3、Sp2 MA1、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U397、MIA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 313、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A、CHO、PerC.6、YB2/0など）など、またはヘテロミエローマ、それらの融合産物、またはそれらから派生する任意の細胞または融合細胞、または当技術分野において公知の任意の他の適した細胞系を、抗体産生細胞、例えば、限定はされないが、単離もしくはクローン化された脾臓、末梢血、扁桃、または他の免疫細胞もしくはB細胞を含む細胞と融合させること、あるいは、内因性または異種の核酸と

40

50

して、組換え性もしくは内因性のウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫、爬虫類、魚類、哺乳類、齧歯類、ウマ、ヒツジ、ヤギ、メンヨウ、霊長動物、真核生物のゲノムDNA、cDNA、rDNA、ミトコンドリアDNAまたはRNA、葉緑体DNAまたはRNA、hnRNA、mRNA、tRNA、一本鎖、二本鎖もしくは三本鎖、ハイブリダイズ性、およびそれらの任意の組み合わせなどとして、重鎖または軽鎖の定常配列または可変配列またはフレームワーク配列またはCDR配列を発現する、任意の他の細胞と融合させることによって作製される。また、抗体産生細胞を、関心対象の抗原による免疫処置を行ったヒトまたは他の適した動物の末梢血、または好ましくは脾臓またはリンパ節から得ることもできる。任意の他の適した宿主細胞を、抗体、その特定の断片または変異体をコードする異種性または内因性の核酸を発現させるために用いることもできる。融合細胞（ハイブリドーマ）または組換え細胞は

10

**【 0 0 4 0 】**

必要な特異性を有する抗体を作製または単離する他の適した方法を用いることもでき、それには、当技術分野において公知の方法を用いて、ペプチドまたはタンパク質ライブラリー（例えば、限定はされないが、バクテリオファージ、リボソーム、オリゴヌクレオチド、cDNAなどのディスプレイライブラリー；例えば、MorphoSys (Martinsreid / Planegg, Del.)、Bio Invent (Lund, Sweden)、Affitech (Oslo, Norway) などのさまざまな製造販売元から入手しうるもの）から組換え抗体を選択する方法が非限定的に含まれる。当技術分野において公知の方法は特許文献に記載されており、そのいくつかには、米国特許第4,704,692号；同第5,723,323号；同第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,817,483号；同第5,824,514号；同第5,976,862号が含まれる。代替的な方法は、当技術分野において公知である、かつ/または本明細書において記載されているように、ヒト抗体のレポーターを産生しうるトランスジェニック動物（例えば、SCIDマウス、Nguyen et al. (1977) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907 (1997)；Sandhu et al. (1996) *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:95-118；Eren et al. (1998) *Mumma* 93:154-161) の免疫処置に依拠している。そのような手法には、リボソームディスプレイ Wanes et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4937-4942；Hanes et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14130-14135)；単細胞抗体産生技術（例えば、選択リンパ球抗体法（「SLAM」）（米国特許第5,627,052号，Wen et al., (1987) *J. Immunol* 17:887-892；Babcook et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848)；ゲル微小液滴およびフローサイトメトリー（Powell et al. (1990) *Biotechnol.* 8:333-337；One Cell Systems (Cambridge, Mass).；Gray et al. (1995) *J. Imm. Meth.* 182:155-163；およびKenny et al., (1995) *Bio. Technol.* 13:787-790)；B細胞選択（Steenbakkers et al. (1994) *Molec. Biol. Reports* 19:125-134) が非限定的に含まれる。

20

30

**【 0 0 4 1 】**

本明細書において用いる「ポリクローナル抗体」または「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、異なるB細胞系に由来する抗体の調製物のことを指す。それらは、それぞれが異なるエピトープを認識する、特異的抗原に対して分泌された免疫グロブリン分子の混合物である。

40

**【 0 0 4 2 】**

「マウス抗体」という用語は、本明細書において用いる場合、マウス生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことを意図している。

**【 0 0 4 3 】**

本明細書において用いる場合、キメラ抗体とは、その軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子が、典型的には遺伝子工学によって、異なる種に属する抗体可変領域遺伝子および定常領域遺伝子から構築されている抗体のことである。1つの態様において、抗体はマウス/ヒトのキメラ抗体である。

**【 0 0 4 4 】**

さらなる態様において、抗体は改変を含み、「抗体誘導体」である。「抗体誘導体」と

50

いう用語は、抗体または断片の直鎖状ポリペプチド配列への翻訳後改変が含まれる。例えば、米国特許第6,602,684 B1号は、免疫グロブリンのFc領域に等価な領域を含み、Fe媒介細胞毒性が強化された、全長抗体分子、抗体断片または融合タンパク質を含む改変グリコール形態の抗体の作製方法、およびそのように作製された糖タンパク質を記載している。

【0045】

本明細書において提供される抗体には、抗体が抗イディオタイプ応答を生じることを共有結合が妨げないように、抗体に対する任意の種類の子の共有結合によって改変された誘導体も含まれる。抗体誘導体には、抗体誘導体には、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/遮断基による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞内リガンドまたは他のタンパク質との連結などによって改変された抗体が非限定的

10

【0046】

そのような抗体をその乳中に産生するトランスジェニック動物または哺乳動物、例えばヤギ、ウシ、ウマ、メンヨウなどを得るために、抗体をコードするポリヌクレオチドを適した宿主に送達することによって抗体誘導体を調製することもできる。これらの方法は当技術分野において公知であり、例えば米国特許第5,827,690号；同第5,849,992号；同第4,873,316号；同第5,849,992号；同第5,994,616号；同第5,565,362号；および同第5,304,489号に記載されている。

【0047】

そのような抗体、特定の部分、または変異体を、植物部分またはそれらから培養された細胞において産生する、トランスジェニック植物および培養植物細胞（例えば、限定はされないが、タバコ、トウモロコシ、およびウキクサなど）を得るためにポリヌクレオチドを送達することによって、抗体誘導体を調製することもできる。抗体誘導体はまた、タバコ種子およびジャガイモ塊茎を含め、単鎖抗体（scFv）などの抗体断片を含むトランスジェニック植物の種子からも大量に産生されている。例えば、Conrad et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109、およびその中に引用された参照文献を参照されたい。このように、抗体を、公知の方法に従ってトランスジェニック植物を用いて産生させることもできる。

20

【0048】

例えば、免疫原性を改変するために、または結合性、親和性、オン速度、オフ速度、結合力、特異性、半減期、もしくは他の任意の適した特徴を低下させるため、強化するため、もしくは改変するために外因性配列を付加することによって、抗体誘導体を作製することもできる。一般に、非ヒトまたはヒトのCDR配列のうちの一部または全部を維持しながら、その一方で可変領域および定常領域の非ヒト配列をヒトアミノ酸または他のアミノ酸で置き換える。

30

【0049】

「可変領域」という用語は、抗体に抗原と結合するためのその特異性を与える、抗体の一部分のことを指す。可変領域は典型的には、重鎖および軽鎖の末端に位置する。軽鎖（VL）および重鎖（VH）上にそれぞれ3つある鎖の可変ループが、抗原に対する結合を担当する。これらのループは「相補性決定領域」（CDR）と呼ばれる。

40

【0050】

一般に、CDR残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接的かつ最も実質的に関与している。抗体のヒト化または操作は、任意の公知の方法、例えば、限定はされないが、米国特許第5,723,323号；同第5,976,862号；同第5,824,514号；同第5,817,483号；同第5,814,476号；同第5,763,192号；同第5,723,323号；同第5,766,886号；同第5,714,352号；同第6,204,023号；同第6,180,370号；同第5,693,762号；同第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,225,539号；および同第4,816,567号に記載されたものを用いて行うことができる。

【0051】

「定常領域」という用語は、同じアイソタイプのすべての抗体において同一である、抗体の一部分のことを指す。定常領域は、異なるアイソタイプの抗体では異なる。

50

## 【0052】

1つの態様において、抗体はヒト化抗体である。本明細書において用いる場合、「ヒト化抗体」または「ヒト化免疫グロブリン」という用語は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するヒト/非ヒトのキメラ抗体を指す。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、ウサギなど、または非ヒト霊長類の可変領域由来の残基と交換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体においては見いだされない残基を含んでよい。ヒト化抗体は、場合によって、一般にはヒト免疫グロブリンの、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分も含んでよい。非ヒト抗体は、フレームワーク領域、定常領域またはCDRに、ヒト抗体由来の同様に位置づけられたアミノ酸と置換されている1つまたは複数のアミノ酸を含有する。一般に、ヒト化抗体は、同じ抗体の非ヒト化型と比較して、ヒト宿主において生じる免疫応答を減少させることが予測される。ヒト化抗体は、抗原結合性または他の抗体機能に対する影響を実質的に有さない保存されたアミノ酸置換を有しうる。保存された置換のグループ分けには、以下が含まれる：グリシン-アラニン、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、セリン-トレオニンおよびアスパラギン-グルタミン。

10

## 【0053】

キメラ抗体、ヒト化抗体、または霊長類化抗体は、標準的な分子生物学手法を用いて調製された参照モノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAを関心対象のハイブリドーマから入手し、標準的な分子生物学の手法を用いて、非参照（例えば、ヒト）免疫グロブリン配列を含むように操作することができる。例えば、キメラ抗体を作製するためには、当技術分野において公知の方法を用いて、マウス可変領域をヒト定常領域と連結させることができる（米国特許第4,816,567号）。ヒト化抗体を作製するためには、当技術分野において公知の方法を用いて、マウスCDR領域をヒトフレームワークに挿入することができる（米国特許第5,225,539号ならびに米国特許第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,693,762号；および同第6,180,370号）。同様に、霊長類化抗体を作製するためには、当技術分野において公知の方法を用いて、マウスCDR領域を霊長動物フレームワークに挿入することができる（WO 93/02108およびWO 99/55369）。可変領域の配列からCDRを決定する方法は、当技術分野において公知である（例えば、参照により本明細書に組み入れられるZhao and Lu, "A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions." *Mol. Immunol.*, (2010) 47(4):694-700を参照されたい。）。

20

30

## 【0054】

部分的ヒト抗体から完全ヒト抗体までを作製するための手法は当技術分野において公知であり、そのようなあらゆる手法を用いることができる。1つの態様によれば、完全ヒト抗体配列を、ヒト重鎖抗体遺伝子およびヒト軽鎖抗体遺伝子を発現するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて作らせる。種々のクラスの抗体を産生しうる、複数のそのようなトランスジェニックマウス系統が作製されている。所望の抗体を産生するトランスジェニックマウス由来のB細胞を融合させて、所望の抗体の持続的産生のためのハイブリドーマ細胞株を作製することができる（例えば、Russel et al. (2000) *Infection and Immunity* April 2000:1820-1826; Gallo et al. (2000) *European J. of Immun.* 30:534-540; Green (1999) *J. of Immun. Methods* 231: 11-23; Yang et al. (1999A) *J. of Leukocyte Biology* 66:401-410; Yang (1999B) *Cancer Research* 59(6): 1236-1243; Jakobovits (1998) *Advanced Drug Reviews* 31:33-42; Green and Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188(3):483-495; Jakobovits (1998) *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4):607-614; Tsuda et al. (1997) *Genomics* 42:413-421; Sherman-Gold (1997) *Genetic Engineering News* 17(14); Mendez et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Jakobovits (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV*, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) *Current Opinion in Biotechnology* 6:561-566;

40

50

Mendez et al, (1995) *Genomics* 26:294-307 ; Jakobovits (1994) *Current Biology* 4(8) :761-763 ; Arbones et al. (1994) *Immunity* 1(4):247-260 ; Jakobovits (1993) *Nature* 362(6417):255-258 ; Jakobovits et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(6):2551-2555 ; および米国特許第6,075,181号を参照されたい)。

【0055】

キメラ抗体を作製するために抗体を改変することもできる。キメラ抗体とは、抗体の重鎖および軽鎖のさまざまなドメインが複数の種由来のDNAによってコードされる抗体のことである。例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい。

【0056】

または、抗体を、ベニア抗体を作製するために修飾することもできる。ベニア抗体とは、第1の種の抗体が第2の種において免疫原性とならず、その結果、この抗体の免疫原性が低下するように、1つの種の抗体の外部のアミノ酸残基が第2の種の外部のアミノ酸残基によって慎重に置き換えられているかまたは「ベニア化」されている (veneered) 抗体のことである。タンパク質の免疫原性は、主としてその表面の性質に依存するので、別の哺乳動物種の抗体中に通常見いだされる残基とは異なる露出残基を置き換えることによって抗体の免疫原性を低下させようと考えられる。このように外部残基を適切な判断で置き換えることによって内部ドメインまたはドメイン間の接合部にはほとんどまたは全く影響が及ばないはずである。このため、可変領域のフレームワーク残基に限定される変更の結果として、リガンドの結合特性に影響が及ぶことはないはずである。変更されるのは抗体の外面または外殻 (skin) だけであり、支持残基は乱されずに維持されるので、この工程は「ベニア化」と称される。

【0057】

「ベニア化」のための手順には、Kabat et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological interest*, 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health、このデータベースのアップデート版、ならびに米国および海外の使用可能な他のデータベース (核酸およびタンパク質の両方) によってまとめられた、ヒト抗体可変ドメインの使用可能な配列データを使用する。ベニア抗体を作製するのに用いられる方法の非限定的な例には、EP 519596 ; 米国特許第6,797,492号 ; およびPadlan et al. (1991) *Mol. Immunol.* 28(4-5):489-498に記載されたものが含まれる。

【0058】

「抗体誘導体」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小型抗体断片である「ダイアポディ」も含み、断片は、同じポリペプチド鎖の中に重鎖可変ドメイン (VH) が軽鎖可変ドメイン (VL) に連結されたものを含む (例えば、EP 404,097 ; WO 93 / 11161 ; および Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448) を参照されたい)。同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能とするには短すぎるリンカーを用いることによって、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合して2つの抗原結合部位を生じることを余儀なくされる (1つまたは複数のアミノ酸が親抗体の超可変領域内に挿入されていて、標的抗原に対する結合親和性が、抗原に対する親抗体の結合親和性よりも少なくとも約2倍強い抗体変異体を開示している、Chenらに対する米国特許第6,632,926号も参照されたい)。

【0059】

「抗体誘導体」という用語は、操作された抗体分子、断片、および単一ドメイン、例えばscFv、dAb、ナノポディ、ミニポディ、ユニポディ、およびアフィポディなどもさらに含む。Hudson (2005) *Nature Biotech* 23(9): 1126-36 ; 米国特許公開第US 2006 / 0211088号 ; PCT公報WO2007 / 059782 ; 米国特許第5,831,012号)。

【0060】

「抗体誘導体」という用語は、「直鎖状抗体」もさらに含む。直鎖状抗体を作製するための手順は当技術分野において公知であり、Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062に記載されている。手短に述べると、これらの抗体は、抗原結合領域の対を形成する、縦列になったEdセグメントの対 (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-VH-C<sub>H1</sub>) を含む。直鎖状抗体は、二重

特異性のこともあれば単一特異性のこともある。

【0061】

抗体は、プロテインA精製、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン交換クロマトグラフィーまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを非限定的に含む公知の方法によって、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）を精製のために用いることもできる。

【0062】

試験されるある抗体がタンパク質またはポリペプチドと結合する場合には、試験された抗体はそれらの抗体と同等である。1つの態様において、同等物とは、デクチン-1と結合して、DC細胞を刺激してIL-10を分泌させること、抗原特異的調節性T細胞の産生増大、および/または同種異系もしくは病原性T細胞応答の抑制といった同じ活性を与えるものことである。

【0063】

抗体が本明細書において想定している抗体と同じ特異性を有するか否かは、ある抗体が通常反応性であるタンパク質またはポリペプチドとこの抗体が結合するのを被験抗体によって妨げられるか否かを判定することにより、不要な実験なしに判定することが可能である。モノクローナル抗体による結合の減少によって示されるように、被験抗体が本発明に記載の態様に用いられる抗体と競合する場合には、この2つの抗体は同じエピトープまたは近似したエピトープと結合する可能性が高い。または、態様に用いるための抗体を、それが通常反応性であるタンパク質とともにプレインキュベートして、被験抗体が抗原と結合するその能力が阻害されるか否かを判定することもできる。被験抗体が阻害されるならば、この抗体は、本明細書に記載の態様に用いるための抗体と同じまたは近似したエピトープ特異性を有する可能性が極めて高い。

【0064】

「抗体」という用語はまた、すべての免疫グロブリンアイソタイプおよび免疫グロブリンサブクラスの抗体を含むことも意図している。アイソタイプとは、抗体の重鎖および軽鎖の定常領域における遺伝的なばらつきまたは違いのことを指す。ヒトでは、5種類の重鎖アイソタイプ：IgA、IgD、IgG、IgEおよびIgM、ならびに2種類の軽鎖アイソタイプ：およびがある。IgGクラスは4つのアイソタイプに分けられる：ヒトではIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4、マウスではIgG1、IgG2a、IgG2b、およびIgG3。それらはFc領域のアミノ酸配列については95%超の相同性を有するが、ヒンジ領域のアミノ酸組成および構造の点では大きな違いを示す。モノクローナル抗体の特定のアイソタイプは、最初の融合体より選択することによって直接調製することもできるか、またはSteplewski et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8653もしくはSpira et al. (1984) J. Immunol. Methods 74:307に記載されている手順を用いてクラススイッチ変異体を単離するための同胞選択法を用いることにより、異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製することもできる。または、組換えDNA法も用いることができる。

【0065】

本明細書に記載のモノクローナル抗体の特異性を有する他のモノクローナル抗体の単離も、抗イディオタイプ抗体を作製することによって当業者により達成されうる。Herlyn et al. (1986) Science 232:100。抗イディオタイプ抗体とは、関心対象のモノクローナル抗体に存在する固有の決定基を認識する抗体のことである。

【0066】

いくつかの局面においては、抗体を検出可能にまたは治療的に標識することが有用であると考えられる。抗体をこれらの剤とコンジュゲートさせる方法は当技術分野において公知である。例示のみを目的として述べると、抗体を、放射性原子、発色団、フルオロフォアなどの検出可能なモイエティーで標識することができる。そのような標識抗体は、イン

10

20

30

40

50

ビボでの、または単離された被験試料における診断手法に用いることができる。

【0067】

ある特定の態様において、抗体または抗原結合性断片は、改変をさらに含む。改変は、VHおよび/またはVLのCDR1領域内、CDR2領域内、および/またはCDR3領域内での保存的アミノ酸突然変異、Fcヒンジ領域内での保存的アミノ酸突然変異、ペグ化、血清タンパク質とのコンジュゲーション、ヒト血清アルブミンとのコンジュゲーション、検出可能な標識とのコンジュゲーション、診断剤とのコンジュゲーション、酵素とのコンジュゲーション、蛍光物質、発光物質、もしくは生物発光物質とのコンジュゲーション、放射性物質とのコンジュゲーション、または治療剤とのコンジュゲーションであってよい。

【0068】

本明細書において用いる場合、「標識」という用語は、検出しようとする組成物、例えば、ポリヌクレオチドまたは抗体などのタンパク質と直接的または間接的にコンジュゲートさせて「標識された」組成物を生じる、直接または間接的に検出可能な化合物または組成物を意図している。また、この用語には、緑色蛍光タンパク質(GFP)などのように、挿入された配列が発現された際にシグナルをもたらす、ポリヌクレオチドとコンジュゲートされた配列も含まれる。標識は、それ自体が検出可能であってもよく(例えば、放射性同位体標識もしくは蛍光標識)、または酵素標識の場合には検出可能な基質化合物もしくは組成物の化学変化を触媒してもよい。標識は小規模での検出に適しているもよいが、またはハイスループットスクリーニングにより適しているもよい。そのため、適した標識には、放射性同位体、蛍光色素、化学発光化合物、色素、および酵素を含むタンパク質が非限定的に含まれる。標識は単純に検出してもよいが、または定量してもよい。単純に検出される応答は、一般にその存在を単に確認する応答を含み、一方、定量される応答は、一般に、強度、偏光および/または他の特性などの定量可能な(例えば、数値的に報告可能な)値を有する応答を含む。発光または蛍光アッセイ法では、検出可能な応答は、結合に実際に関与するアッセイ構成要素と会合した発光団もしくはフルオロフォアを用いて直接的に、または別(例えば、レポーターもしくは指示薬)の構成要素と会合した発光団もしくはフルオロフォアを用いて間接的に生じうる。

【0069】

シグナルを生じる発光標識の例には、生物発光および化学発光が非限定的に含まれる。検出可能な発光応答は一般に、発光シグナルの変化またはその発生を含む。アッセイ構成要素を発光的に標識するための適した方法および発光団は当分野において公知であり、例えば、Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6<sup>th</sup> ed.)に記載されている。発光プローブの例には、エクオリンおよびルシフェラーゼが非限定的に含まれる。

【0070】

適した蛍光標識の例には、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラサイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、Cascade Blue(商標)、およびテキサスレッドが含まれる。他の適した光学色素は、Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6<sup>th</sup> ed.)に記載されている。

【0071】

別の局面において、蛍光標識は、細胞または組織の中またはその表面上に存在する細胞成分、例えば細胞表面マーカーなどとの共有結合を容易にするために官能化されている。適した官能基には、イソチオシアネート基、アミノ基、ハロアセチル基、マレイミド、スクシンイミジルエステル、およびハロゲン化スルホニルが非限定的に含まれ、これらはすべて、蛍光標識を第2の分子と結合させるために用いうる。蛍光標識の官能基の選択は、リンカー、剤、マーカー、または第2の標識剤のいずれかとの結合部位に応じて決まる。

【0072】

蛍光標識の付着は、細胞成分もしくは化合物に対して直接的であってもよいが、または代替的にリンカーを介することもできる。中間体に蛍光標識を間接的に連結させるのに適

10

20

30

40

50

した結合対には、抗原/抗体、例えばローダミン/抗ローダミンなど、ビオチン/アビジンおよびビオチン/ストレプトアビジンが非限定的に含まれる。

【0073】

低分子量ハプテンへの抗体のカップリングにより、アッセイ法における抗体の感度を高めることができる。続いて第2の反応によってハプテンを特異的に検出することができる。例えば、アビジンと反応するビオチン、または特異的抗ハプテン抗体と反応しうるジニトロフェノール、ピリドキサルおよびフルオレセインなどのハプテンを用いることが一般的である。Harlow and Lane (1988)、前記を参照されたい。

【0074】

抗体の1つまたは複数の結合特性(例えば、親和性)を改善するためにVHおよび/またはVLのCDR1領域内、CDR2領域内、および/またはCDR3領域内のアミノ酸残基を突然変異させることによって、抗体の可変領域を改変することができる。突然変異は、部位指定突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発によって導入することができ、抗体の結合または関心対象の他の機能的特性に対する影響を、適切なインビトロアッセイ法またはインビボアッセイ法で評価することができる。保存的修飾を導入し、CDR領域内の典型的には1つ、2つ、3つ、4つ、または5つを超えない個数の残基を変化させることが好ましい。変異が、アミノ酸の置換、付加、または欠失であってもよい。

【0075】

フレームワーク改変は、例えば、1つまたは複数のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰突然変異」させることによって、免疫原性を低下させるために抗体に施すことができる。

【0076】

加えて、抗体の1つまたは複数の機能的特性、例えば血清中半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または抗原依存性細胞傷害作用などを変化させるために、Fc領域内に改変を含むように抗体を操作することもできる。そのような修飾には、軽鎖および重鎖の集合を容易にするため、または抗体の安定性を高めるかもしくは低下させるための、ヒンジ領域内のシステイン残基数の変更(米国特許第5,677,425号)、ならびに抗体の生物学的半減期を短縮するためのFcヒンジ領域内のアミノ酸の突然変異(米国特許第6,165,745号)が非限定的に含まれる。

【0077】

加えて、1つまたは複数の抗体を化学的に改変することもできる。例えば、抗原に対する抗体の親和性を高めるために抗体配列中の1つまたは複数のグリコシル化部位を改変することによって、抗体のグリコシル化を変化させることができる(米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号)。または、抗体依存性細胞媒介細胞傷害作用を高めるために、グリコシル化機構を変化させた宿主細胞内で抗体を発現させることにより、フコシル残基の量が減少した低フコシル化抗体、または二分岐(bisecting)GlcNac構造が増大した抗体を得ることもできる(Shields, R. L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180)。

【0078】

生物学的半減期を延長させるために、抗体またはその断片を、ポリエチレングリコール(PEG)またはPEGの反応性エステルもしくはアルデヒド誘導体と、1つまたは複数のPEG基が抗体または抗体断片と付着する条件下で反応させることによって、抗体をペグ化することができる。抗体のペグ化は、反応性PEG分子(または類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応によって実施することができる。本明細書において用いる場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、他のタンパク質を誘導体化するために用いられているPEGの形態のいずれか、例えばモノ(C1~C10)アルコキシポリエチレングリコールもしくはアリーロキシポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコールマレイミドなどを範囲に含むことを意図している。ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体であってよい。タンパク質をペグ化する方法は当技術分野において公知であり、1つまたは複数の抗体に適用することができる(EP 0 154 316およびEP 0 401 384)。

10

20

30

40

50

## 【0079】

加えて、抗体の抗原結合領域をヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質とコンジュゲートまたは融合させることによって、抗体を化学修飾して、結果として得られる分子の半減期を延長させることもできる。そのような手法は、例えば、EP 0322094およびEP 0 486 525に記載されている。

## 【0080】

例えば、疾患の発症または進行をモニターするため、および所与の処置レジメンの有効性を判定するために、抗体またはその断片を診断剤とコンジュゲートさせて、診断に用いることもできる。診断剤の例には、酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々のポジトロン放射トモグラフィーを用いるポジトロン放出性金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。検出可能な物質は、抗体またはその断片と直接的に連結またはコンジュゲートさせることもでき、当技術分野において公知の手法を用いてリンカーを介して間接的に連結またはコンジュゲートさせることもできる。適した酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適した補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる。適した蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例には、ルミノールが含まれる。生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる。適した放射性物質の例には、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、インジウム<sup>111</sup>、ルテチウム<sup>171</sup>、ビスマス<sup>212</sup>、ビスマス<sup>213</sup>、アスタチン<sup>211</sup>、銅<sup>62</sup>、銅<sup>64</sup>、銅<sup>67</sup>、イットリウム<sup>90</sup>、ヨウ素<sup>125</sup>、ヨウ素<sup>131</sup>、リン<sup>32</sup>、リン<sup>33</sup>、スカンジウム<sup>47</sup>、銀<sup>111</sup>、ガリウム<sup>67</sup>、プラセオジウム<sup>142</sup>、サマリウム<sup>153</sup>、テルビウム<sup>161</sup>、ジスプロシウム<sup>166</sup>、ホルミウム<sup>166</sup>、レニウム<sup>186</sup>、レニウム<sup>188</sup>、レニウム<sup>189</sup>、鉛<sup>212</sup>、ラジウム<sup>223</sup>、アクチニウム<sup>225</sup>、鉄<sup>59</sup>、セレン<sup>75</sup>、ヒ素<sup>77</sup>、ストロンチウム<sup>89</sup>、モリブデン<sup>99</sup>、ロジウム<sup>1105</sup>、パラジウム<sup>109</sup>、プラセオジウム<sup>143</sup>、プロメチウム<sup>149</sup>、エルビウム<sup>169</sup>、イリジウム<sup>194</sup>、金<sup>198</sup>、金<sup>199</sup>、および鉛<sup>211</sup>が含まれる。モノクローナル抗体は、これらの抗体と共有結合する二官能性キレート化剤を用いることにより、放射性金属イオンと間接的にコンジュゲートさせることができる。キレート化剤は、アミン(amities) (Meares et al., 1984 Anal. Biochem. 142: 68-78); アミノ酸残基のスルフィドラル基 (Koyama 1994 Chem. Abstr. 120: 217262t) および糖質基 (Rodwell et al. 1986 PNAS USA 83: 2632-2636; Quadri et al. 1993 Nucl. Med. Biol. 20: 559-570) を介して付着させることができる。

10

20

30

40

## 【0081】

コンジュゲートされるその他の適した分子には、リボヌクレアーゼ (RNアーゼ)、DNAアーゼI、アンチセンス核酸、siRNA分子などの阻害性RNA分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子、および外部ガイド配列が含まれる。アプタマーとは、ステムループまたはGカルテットといった規定の二次構造および三次構造へとフォールディングする、長さが15~50塩基の範囲の低分子核酸であり、ATP (米国特許第5,631,146号) およびテオフィリン (米国特許第5,580,737号) などの低分子の他、逆転写酵素 (米国特許第5,786,462号) およびトロンピン (米国特許第5,543,293号) などの高分子とも結合することができる。リボザイムとは、化学反応を分子内または分子間のいずれかで触媒しうる核酸分子である。リボザイムは、典型的には、後に切断される標的基質を認識してそれと結合することによって核酸基質を切断する。三重鎖形成機能を有する核酸分子は、三重鎖を形成することによって二本鎖核酸および一本鎖核酸と相互作用することができ、この場合にDNAの3本の鎖はワトソン-クリック塩基対合およびフーグスティーン塩基対合の両方に依存して複合体を形成する。三重鎖分子は、標的領域と高い親和性および特異性で結合することができる

## 【0082】

機能性核酸分子は、標的分子が保有する特定の活性のエフェクター、阻害物質、モジュ

50

レーター、および刺激物質として作用してもよいか、または機能性核酸分子が他のいかなる分子にも依存しないデノボ活性を保有してもよい。1つの態様において、抗体は樹状細胞の刺激物質である。

【0083】

コンジュゲートされた剤を、使用可能な多数の方法のうちいずれかを用いて、直接的または間接的に抗体と連結させることができる。例えば、N-スクシニル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) などの架橋形成剤を用いるジスルフィド結合形成を介して、還元された抗体成分のヒンジ領域に剤を付着させることもできるか、または抗体のFc領域内の糖質モイエティーを介して付着させることもできる (Yu et al. 1994 Int. J. Cancer 56: 244; Upešlaciš et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995))。

10

【0084】

剤を抗体とコンジュゲートさせるための手法は周知である (Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、および Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates" 1982 Immunol. Rev. 62: 119-58)。

20

【0085】

抗体またはその抗原結合領域を、別の機能性分子、例えば別の抗体または受容体のリガンドなどと連結させて、少なくとも2つまたはそれ以上の異なる結合部位または標的分子と結合する二重特異性分子または多重特異性分子を生じさせることができる。抗体を、1つまたは複数の他の結合性分子、例えば別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合性模倣体などと連結させることは、例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、または非共有結合性会合によって行うことができる。多重特異性分子は、第1および第2の標的エピトープに加えて、第3の結合特異性をさらに含む。

30

【0086】

二重特異性分子および多重特異性分子は、当技術分野において公知の方法を用いて調製することができる。例えば、高特異性分子の各結合単位を個別に作製し、続いてこれらを互いにコンジュゲートさせることができる。結合分子がタンパク質またはペプチドである場合には、各種のカップリング剤または架橋剤を共有結合性コンジュゲーションのために用いることができる。架橋剤の例には、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシニミジル-S-アセチル-チオアセテート (SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB)、o-フェニレンジマレイミド (oRDM)、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)、およびスルホスクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC) が含まれる (Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160: 1686; Liu et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。結合性分子が抗体である場合は、2つの重鎖のC末端のヒンジ領域をスルフヒドリル結合させることによって、それらをコンジュゲートさせることができる。

40

【0087】

50

抗体またはその断片を、その抗体が結合する細胞に対して毒性であるモイエティーと連結させて、「枯渇」抗体を形成させることができる。これらの抗体は、NK細胞を枯渇させることが望まれる用途に特に有用である。

【0088】

抗体を固体支持体と連結させることもでき、これは標的抗原のイムノアッセイ法または精製のために特に有用である。そのような固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが非限定的に含まれる。

【0089】

抗体をさまざまな担体と結合させることもできる。したがって、抗体と、活性または不活性である別の物質とを含有する組成物も提供される。周知の担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロースおよび変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、およびマグネタイトが含まれる。担体の性質は、本明細書に記載の態様の目的に応じて、可溶性であってもよいかまたは不溶性であってもよい。当業者は、モノクローナル抗体を結合させるのに適する他の担体も承知しているか、または日常的な実験を用いて、そのような担体を確認することもできる。

10

【0090】

構築物

以下に提示する配列は、哺乳動物細胞によって分泌される抗体HもしくはL鎖またはタンパク質として提示される場合には、シグナルペプチドを伴わないアミノ酸（すなわち、「成熟」型分泌タンパク質）として示されている一方、DNA配列は、シグナル配列が存在するならばそれも含むコード領域全体である。

20

【0091】

H鎖構築物のすべての例は、典型的には、適合するL鎖ベクターによるCHO細胞のコトランスフェクションに用いられる。また、いくつかの態様において、免疫治療薬はヒト化可変領域を有すると考えられる。

【0092】

m抗デクチン-1-11B6.4-H-V-hIgG4H-C ; SEQ ID NO : 1 :

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCSVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGVMWTGGGA  
 NYNSAFMSRLSINKDNSKSQVFLKMNNLQTDDTAIYYCVRDAVRYWNFDVWGAGT  
 TTVVSSAKTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT  
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP  
 APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
 GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAS

30

40

【0093】

上記の配列は、mAb 11B6.4のH鎖可変領域とhIgG4のC領域とのキメラである。

【0094】

mAb 11B6.4のH鎖可変領域は、SEQ ID NO : 2 :

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCSVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGVMWTGGGA  
 NYNSAFMSRLSINKDNSKSQVFLKMNNLQTDDTAIYYCVRDAVRYWNFDVWGAGT  
 TTVVSSAKTK

に示される。

50

## 【 0 0 9 5 】

mAb 11B6.4のH鎖可変領域のCDRは、  
GFSLSNYDIS

(SEQ ID NO:13), VMWTGGGANYNNSAFMS (SEQ ID NO:14), および DAVRYWNFDV  
(SEQ ID NO:15)  
である。

## 【 0 0 9 6 】

[m抗デクチン-1-11B6.4-K-LV-hIlgGK-C]は、対応するL鎖キメラ ; SEQ ID NO : 3 :  
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQQKPGSSPKPWIYATSHLASGVP 10  
ARFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDTATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS  
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

である。

## 【 0 0 9 7 】

m抗デクチン-1-11B6.4-K-LV-hIlgGK-CのL鎖可変領域は、SEQ ID NO : 4 :  
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQQKPGSSPKPWIYATSHLASGVP 20  
ARFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDTATYYCQQWSSNPFTFGSGTK

に示される。

## 【 0 0 9 8 】

m抗デクチン-1-11B6.4-K-LV-hIlgGK-CのL鎖可変領域のCDRは、  
RASSSVSYIH (SEQ ID NO:16), ATSHLAS (SEQ ID NO:17), および  
CQQWSSNPFT (SEQ ID NO:18)

である。

## 【 0 0 9 9 】

m抗デクチン-1-15E2.5-H-V-hIlgG4H-C] ; SEQ ID NO : 5 : 30  
QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSG  
YTNYNQKFKDKATLTADKSSSTASMLSSLTSEDSAVYYCARERAVLVPYAMDYW  
GQGTSVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP  
CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV 40  
LDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAS

。

## 【 0 1 0 0 】

上記の配列は、mAb 15E2.5のH鎖可変領域とhIlgG4のC領域とのキメラである。

## 【 0 1 0 1 】

mAb 15E2.5のH鎖可変領域は、SEQ ID NO : 6 :  
QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSG  
YTNYNQKFKDKATLTADKSSSTASMLSSLTSEDSAVYYCARERAVLVPYAMDYW  
GQGTSVTVSSAKTK 50

に示される。

【 0 1 0 2 】

mAb 15E2.5のH鎖可変領域のCDRは、  
GYTFTTYTMH

(SEQ ID NO:19), YINPSSGYTNYNQKFKD (SEQ ID NO:20), および ERAVLVPYAMDY  
(SEQ ID NO:21)

である。

【 0 1 0 3 】

[m抗デクチン-1-15E2.5-K-V-hIgGK-C]は、対応するL鎖キメラ ; SEQ ID NO : 7 :  
QIVLTQSPAVMSASPGEKVTITCTASSSLSYMHWFQQKPGTSPKLWLYSTSILASGVP  
TRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSSPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

である。

【 0 1 0 4 】

m抗デクチン-1-15E2.5-K-V-hIgGK-CのL鎖可変領域は、SEQ ID NO : 8 :  
QIVLTQSPAVMSASPGEKVTITCTASSSLSYMHWFQQKPGTSPKLWLYSTSILASGVP  
TRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSSPFTFGSGTK

20

に示される。

【 0 1 0 5 】

m抗デクチン-1-15E2.5-K-V-hIgGK-CのL鎖可変領域のCDRは、  
TASSSLSYMH (SEQ ID NO:22), STSILAS (SEQ ID NO:23), および  
QQRSSSPFT (SEQ ID NO:24)

である。

【 0 1 0 6 】

m抗デクチン-1-2D8.2D4-H-V-hIgG4H-C] ; SEQ ID NO : 9 :  
EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNVWVKQSNQKSLWIGNIDPYYG  
DTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCARPYGSEAYFAYWGQ  
GTLVTVSAAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG  
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC  
PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
LDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAS

30

40

【 0 1 0 7 】

上記の配列は、mAb 2D8.2D4のH鎖可変領域とhIgG4のC領域とのキメラである。

【 0 1 0 8 】

mAb 2D8.2D4のH鎖可変領域は、SEQ ID NO : 10 :

EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWWVKQSNQKSLWIGNIDPYYG  
 DTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCARPYGSEAYFAYWGQ  
 GTLVTVSAAKTK

に示される。

【0109】

mAb 2D8.2D4のH鎖可変領域のCDRは、

GYSFTGYNMN (SEQ ID NO:25), NIDPYYGDTNYNQKFKG (SEQ ID NO:26), および  
 PYGSEAYFAY (SEQ ID NO:27)

である。

【0110】

[m抗デクチン-1-2D8.2D4-K-V-hIlgGK-C]は、対応するL鎖キメラ；SEQ ID NO：11：  
 DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYAAQSIGIP  
 SRFSGSGSGSDFTLSINGVEPEDVGVYYCQNGHSFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIF  
 PPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS  
 LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

である。

【0111】

m抗デクチン-1-2D8.2D4-K-V-hIlgGK-CのL鎖可変領域は、SEQ ID NO：12：

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYAAQSIGIP  
 SRFSGSGSGSDFTLSINGVEPEDVGVYYCQNGHSFPYTFGGGK

に示される。

【0112】

mAb 2D8.2D4のH鎖可変領域のCDRは、

RASQSISDYLH (SEQ ID NO:28), YAAQSIGIS (SEQ ID NO:29), および QNGHSFPYT (SEQ  
 ID NO:30)

である。

【0113】

## II. TLRアゴニスト

TLRアゴニストは当技術分野において公知である。TLRアゴニストには、TLR1に対するアゴニスト（例えば、ペプチドグリカンまたはトリアシルリポタンパク質）、TLR2に対するアゴニスト（例えば、リポテイコ酸；枯草菌（*Bacillus subtilis*）、大腸菌（*Escherichia coli*）0111:B4、大腸菌K12または黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）由来のペプチドグリカン；非定型的リポ多糖（LPS）、例えばレプトスピラ症（*Leptospirosis*）LPSおよびジンジパリス菌（*Porphyromonas gingivalis*）LPSなど；合成ジアシル化リポタンパク質、例えばFSL-1またはPam2CSK4など；スメグマ菌（*M. smegmatis*）由来のリポアラビノマンナンまたはリポマンナン；トリアシル化リポタンパク質、例えばPam3CSK4など；リポタンパク質、例えばマイコプラズマ由来のMALP-2およびMALP-404など；ライム病ボレリア（*Borrelia burgdorferi*）OspA；髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）またはインフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）由来のポーリン；エルシニア（*Yersinia*）LcrV；マイコバクテリア（*Mycobacterium*）または結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）由来のリポマンナン；クルーズトリパノソーマ（*Trypanosoma cruzi*）GPIアンカー；マンソン住血吸虫（*Schistosoma mansoni*）リゾホスファチジルセリン；森林型熱帯リーシュマニア（*Leishmania major*）リポホスホグリカン（LPG）；熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）グリコホスファチジルイノシトール（GPI）；ザイモサン）、TLR3に対する

10

20

30

40

50

アゴニスト（例えば、二本鎖RNA、ポリアデニル酸-ポリウリジル酸（ポリ(A:U)）；ポリイノシン-ポリシチジル酸（ポリ(I:C)）；ポリイノシン-ポリシチジル酸高分子量（ポリ(I:C)HMW）；およびポリイノシン-ポリシチジル酸低分子量（ポリ(I:C)LMW））、TLR4に対するアゴニスト（例えば、大腸菌およびサルモネラ（*Salmonella*）種由来のLPS）；TLR5に対するアゴニスト（例えば、枯草菌、緑膿菌（*P. aeruginosa*）またはネズミチフス菌（*S. typhimurium*）由来のフラジェリン）、TLR8に対するアゴニスト（例えば、一本鎖RNA、例えば、6UUUAU反復配列を有するssRNA、RNAホモポリマー（ssPolyU naked）、HIV-1 LTR由来ssRNA（ssRNA40）、または2つのGUCCUCAA反復配列を有するssRNA（ssRNA-DR））、TLR7に対するアゴニスト（例えば、イミダゾキノリン化合物イミキモド、Imiquimod VacciGrade（商標）、Gardiquimod VacciGrade（商標）またはGardiquimod（商標）；アデニン類似体CL264；塩基類似体CL307；グアノシン類似体ロキソリピン；TLR7/8に対するアゴニスト（例えば、チアゾキノリン化合物CL075；イミダゾキノリン化合物CL097、R848またはR848 VacciGrade（商標））、TLR9に対するアゴニスト（例えば、CpGODN）；およびTLR11に対するアゴニスト（例えば、トキソプラズマ原虫（*Toxoplasma gondii*）プロフィリン）が含まれる。ある特定の態様において、TLRアゴニストは以上に列記した具体的なアゴニストである。さらなる態様において、TLRアゴニストは、1種のTLRまたは2種のTLRのいずれかを刺激するものである。ある特定の態様において、TLRは以上に列記したTLR2アゴニストである。

10

#### 【0114】

いくつかの態様において、TLRは、リポテイコ酸；枯草菌、大腸菌0111:B4、大腸菌K12または黄色ブドウ球菌由来のペプチドグリカン；非定型的リポ多糖（LPS）、例えばレプトスピラLPSおよびジンジパリス菌LPSなど；合成ジアシル化リポタンパク質、例えばFSL-1またはPam2CSK4など；スメグマ菌由来のリポアラビノマンナンまたはリポマンナン；トリアシル化リポタンパク質、例えばPam3CSK4など；リポタンパク質、例えばマイコプラズマ由来のMALP-2およびMALP-404など；ライム病ボレリアOspA；髄膜炎菌またはインフルエンザ菌由来のポーリン；エルシニアLcrV；マイコバクテリアまたは結核菌由来のリポマンナン；クルーズトリパノソームGPIアンカー；マンソン住血吸虫のリゾホスファチジルセリン；森林型熱帯リーシュマニアのリポホスホグリカン（LPG）；熱帯熱マラリア原虫のグリコホスファチジルイノシトール（GPI）；およびザイモサンより選択される。

20

#### 【0115】

他の態様において、TLRは、ジンジパリス菌LPS、Pam3CSK4、および枯草菌由来、大腸菌0111:B4由来、大腸菌K12由来、または黄色ブドウ球菌由来のペプチドグリカンより選択される。

30

#### 【0116】

他の態様において、TLRはジンジパリス菌LPSおよびPam3CSK4より選択される。1つのさらなる態様において、TLRはPam3CSK4である。

#### 【0117】

### III. 薬学的組成物

態様は、アレルギー反応および/または炎症反応を治療するための方法を含む。それらは、アレルゲンまたは抗原、例えば、ポリペプチド、ペプチド、糖質、脂質または他の分子もしくは分子断片に対する、およびそのような自己免疫応答によって引き起こされる状態または疾患を発症することに対する免疫応答を誘導または改変するために用いる組成物を含む。

40

#### 【0118】

組成物の投与は典型的には、任意の一般的な経路を介すると考えられる。これには、経口的、非経口的、同所性、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、吸入による、ネブライザーを用いることによる、または静脈内注射によるものが含まれる。ある特定の態様において、ワクチン組成物は吸入される（例えば、米国特許第6,651,655号、これは参照により具体的に組み入れられる）。他の投与様式に適するその他の製剤には、経口製剤が含まれる。経口製剤は、例えば、薬剤等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステア

50

リン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような、通常使用される賦形剤を含む。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤、または散剤の形態をとり、活性成分を約10%～約95%、好ましくは約25%～約70%含有する。

【0119】

典型的には、組成物は投薬製剤と適合する様式で、治療的に有効でかつ免疫調節性であるような量で投与される。投与される量は処置を受ける対象に依存する。投与に必要とされる活性成分の正確な量は、医師の判断に依存する。

【0120】

適用の様式は広くさまざまであってよい。ワクチン投与のための従来の方法のいずれもが適用可能である。これらは、固体の生理学的に許容される基剤上での、または生理学的に許容される分散液中での経口適用、非経口的、注射によるものなどを含むと考えられる。薬学的組成物の投薬量は投与経路に依存すると考えられ、対象のサイズおよび健康状態に応じて異なると考えられる。

10

【0121】

多くの場合では、最大で約3、4、5、6、7、8、9、10回、もしくはそれ以上または少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10回、もしくはそれ以上の複数回投与が望ましい。投与は、2日～12週間の間隔、より一般的には1～2週間の間隔の範囲であってよい。投与の過程に続いて、反応性免疫応答およびT細胞活性についてアッセイ法を行うことができる。

【0122】

「薬学的に許容される」または「薬理的に許容される」という語句は、動物またはヒトに投与された場合に、有害反応、アレルギー反応、または他の不都合な反応を生じない分子の実体および組成物のことを指す。本明細書において用いる場合、「薬学的に許容される担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌薬および抗真菌薬、等張剤および吸収遅延剤などを含む。薬学的活性物質に対するそのような媒体および剤の使用は、当技術分野において周知である。いずれかの従来媒体または剤が活性成分と不適合性である場合を除いて、免疫原性組成物および治療用組成物におけるその使用を想定している。

20

【0123】

抗体または抗原結合性断片は、非経口投与用に製剤化することができ、例えば、静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、またはさらに腹腔内経路を介する注射用に製剤化することができる。1つの具体的な態様において、組成物は皮内注射によって投与される。さらなる態様において、組成物は静脈内注射によって投与される。対象の免疫状態を改変するTLRアゴニストに機能的に連結された抗デクチン-1抗体または抗原結合性断片を含有する水性組成物の調製は、本開示に鑑みて当業者には公知であると考えられる。典型的には、そのような組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして注射剤として調製することができ；注射前の液体の添加によって溶液または懸濁液を調製するための使用に適した固体形態を調製することもでき；調製物を乳化させることもできる。

30

【0124】

注射用途に適した薬学的形態には、無菌の水溶液または分散液；ゴマ油、ラッカセイ油、または水性プロピレングリコールを含む製剤；および無菌の注射溶液または分散液の即時調製用の無菌粉末が含まれる。いずれの場合にも、形態は無菌でなければならず、容易に注射されうる程度に流動性でなければならない。また、それは製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に抗して保存されなければならない。

40

【0125】

組成物は、中性形態または塩形態に製剤化されうる。薬学的に許容される塩には、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基とともに形成される）が含まれ、これらは、例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸とともに形成される。また、遊離カルボキシル基とともに形成される塩を、例えば

50

水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基から得ることもできる。

【0126】

担体はまた、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒であってよい。微生物活動の防止は、さまざまな抗菌薬および抗真菌薬、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされうる。多くの場合、等張剤、例えば糖類または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物中での使用によってもたらされうる。

10

【0127】

無菌注射溶液は、上記に列挙されるさまざまな他の成分とともに適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を組み入れ、必要に応じてその後滅菌することによって調製される。一般に、分散液は、基本の分散媒および上記に列挙されるものからの必要とされる他の成分を含む無菌媒体中に、滅菌されたさまざまな活性成分を組み入れることによって調製される。無菌注射溶液の調製用の無菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥および凍結乾燥手法であり、これにより、あらかじめ滅菌濾過されたその溶液から活性成分および任意の付加的な所望の成分の粉末が得られる。

【0128】

治療用組成物または予防用組成物の有効量は、意図する目標に基づいて決定される。「単位用量」または「投薬量」という用語は、対象における使用に適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、その投与、すなわち適切な経路および投与計画に関連して上記で考察した所望の応答を生じるように計算された所定量の組成物を含む。治療回数および単位用量の両方に従って投与される量は、所望の結果および/または防御に依存する。組成物の正確な量は医師の判断にも依存し、各個体に特有である。用量に影響を及ぼす因子には、対象の身体および臨床状態、投与経路、治療の意図する目標（症状の緩和かそれとも治癒か）、ならびに特定の組成物の効力、安定性および毒性が含まれる。製剤化されると、溶液は、投薬製剤と適合する様式で、治療的または予防的に有効であるような量で投与される。製剤は、上記の注射溶液の種類などの種々の剤形として容易に投与される。

20

30

【0129】

いくつかの態様において、薬学的組成物は抗原を含む。さらなる態様において、薬学的組成物はアレルゲンを含む。関連した態様において、アレルゲンはイエダニに由来する。いくつかの態様において、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片は、さらに抗原またはアレルゲンとも機能的に連結される。いくつかの態様において、抗原、アレルゲン、またはTLRへの抗デクチン-1抗体のコンジュゲーションは、ペプチド結合を介しない。また、本開示の態様が、抗原との結合を伴わず、薬学的組成物中に抗原も伴わない、TLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体またはその抗原結合性断片を含むことも明確に想定している。

【0130】

IV. 併用療法

組成物および関連する方法、特にTLRアゴニストと機能的に連結された抗デクチン-1抗体または抗原結合性断片の投与を、従来の治療法の投与と組み合わせて用いることもできる。これらには、アレルゲン免疫療法、抗ヒスタミン薬、充血緩和剤、抗コリン性鼻アレルギー用噴霧薬、ステロイド鼻噴霧薬、アレルギー用点眼薬、ロイコトリエン阻害薬、マスト細胞阻害薬、アレルギー用注射などが非限定的に含まれる。

40

【0131】

抗体投与が、数分間から数週間の範囲にわたる間隔で他の治療に先行するかまたは続いてよい。他の剤を別個に投与する態様では、一般に、各送達時点の間に大幅な時間が経過しないことが保証され、その結果、剤および抗体は対象に対して有利に組み合わせられた

50

効果を依然として発揮することができる。そのような場合には、互いに約12～24時間以内、より好ましくは互いに約6～12時間以内に、両方の様式を投与しうると想定している。しかし、状況によっては、投与の期間を大幅に延長することが望ましいことがあり、その場合には各々の投与間に数日間（2、3、4、5、6、または7日間）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、または8週間）をおく。

#### 【0132】

患者/対象に対する薬学的組成物の投与は、もしあれば毒性を考慮した上で、そのような化合物の投与に関する一般的なプロトコールに従う。必要に応じて治療サイクルを繰り返すことが予想される。また、さまざまな標準的治療法、例えば水分補給などを、記載の治療法と組み合わせて適用しうるとも想定している。

10

#### 【0133】

### V. インビトロ投与またはエクスピボ投与

本明細書において用いる場合、インビトロ投与という用語は、培養下の細胞を非限定的に含む、対象から取り出されたかまたは対象の外部の細胞に対して行われる操作のことを指す。エクスピボ投与という用語は、インビトロで操作され、続いて対象に投与される細胞のことを指す。インスピボ投与という用語は、投与を含む、対象内で行われるすべての操作を含む。

#### 【0134】

ある特定の局面において、組成物は、インビトロ、エクスピボ、またはインスピボのいずれかで投与することができる。ある特定のインビトロ態様では、自家性T細胞を本明細書に記載の組成物とともにインキュベートする。続いて、この細胞を、インビトロ分析のために、または代替的にはエクスピボ投与のために用いることができる。

20

#### 【0135】

### VI. 治療的適用

いくつかの態様は、異常なまたは亢進したTh2型細胞応答によって媒介される疾患または状態に対する治療を含む。TLRと機能的に連結された抗デクチン-1抗体または抗原結合性断片は、アレルギー性状態または炎症状態を有する人、アレルギー性状態または炎症状態を有する疑いがある人、またはアレルギー性状態または炎症状態を発症するリスクのある人において、免疫応答を低下させるかまたは改変するために投与することができる。場合によっては、アレルギー性状態または炎症状態は、病原性Th2型細胞応答と関連のあるものである。これらの方法を、アレルゲン反応に関する検査で陽性となったか、またはそのような状態もしくは関連状態を発症するリスクがあると考えられた人に対して使用することもできる。

30

#### 【0136】

数多くのアレルギー疾患または炎症性疾患を予防、治療、または改善するために、態様を用いることができる。非限定的な例には、喘息、1型糖尿病、慢性閉塞性肺疾患、間質性肺疾患、慢性的閉塞性肺疾患、慢性気管支炎、好酸球性気管支炎、好酸球性肺炎、肺炎、炎症性腸疾患、アトピー性皮膚炎、アトピー、アレルギー、アレルギー性鼻炎、特発性肺線維症、硬皮症、肺気腫、乳癌、および潰瘍性大腸炎が含まれる。アレルギー性障害の非限定的な例には、アレルギー性アトピーおよび皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性喘息、食物（例えば、乳、卵、小麦、ナッツ、魚介類、甲殻類、亜硫酸塩、大豆およびカゼイン）に対するアレルギー反応、環境アレルゲン（例えば、植物性および動物性のアレルゲン、例えば皮膚、イエダニ、花粉、スギ、ツタウルシ、毒ガシ、ウルシなど）に対するアレルギー反応、昆虫咬傷（例えば、ハチ、ジガバチ、キバチ、スズメバチまたはカミアリの刺傷）、花粉症、アレルギー性結膜炎、蕁麻疹、糸状菌、薬物アレルギー（例えば、アスピリンおよびペニシリン）ならびに化粧品アレルギーが含まれる。

40

#### 【実施例】

#### 【0137】

### VII. 実施例

以下の実施例は、ある特定の態様を実証するために含まれる。以下の実施例において

50

開示される手法は、本発明の実施において十分に機能すると本発明者によって見いだされた技術を表しており、それ故にその実施のための好ましい態様であると見なうることが当業者に認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示に鑑みて、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、開示される特定の態様に多くの変更を施すことができ、それでもなお同様または類似の結果を得ることができることを認識すべきである。

#### 【0138】

アレルゲン誘発性の病原性免疫応答は、アレルギー性アトピーおよび皮膚炎、アレルギー性鼻炎、ならびにアレルギー性喘息を含む、複数の種類のアレルギー疾患の主因である。そのようなアレルギー性免疫障害の病態生理は複雑であり、いくつかの要因、例えば、遺伝的感受性、年齢、ならびにアレルゲン曝露の経路および量などが関連していることが多い。本出願人は、Th2経路の免疫調節物質による治療方法が、そのようなアレルギー疾患の治療のための合理的戦略になるとの仮説を立てている。しかし、個々のエフェクター分子を標的とする現行の戦略（例えば、受容体アンタゴニストおよび可溶性受容体、ならびにTh2サイトカインに対する中和性モノクローナル抗体（mAb））は、Th2により作動される複雑なアレルギー性免疫障害を解消させるには不十分であると考えられる。特異的免疫療法（SIT）は、数十年にわたってアレルギー専門医の間で特徴的な医療行為となっているが、その臨床的有効性、治療期間および社会経済学的結果に関しては依然としてかなり議論がある。

10

#### 【0139】

このため、アレルゲン特異的Th2型免疫応答を有効に抑制するための新規戦略が求められている。主要な抗原提示細胞（APC）である樹状細胞（DC）は、抗原特異的CD4<sup>+</sup> T細胞の種類を方向づけることによって、宿主免疫応答を誘導しかつ制御することができる。特に、本出願人のデータにより、種々のレクチン様受容体（LLR）を介して活性化されたヒトDCが、抗原特異的T細胞の質および数量をさまざまなやり方で再プログラミングすることが示されている。試験されたいくつかのLLRのうち、デクチン-1はTh2型T細胞応答を下方制御する独特の機能を示す。これはメモリーT細胞およびナイーブCD4<sup>+</sup> T細胞の両方に該当する。その上、アレルギー患者PBMCに対するデクチン-1リガンド（カードラン：アエロバクター（*Aerobacterium*）から抽出された $\alpha$ -グルカン重合体）の投与は、Th2型T細胞応答の有意な下方制御をもたらした（図12~13）。このことから、APC上、特にDC上で発現されるデクチン-1およびTLRを標的とすることにより、アレルゲン特異的Th2型T細胞応答を制御して、その後にIgEを減少させることができるという仮説を立てた。

20

30

#### 【0140】

実施例1：抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートはTh2型炎症性T細胞応答を制御することができる

抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートはヒト抗原提示細胞と結合する。この治療戦略の試験および開発のために、非ヒト霊長動物（NHP）においてデクチン-1と交差反応するアゴニスト性抗ヒトデクチン-1 mAbを作製した。図1に従って、抗体をPam3（別名Pam3CSK4）とコンジュゲートさせた。健常ドナーのPBMCを、10ug/mlの対照抗体、抗デクチン-1抗体および抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートとともに4℃で20分間インキュベートした。細胞を洗浄し、FITCで標識したヤギ抗マウスIgGによって染色した。細胞をさらに、B細胞（CD19）、T細胞（CD3）、単球（CD14）、および骨髄樹状細胞（mDC：Lin-HLA-DR+CD11c+CD123-）に対するマーカーで染色した。種々の種類の細胞に対する抗デクチン-1および抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートの結合を、フローサイトメトリーによって評価した。図2に示されているように、抗デクチン-1および抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートは、抗原提示細胞（B細胞、単球およびmDC）と等しく結合したが、デクチン-1を発現しないT細胞とは結合しなかった。以上を総合すると、本発明者らのデータは、抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートがヒトにおいて抗原提示細胞を効率的に標的としうることを実証している。

40

#### 【0141】

抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートはmDCおよびPBMCを活性化するのに抗デクチン-1またはPam3のいずれか単独よりも強力である。次に、抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートの生

50

物活性を、Pam3および抗デクチン-1抗体のいずれか単独と比較した(図3)。 $5 \times 10^5$ 個のPBMCおよび $2 \times 10^5$ 個のmDCを、指定濃度の試薬の存在下で一晩インキュベートし、続いて培養上清中のIL-10の量をELISAによって評価した。PBMC培養物(図3中の左のパネル)およびmDC培養物(図3中の右のパネル)培養物のいずれにおいても、抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートはPam3よりもはるかに強力にIL-10分泌を誘導した。可溶性型の抗デクチン-1抗体のみでは、PBMCにもDCにもIL-10の分泌を誘導することはできなかった(データは提示せず)。これらの結果はまた、抗デクチン-1-Pam3が、Pam3を抗原提示細胞に効率的に送達してそれらを刺激しうることも指し示している。

#### 【0142】

抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートはmDC上でのTSLP誘発性OX40L発現を抑制することができる。アレルゲンおよび呼吸器ウイルスは、DC上のOX40L発現を上方制御しうるTSLPを分泌するように上皮細胞を誘導する。OX40Lは、アレルギーTh2型炎症T細胞応答のDC誘発性惹起に極めて重要な役割を果たす。このため、抗デクチン-1-Pam3がmDC上のTSLP誘発性OX40L発現を抑制しうるか否かについて試験した(図4)。培地中で一晩培養したmDCと比較して、TSLPとともに培養したmDCでは、CD86(活性化マーカー)およびOX40Lの発現が増大した。抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートは、mDCのTSLP誘発性活性化を促進することができた(CD86発現を観察することによる)が、一方、それはmDC上のTSLP誘発性OX40L発現は減少させた。可溶性型の抗デクチン-1抗体またはPam3は、いずれも単独ではTSLP誘発性OX40L発現を変化させることができなかった。このため、抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートは、TSLP活性化DCによって誘発されるTh2型T細胞応答を有効に抑制しうることが予想された。

#### 【0143】

抗デクチン-1-Pam3コンジュゲート処理はTSLP活性化mDC誘発性Th2型T細胞応答の抑制をもたらす。次に、抗デクチン-1-Pam3コンジュゲートがTSLPにより活性化されるmDC誘発性Th2型T細胞応答を実際に抑制しうるか否かを試験した。 $5 \times 10^3$ 個のmDCを、同じ濃度(20ug/ml)の抗デクチン-1-Pam3コンジュゲート、抗デクチン-1とPam3の組み合わせ、またはPam3の存在下または非存在下で、TSLPとともに一晩培養した。続いて、 $2 \times 10^5$ 個の精製ナイーブCD4+ T細胞を培養物に添加した。7日後に、T細胞をプレフェルジンAの存在下でPMA/イオノマイシンにより6時間刺激した。続いて細胞を、IL-13(Th2型サイトカイン)およびIFN(Th2型サイトカイン)の細胞内発現に関して染色した。図5に示されているように、抗デクチン-1-Pam3はIL-13+ CD4+ T細胞応答の低下をもたらした(0.842%)。抗デクチン-1とPam3の組み合わせも、Pam3のみも、Th2型T細胞応答を低下させなかった(それぞれ3.3.24%または3.47%)。図5は、コンジュゲートはTh2型T細胞応答を低下させたが、コンジュゲートされていない抗デクチン-1とPam3の共投与はTh2型T細胞応答を低下させなかったことを実証している。

#### 【0144】

実施例2: 抗hデクチン-1 Pam3コンジュゲート処理がインビトロでTh2型T細胞応答およびIgEレベルを下方制御するか否かについての調査

抗hデクチン-1 mAbの有効性は、患者由来のPBMCを用いてインビトロで検査することができる。この実施例では、プリックテストでブタクサアレルゲンに反応する患者を標的とすることができる。この群の患者を標的とすることにより、アレルゲン特異的T細胞応答と全体的T細胞応答の両方を評価することができる。アレルゲン特異的Igレベルと全Igレベルの両方も評価することができる。全T細胞応答および全Igレベル、特にIgEレベルの評価は、他のアレルゲン特異的免疫応答の下方制御における抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートの有効性を予測するために役立つ。一般に、1つのアレルゲンに対してアレルギー性である患者は、異なるアレルゲンに対しても、さらには皮膚テストでもアレルギー反応を示す。

#### 【0145】

以下の方法を、コンジュゲートのインビトロ有効性を検査するために使用することができる。プリックテストでブタクサアレルゲンに対して陽性反応を示すアレルギー患者20人

からの全血（患者当たり60～80ml）を用いる。続いてPBMCおよび血清を調製する。ブタクサアレルゲン特異的T細胞応答は、以前に記載された通りに評価することができる（CAMPBELL, J. D. ET AL. CLIN EXP ALLERGY 40, 1025-1035, (2010)）。手短に述べると、細胞 $5 \times 10^6$ 個/mlのPBMC培養物200 $\mu$ Lを、抗原の非存在下、脱脂したブタクサアレルゲン抽出物、またはamb a 1とともに、96ウェルプレート内でインキュベートする。Pam3とコンジュゲートさせた抗hデクチン-1 mAb、対照mAb、カードランの存在下もしくは非存在下、またはすべての非存在下で7日間インキュベートする。マウスのデクチン-1 mAbおよびキメラ抗hデクチン-1 mAbは、DCと結合できDCを活性化できる同程度の能力を有する（データは提示せず）。インビトロ培養の前および後の抗原特異的T細胞の数量および質は、多色フローサイトメトリー（LSRII）を用いるCD154およびサイトカイン（IL-4、IL-5、IL-13、IL-10、IL-17、IL-21、IL-22、TNF およびIFN）のICSによって評価することができる。インビトロ培養の前および後の、PBMCの48時間刺激後に培養上清中に分泌されたサイトカインおよびケモカインを、Luminexによって測定する。ICSおよびLuminexの両方のために、PBMCをブタクサアレルゲンおよびフィトヘマグルチニン（PHA）で刺激する。血清中の全Igおよびブタクサ抗原特異的Ig（IgM、IgG、IgAおよびIgE）をELISAによって評価する。年齢および性別を一致させた健常者からの血清を対照として用いる。96ウェルプレート中でのPBMC培養は、T細胞応答に関して記載した通りに行う。第12日に、培養上清中の全Igレベルおよび抗原特異的IgレベルをELISAによって評価する。T細胞およびB細胞の応答に関していくつかの比較を行うことができる。これらには、以下が含まれる：（1）対照と抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートとの間での、全Th2型応答およびアレルゲン特異的Th2型応答のレベルを比較する。続いて、抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートがTh2型応答を下方制御する能力を、カードランまたはカードラン+Pam3（コンジュゲートされていない）の能力と比較すること；（2）インビトロ培養の前および後の全T細胞およびアレルゲン特異的T細胞の数量および質を、ICSおよびLuminexのデータを用いて種々のタイプのT細胞のパーセンテージおよび量を評価することによって比較する。個々のサイトカインおよびその組み合わせを発現するT細胞を評価することによって、各タイプのT細胞の相対量を測定すること；（3）対照および抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートという2群における全Igおよびアレルゲン特異的Ig、特にIgEのレベルを比較する。続いて、抗hデクチン-1-Pam3処理群におけるIgレベルを、カードラン処理群（またはカードラン+Pam3処理群）におけるレベルと比較すること；（4）種々のタイプのT細胞応答のレベルとIgアイソタイプのレベルとの関連に関して比較分析を行うこと；ならびに（5）抗原の存在下および非存在下における抗hデクチン-1-Pam3の全般的有効性を比較すること。

【0146】

抗hデクチン-1-Pam3処理は全てを下方制御することが想定される。

【0147】

実施例3：抗hデクチン-1-Pam3処置がNHPにおいてTh2型免疫応答を下方制御してアレルギー性アトピーを制御することについての調査

抗hデクチン-1 mAb（15E2）はNHPにおいてデクチン-1と交差反応するが、マウスでは交差反応しない。これにより、NHPのアレルギー性アトピーモデルにおいて抗hデクチン-1 mAb-Pam3の有効性を試験することが可能になる。mAbコンジュゲートおよびHDMA混合物の注射には真皮内経路を用いるが、これはデクチン-1を発現するDCが、ヒト（Ni, et al., 2010）およびサル皮膚の真皮に主として局在するためである。アレルギー疾患モデルにおける抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートの試験の第1の段階として、抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートの追加の静脈内注射も含める。これにより、血中mDCが活性化されて、Th2型免疫応答のさらなる下方制御がもたらされると考えられる。抗hデクチン-1-Pam3はアレルゲンの併用注射を伴っても伴わなくても有効であると考えられる。ある特定の態様において、抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートおよびアレルゲンを同時に注射してもよい。これは、アレルゲンのみの注射後と比較することにより、アレルゲン特異的免疫応答および治療効果を評価するのに役立つと考えられる。

【0148】

10

20

30

40

50

以下の方法は、コンジュゲートのインビボ有効性を試験するために使用することができる。若齢成体アカゲザル（マカク属アカゲザル（*Macaca mulatta*）、雌性、3～5歳）を、皮膚テスト（ヒト用の市販の皮膚テストキット）によってスクリーニングする。HDMA<sup>+</sup>の動物個体を選択する。アラム中のイエダニ（*Dermatophagoides farinae*）アレルゲン（HDMA：Greer Labs）25 μgの皮下注射およびDtaPの皮内注射によって動物個体を感作させる。すべての動物個体に、アラム中の25 μg HDMAの4回の皮下注射による追加刺激を行う（Schelegle, et al., 2001; Seshasayee, et al., 2007）。感作したことを皮膚テストおよび血清中Igレベルの測定によって確認する。第11～13週に、各動物個体に対して、PBS中の25 μg HDMAを1週間の間隔で2つの部位に3回投与する。第15～17週に、同じ動物個体に対して、PBS中の25 μg HDMAおよび1mgの抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートを2つの部位に3回皮内注射し、加えて1mgの抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートの静脈内注射も行う。血液試料（各試料採取日に動物個体1匹当たり7～10ml）を、第-1週、第0、2、4、6、8、11、13、15、17、18、および20週にACDチューブ内に収集する。PBMCおよび血清を調製する。第14週および18週に、動物個体に、1部位当たり12.5 μgのHDMAの皮内注射を行い（動物個体1匹当たり4部位ずつ）、皮膚反応を測定する。皮膚生検試料も48～72時間後に採取し、動物個体1匹当たり2件ずつの生検試料をOCT培地中で凍結させる。残り2件の生検試料は、小片を500 μlのPBSで洗浄した後にIgEレベルを測定するために用いる。血清中サイトカイン（IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-17、IL-21、IL-22、TNF およびIFN）をLuminexによって測定する。全IgレベルおよびHDMA特異的Igレベルを、従来の公知の方法によりELISAによって評価する（Schelegle, et al., 2001; Seshasayee, et al., 2007）。プールしたヒトHDMA IgE陽性血清（RAST検査で高レベル）を、陽性対照として用いる。陰性対照は、PBS、およびHDMA皮膚テスト陰性の動物個体由来の血清からなっておりよい。市販の濃縮キットで濃縮したPBMCおよびT細胞を、50 μg SEBの存在下または非存在下で一晩インキュベートする。培養上清中のサイトカインをLuminexによって測定する。T細胞を、細胞内IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-17、IL-21、IL-22、TNF およびIFN に関して染色する。凍結皮膚生検試料の切片を、DC（Park, et al., 2008; Gros, et al., 2009）、好酸球、好中球、好塩基球およびメモリー/ナイーブT細胞（Park, et al., 2008; Gros, et al., 2009; Simon, et al., 2011; Spergel, et al., 2005; Langeveld-Wildschut, et al., 1996; Hogan, et al., 2008; Menzies-Gow, et al., 2002; Gaga, et al., 2008）に関して染色する。以下が評価され得る：（1）感作の前および後、HDMAの3回の投与後（対照群）およびHDMA + 抗hデクチン-1 mAb Pam3コンジュゲートの3回の投与後（実験群）の血清中IgEレベルを比較すること；（2）血清中サイトカインレベルを各時点で評価して比較すること；（3）単一のサイトカインおよびその組み合わせ、特にIL-17およびTh2型サイトカインを発現するT細胞の頻度を各時点で比較すること；（4）全PBMCおよび濃縮したT細胞集団によるサイトカイン分泌の量を各時点で比較すること；（5）皮膚中に浸潤したDC、好酸球、好中球、好塩基球およびリンパ球の頻度を比較すること；（6）第14週および18週にHDMA注射後の皮膚反応およびIgEを評価して比較すること。

10

20

30

40

【0149】

抗hデクチン-1-Pam3処置はTh2型T細胞応答、IgEレベル、リンパ球浸潤、および皮膚反応の低下をもたらすと予想されることが想定される。

【0150】

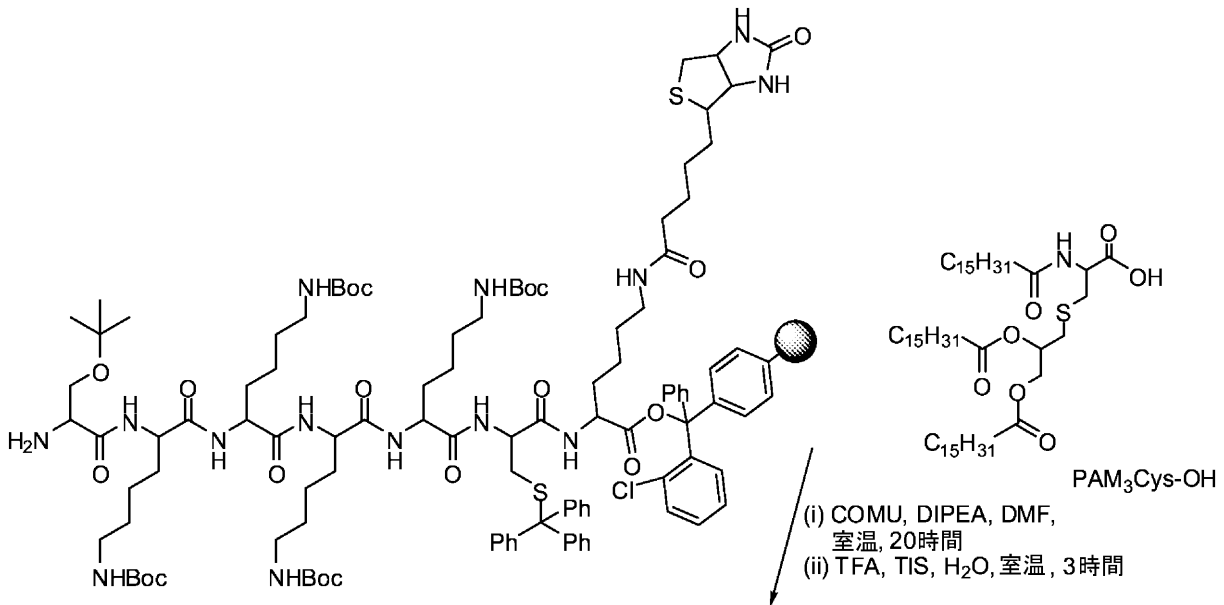
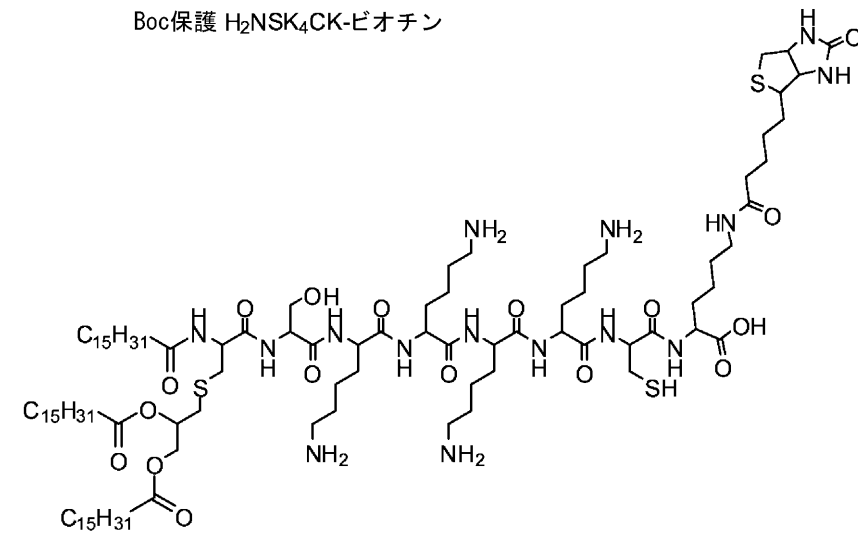
実施例4：TLRコンジュゲート合成

本実施例は抗体へのTLR2、Pam3-CSK4のコンジュゲーションを示す。

【0151】

H<sub>2</sub>NSK<sub>4</sub>CK-ビオチン樹脂とPAM<sub>3</sub>Cys-OHとのペプチドカップリング（スキーム1）

スキーム1：

Boc保護 H<sub>2</sub>NSK<sub>4</sub>CK-ビオチンPAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>CK-ビオチン

## 【 0 1 5 2 】

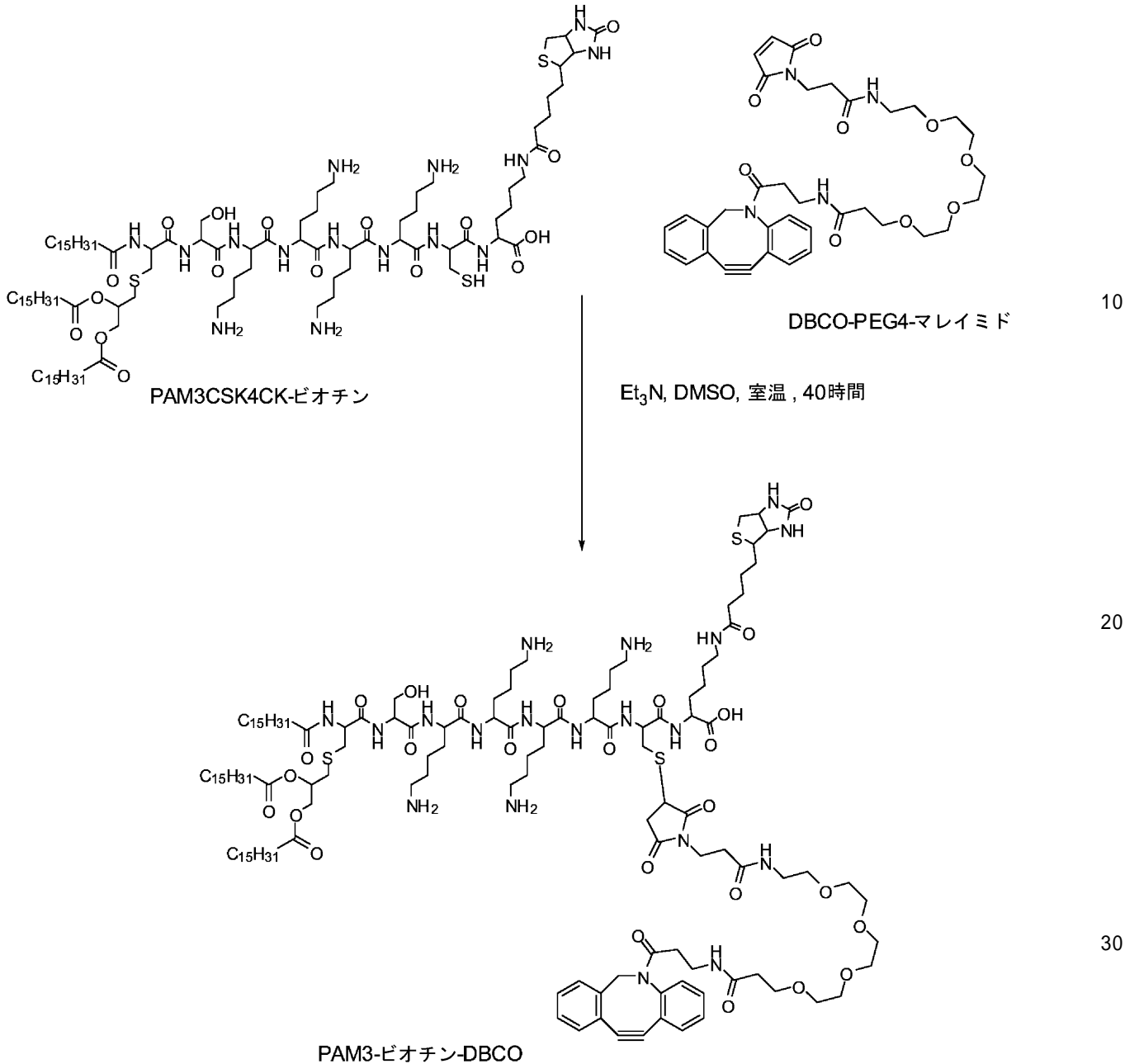
PAM<sub>3</sub>Cys-OH (60mg、0.07mmol) を、清浄な反応バイアル内で0.6mlのジクロロメタンにより溶解させた。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.02ml、0.11mmol)、COMU (28mg、0.07mmol) およびDMF (0.2ml) を添加した。混合物を十分に振盪させた後に、反応バイアルを20分間静置した。H<sub>2</sub>NSK<sub>4</sub>CK-ビオチン樹脂 (14.1mg) を添加し、時々回旋攪拌しながら反応を20時間行わせた。樹脂を濾過して (ガラス濾過漏斗でのすすぎ洗いのためにDMFを用いて)、別のバイアルに移した。切断用混液 (561 μLのTFA、31 μLの水、18 μLのトリイソプロピルシラン) を、このバイアル内の樹脂に添加した。バイアルを時々回旋攪拌して3時間後に、ガラスウールを詰めたパスツールピペットを用いて樹脂を濾過し、濾液を蒸発させた7.3mgの産物 (PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>CK-ビオチン) を得た。産物のクロマトグラムおよび質量スペクトルは図6に示されている。

40

## 【 0 1 5 3 】

PAM<sub>3</sub>-ビオチン-DBCOの合成 (スキーム2)

スキーム2:



10

20

30

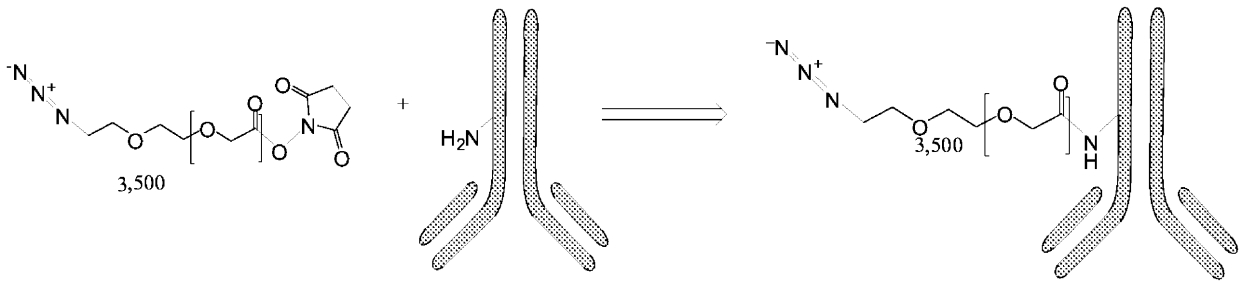
40

## 【 0 1 5 4 】

DBCO-PEG4-マレイミド (2mg, 3  $\mu$ mol) を、0.4ml DMSO中に溶解させた。PAM3CSK4CK-ピオチン (上記のスキーム1の通りに合成 ; 7.3mg, 3  $\mu$ mol) およびトリエチルアミン (7.3  $\mu$ l, 52  $\mu$ mol) を添加した。混合物を室温で40時間攪拌した。産物の抽出クロマトグラムを図7に示している。未反応ペプチドは656.4527に観察された。これは656.4547という理論的質量を有すると予想される。未反応の架橋剤は675.3020に観察され、675.3032という理論的質量を有すると予想される。産物は881.2185に観察され、881.2194という理論的質量を有すると予想される。(ペプチドおよび産物は三重電荷を有しており、プロトン質量として1.008を用いたことに留意されたい)。抽出クロマトグラムは、産物の他に、少量の未反応ペプチドおよび架橋剤を示している。(未反応ペプチドは産物とともに溶出するため、別々のクロマトグラム上に示されている)。ピーク面積の点では、未反応ペプチドは8.6%であり、未反応の架橋剤は4.49%であり、産物は86.91%である。

## 【 0 1 5 5 】

抗体に対するPAM3-ピオチン-DBCO分子のコンジュゲーション (スキーム3)  
 スキーム3 :

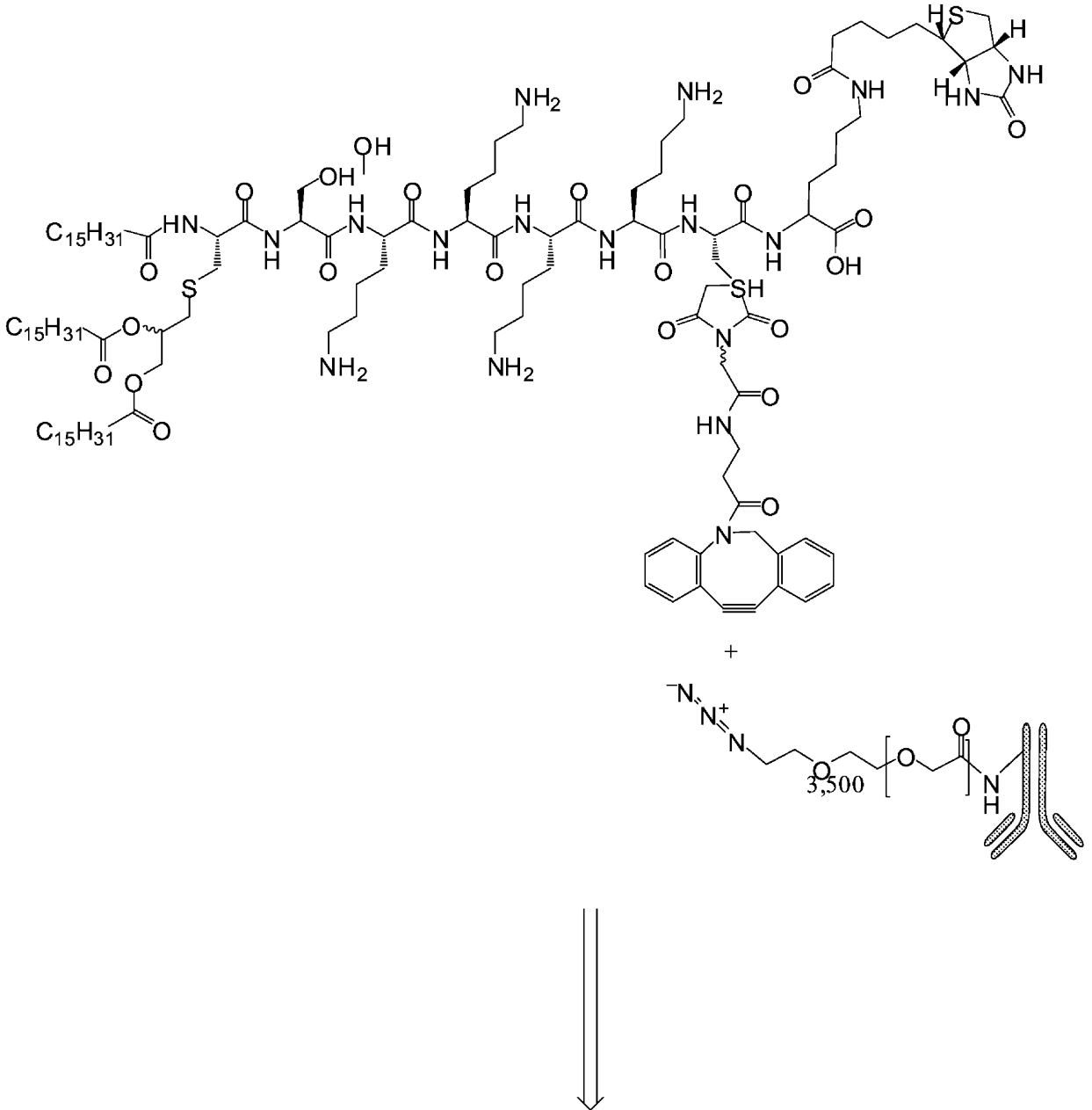


【 0 1 5 6 】

抗体に対するPAM3-ビオチン-DBCO分子のコンジュゲーション (スキーム4)

10

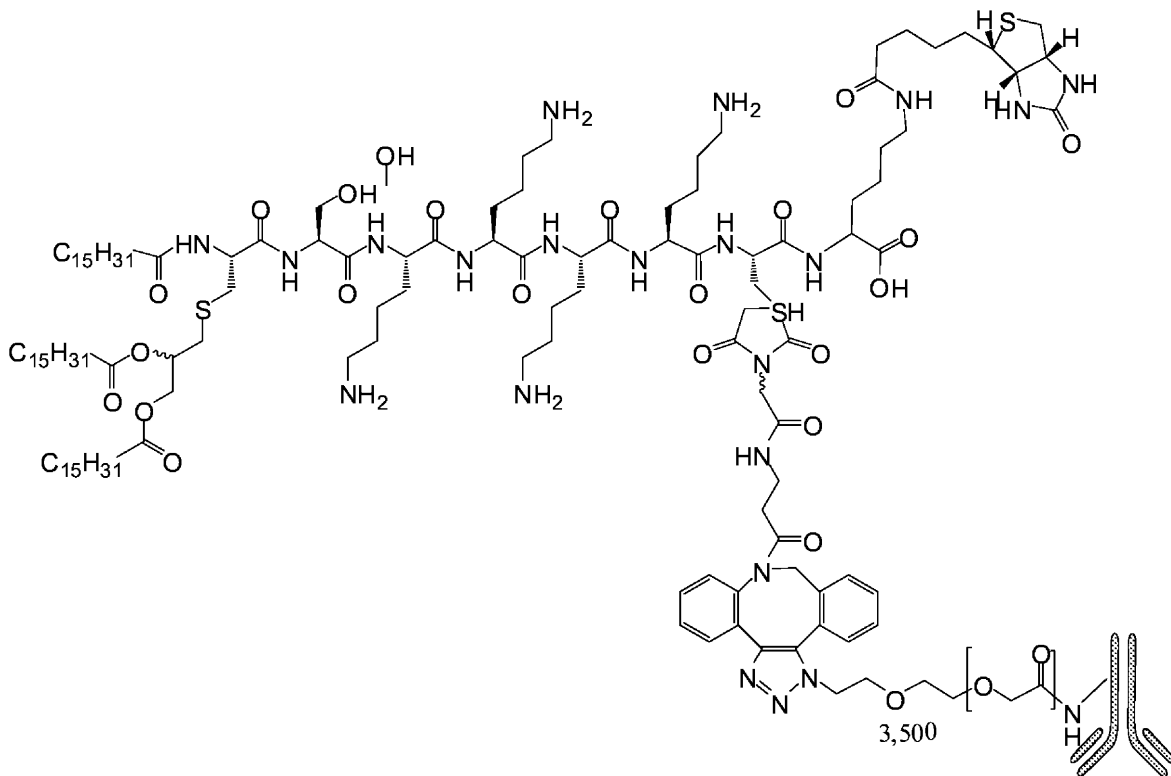
スキーム4 :



20

30

40



10

20

## 【 0 1 5 7 】

続いてPAM3-ビオチン-DBCOを抗体に対してコンジュゲートさせた。DMSO中の1mM NHS-PEG3500-アジド (66.7nmol) 93.7  $\mu$ Lおよび5.2mg/ml のIgG (6.67nmol) 288  $\mu$ Lを、862  $\mu$ LのPBSに添加した (スキーム3)。この溶液を遮光した上で、氷上で2時間インキュベートし、反応を2  $\mu$ Lの2M Tris緩衝液によって停止させ、氷上で15分間インキュベートした。未反応のNHSエステルを除去するために、反応混合物を7,000 MWCOのslide-a-lyzerに対してPBS中で透析した。28.1  $\mu$ Lの1mM PAM3-ビオチン-DBCO使用液 (20nmol) を、透析したIgG-PEG3500-アジド産物に添加した (スキーム4)。この混合物を4 で24時間インキュベートした。未反応のPAM3-ビオチン-DBCOを除去するために、反応混合物を7,000 MWCOのslide-a-lyzerに対してPBS中で透析した。

30

## 【 0 1 5 8 】

実施例5：Pam3CSK4とNHS-PEG-アジドとのコンジュゲーションおよびデクチン

デクチン抗体に対するPam3CSK4のコンジュゲーションのために以下の方法を用いることができる。

## 【 0 1 5 9 】

DMSO中の1mM NHS-ホスフィンの187.5  $\mu$ L (187.5nmol) を、5.22mg/ml 抗hデクチン-1抗体の552.5  $\mu$ L (18.8nmol) と、1238  $\mu$ LのDPBS中で混合する。この混合物を続いて、遮光した上で、氷上で2時間インキュベートする。反応を2  $\mu$ Lの2M Tris緩衝液で停止させ、続いて氷上で15分間インキュベートする。余分な未反応のNHSエステルを除去するために、7,000 MWCOのslide-a-lyzerをDPBS中で用いてよい。続いて、エンドトキシン非含有水中の664  $\mu$ M Pam3CSK4の85  $\mu$ L (56.4nmol) およびDPBS中の664  $\mu$ M NHS-PEG-アジドのDPBS中の85  $\mu$ L (56.4nmol) を、7超のpHにおいて1,307  $\mu$ LのDPBSに添加する。この反応混合物を続いて氷上で2時間インキュベートする。次に、ホスフィン化抗hデクチン-1抗体を添加し、混合物を続いて氷上で24時間インキュベートする。続いて、未反応のPam3-PEG-アジド分子を除去するために、7,000 MWCOのslide-a-lyzerを用いる。

40

## 【 0 1 6 0 】

実施例6：TH2応答の制御における デクチン-1-Pam3コンジュゲートの有効性の前臨床評価

デクチン-1は、ある種の真菌感染症および細菌感染症に対する先天免疫および適応免疫の両方に寄与するパターン認識受容体である。本出願人らは以前に、デクチン-1およびTL

50

R2を介するシグナルが相乗的に作用してDCを活性化し、TH2応答の低下をもたらすことを示した。本実施例では、本出願人らは -hデクチン-1-Pam3CSK4 (Pam3) コンジュゲートを作製し、インビトロでのヒト、およびインビボでの非ヒト霊長動物 (NHP) におけるTH2応答の抑制に対するその有効性を試験した。

#### 【 0 1 6 1 】

デクチン-1活性化へのTLR2-Lの添加は、HA-1特異的Th2型CD4+ T細胞応答の低下を招く。CFSE標識したCD4+ T細胞を、デクチン-1-HAのみまたは デクチン-1-HA + TLR2-Lのいずれかを添加したDCと7日間共培養した。T細胞をHA1ペプチドで再刺激して、サイトカインレベルをLuminexによって分析した (図8A)。図8Bに示されているように、デクチン-1活性化に対するTLR2-Lの添加は、IFN- の増大、IL-13の減少、およびIL-17産生の増大を招いた (図8B)。

10

#### 【 0 1 6 2 】

図1に示されているように、溶解性を高める一助として、かつ複数のpam3分子の架橋を防ぐために、pam3CSK4にはリンカーを付着させている。ホスフィン基を デクチン-1に付加し、それを続いてPam3CSK3上の遊離アジドと反応させることにより、この2つの化合物同士のコンジュゲートを作製する。

#### 【 0 1 6 3 】

抗体とpam3のコンジュゲートの結合能をPBMCにおいて試験し、漸増量の デクチン-1、pam3、または デクチン-1-pam3のいずれかをを用いた場合のTLR2レポーター細胞のTLR2シグナル伝達活性を試験した。図2に示されているように、 デクチン-1-pam3では結合性が全く失われておらず (図2A)、TLR2活性も比較的不变である (図2B)。次に、PBMC (図9A) およびmDC (図9B) を24~48時間培養し、続いてLuminex分析のために上清を採取した。デクチン-1-Pam3は細胞を漸増量依存的な様式で活性化する (図9A~B)。

20

#### 【 0 1 6 4 】

次に、mDCをまずバッフィコートから精製し、続いて、20ng/mLのTSLPと、100ng/mLのpam3、10µg/mLの抗デクチン-1または10µg/mLの デクチン-1-pam3のいずれかとともに培養した。細胞を採取して、48時間後に染色した。図4A~Bに示されているように、デクチン-1-pam3コンジュゲートは血中mDC上のTSLP誘発性OX40L発現を減少させることができる。図4AはmDC染色を示しており、図4Bはまとめた結果を示している。

#### 【 0 1 6 5 】

次に、Th2型T細胞について調べた。mDCをまず、40ng/mLのTSLPと、20ug/mLの デクチン-1または デクチン-1-pam3のいずれかによって初回刺激した。24時間後に、ナイーブCD4+ T細胞をmDCに添加して、さらに6日間培養した。PMA/イオノマイシンで6時間、プレフェルジンAで4時間刺激した細胞において、細胞内サイトカインレベルを細胞内染色によって分析した (図10A)。細胞を CD3/CD28ビーズで48時間刺激することによって、細胞上清サイトカインレベルを測定した (図10B)。図10に示されているように、デクチン-1-pam3コンジュゲートはTSLP-mDC誘発性Th2型CD4+ T細胞応答を低下させることができるが、その一方でTH1型およびTH17-型のCD4+ T細胞応答は促進する。

30

#### 【 0 1 6 6 】

最後に、HDMA特異的血清中IgEについて、HDMA反応性アカゲザルで試験した。動物個体をHDMAに感作させることによって、アトピーのNHPモデルを作製した (図11A)。続いて、HDMA特異的血清IgEを測定した。デクチン-1 Pam3処置は、インビボでのHDMA特異的血清IgEを減少させた (図11B)。図14は、この実験の過程で採取したこれらの動物個体由来の血清からの細胞内サイトカインシグナル伝達を示している。

40

#### 【 0 1 6 7 】

これらの結果は、デクチン-1およびTLR2を介したDCの同時活性化により、インビトロでのヒトにおいて、TH1応答およびTH17応答を幾分強化しながら、TH2応答を有意に低下させることを示している。その上、デクチン-1-pam3は、インビボで非ヒト霊長動物においてHDMA特異的血清IgE応答を低下させることもできる。デクチン-1-pam3コンジュゲートは、TH2が動因となる炎症性疾患に対する新規治療薬候補になりうると考えられる。

50

## 【0168】

本発明の態様は、本明細書の全体を通じて列記された1つもしくは複数の要素を含んでもよいが、または1つもしくは複数の要素を含まなくてもよいことを明確に想定している。例えば、具体的な態様が、本明細書に記載された1つの特定のTLRを含んでもよいが、または本発明の態様が、当技術分野において公知でありかつ/または本明細書に記載されるあるクラスのTLRもしくは2種もしくはそれ以上のTLRを範囲に含んでもよい。本発明はまた、列記された要素（例えば、特定のTLR、または特定のクラスのTLR）を含まなくてもよい。その上、範囲または数値が提供されている場合には、ある特定の範囲または数値を本発明が含まなくてもよいことを明確に想定している。最後に、本発明が特定の特徴を含むことに関して説明している場合には、本発明がそのような特徴を含まなくてもよいことも明確に想定している。

10

## 【0169】

本明細書において開示されかつ特許請求される方法のすべてを、本開示に鑑みて、不要な実験を行わずに構成して実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様に関して説明してきたが、本発明の組成物および方法を好ましい態様に関して説明してきたが、方法に対して、および本明細書に記載の方法の段階または段階の順序において、本発明の概念、趣旨および範囲から逸脱することなく変更を加えることができることは当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連しているある特定の剤を本明細書に記載の剤の代わりに用いることができ、その場合にも同一または類似の結果が得られることは明らかであろう。当業者に明らかならすべての類似した置換物および改変物は、特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨、範囲および概念の範囲内にあると考えられる。

20

## 【0170】

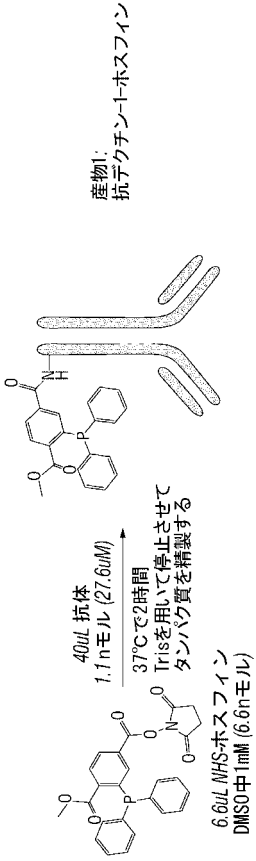
参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載のものを補足する例示的な手順上の詳細または他の詳細を提供する範囲で、参照により本明細書に明確に組み入れられる。

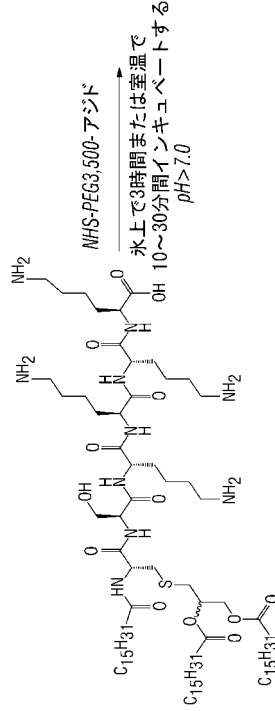
- Allakhverdi, *et al.*, *J Exp Med* 204, 253-258, (2007).
- Ballow, *J Allergy Clin Immunol* 118, 1209-1215; quiz 1216-1207, (2006).
- Banchereau & Steinman, *Nature* 392, 245-252, (1998).
- Barnes, *J Clin Invest* 118, 3546-3556, (2008).
- Bellinghausen, *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol* 126, 97-101, (2001).
- Bieneman, *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 115, 295-301, (2005).
- Bunyavanich, *et al.*, *Clin Mol Allergy* 9, 1, (2011).
- Campbell, *et al.*, *Clin Exp Allergy* 40, 1025-1035, (2010).
- Corren, *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 181, 788-796, (2010). 10
- Cox & Wallace, *Immunol Allergy Clin North Am* 31, 561-599, (2011).
- Ferwerda, *et al.*, *N Engl J Med* 361, 1760-1767, (2009).
- Flood-Page, *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 176, 1062-1071, (2007).
- Fukahori, *et al.*, *Clin Exp Allergy* 40, 1507-1515, (2010).
- Gaga, *et al.*, *Allergy* 63, 703-711, (2008).
- Gros, *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 124, 753-760 e751, (2009).
- Haldar, *et al.*, *N Engl J Med* 360, 973-984, (2009).
- Herbert, *et al.*, *Am J Pathol* 177, 1657-1664, (2010).
- Hessel, *et al.*, *J Exp Med* 202, 1563-1573, (2005). 20
- Hogan, *et al.*, *Clin Exp Allergy* 38, 709-750, (2008).
- Horvat, *et al.*, *J Immunol* 184, 4159-4169, (2010).
- Ito, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13138-13143, (2006).
- Ito, *et al.*, *J Exp Med* 202, 1213-1223, (2005).
- Jutel & Akdis, *Allergy* 66, 725-732, (2011).
- Kips, *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1655-1659, (2003).
- Krawiec & Wenzel, *Expert Opin Pharmacother* 2, 47-65, (2001).
- Laan, *et al.*, *J Immunol* 162, 2347-2352, (1999).
- Lajoie, *et al.*, *Nat Immunol* 11, 928-935, (2010). 30
- Langeveld-Wildschut, *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 98, 1019-1027, (1996).
- Larsson, *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol* 149, 1-15, (2009).
- LeibundGut-Landmann, *et al.*, *Nat Immunol* 8, 630-638, (2007).
- Levine & Wenzel, *Ann Intern Med* 152, 232-237, (2010).
- Lindner, *et al.*, *J Leukoc Biol* 86, 389-399, (2009).
- McCurdy, *et al.*, *J Immunol* 170, 1625-1629, (2003).
- McKinley, *et al.*, *J Immunol* 181, 4089-4097, (2008).
- Menzies-Gow, *et al.*, *J Immunol* 169, 2712-2718, (2002).
- Menzies-Gow, *et al.*, *Clin Exp Allergy* 37, 1023-1032, (2007). 40
- Meyer-Wentrup, *et al.*, *Blood* 111, 4245-4253, (2008).

- Mionnet, *et al.*, *Nat Med* 16, 1305-1312, (2010).
- Mohapatra, *et al.*, *Curr Opin Pharmacol* 10, 276-288, (2010).
- Morita, *et al.*, *Immunity* 34, 108-121, (2011).
- Murdoch & Lloyd, *Am J Respir Crit Care Med* 182, 464-476, (2010).
- Muzzarelli, *Mar Drugs* 8, 292-312, (2010).
- Nakae, *et al.*, *Immunity* 17, 375-387, (2002).
- Neurath, *et al.*, *Nat Med* 8, 567-573, (2002).
- Ni, *et al.*, *J Immunol* 185, 3504-3513, (2010).
- Olynych, *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 118, 837-843, (2006). 10
- Park, *et al.*, *Exp Dermatol* 17, 24-29, (2008).
- Reddy, *et al.*, *J Immunol* 164, 1925-1933, (2000).
- Ribbing, *et al.*, *Allergy* 66, 110-119, (2011).
- Rochman, *et al.*, *J Immunol* 178, 6720-6724, (2007).
- Schelegle, *et al.*, *Am J Pathol* 158, 333-341, (2001).
- Schnyder-Candrian, *et al.* *J Exp Med* 203, 2715-2725, (2006).
- Seshasayee, *et al.*, *J Clin Invest* 117, 3868-3878, (2007).
- Simon, *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 127, 194-199, (2011).
- Singh, *et al.*, *BMC Pulm Med* 10, 3, (2010). 20
- Sorgi, *et al.*, *J Immunol* 182, 4025-4035, (2009).
- Soyer, *et al.*, *Immunol Allergy Clin North Am* 31, 175-190, vii-viii, (2011).
- Spergel, *et al.*, *Ann Allergy Asthma Immunol* 95, 336-343, (2005).
- Steinman, *et al.*, *Annu Rev Immunol* 21, 685-711, (2003).
- Taylor, *et al.*, *Nat Immunol* 8, 31-38, (2007).
- Taylor, *et al.*, *J Immunol* 169, 3876-3882, (2002).
- Tomkinson, *et al.*, *Allergy* 65, 69-77, (2010).
- Valera, *et al.*, *J Immunol* 180, 5727-5736, (2008).
- Wang, *et al.*, *J Exp Med* 207, 2479-2491, (2010). 30
- Wenzel, *et al.*, *Lancet* 370, 1422-1431, (2007).
- Willment, *et al.*, *Eur J Immunol* 35, 1539-1547, (2005).
- Wilson, *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 180, 720-730, (2009).
- Yang, *et al.*, *J Exp Med* 205, 1063-1075, (2008).
- Ying, *et al.*, *J Immunol* 174, 8183-8190, (2005).
- Yoon, *et al.*, *J Immunol* 181, 2907-2915, (2008).

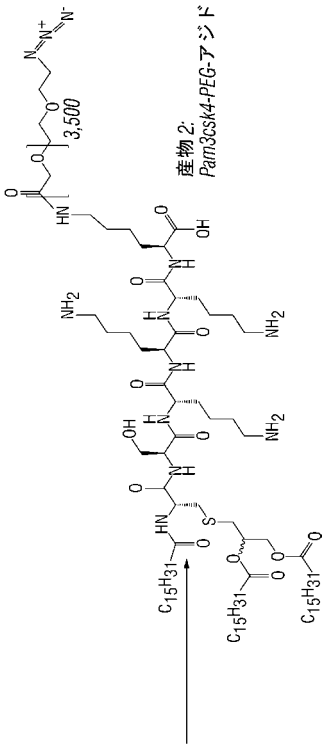
【 図 1 - 1 】



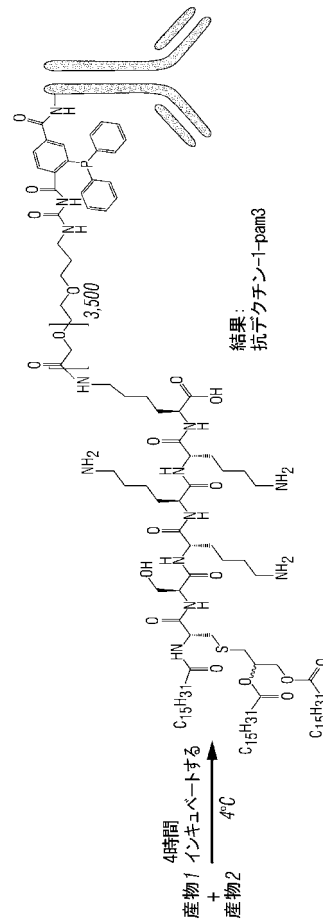
【 図 1 - 2 】

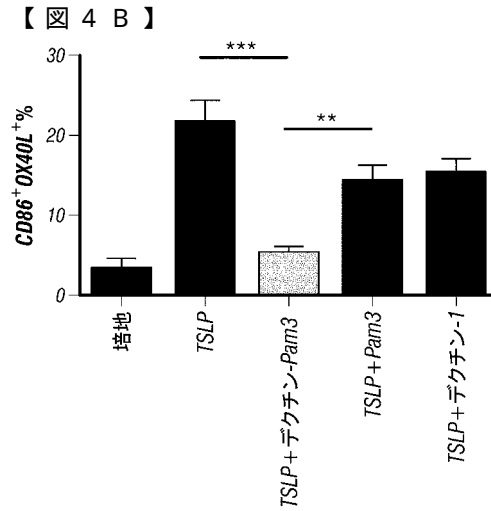
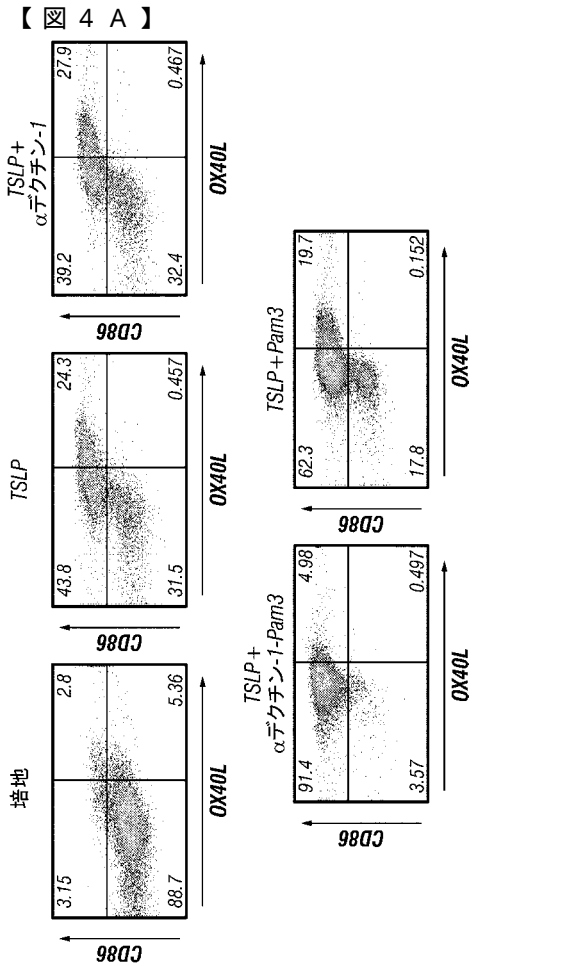
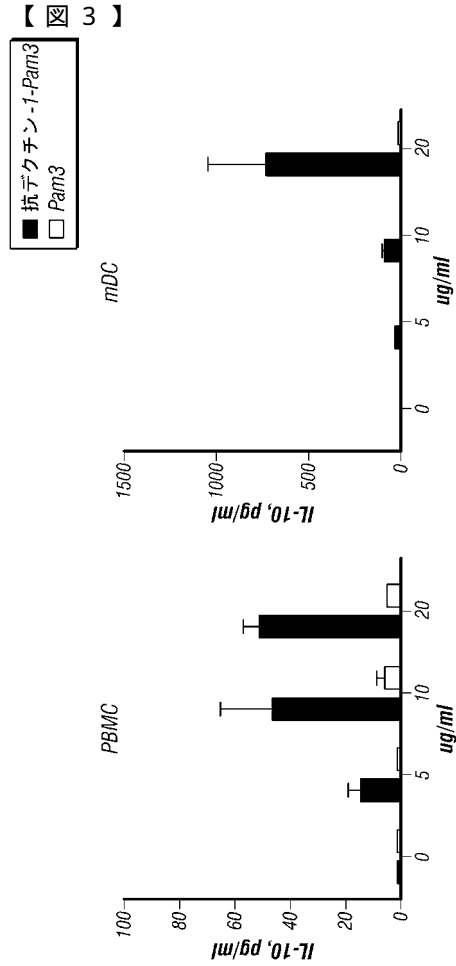
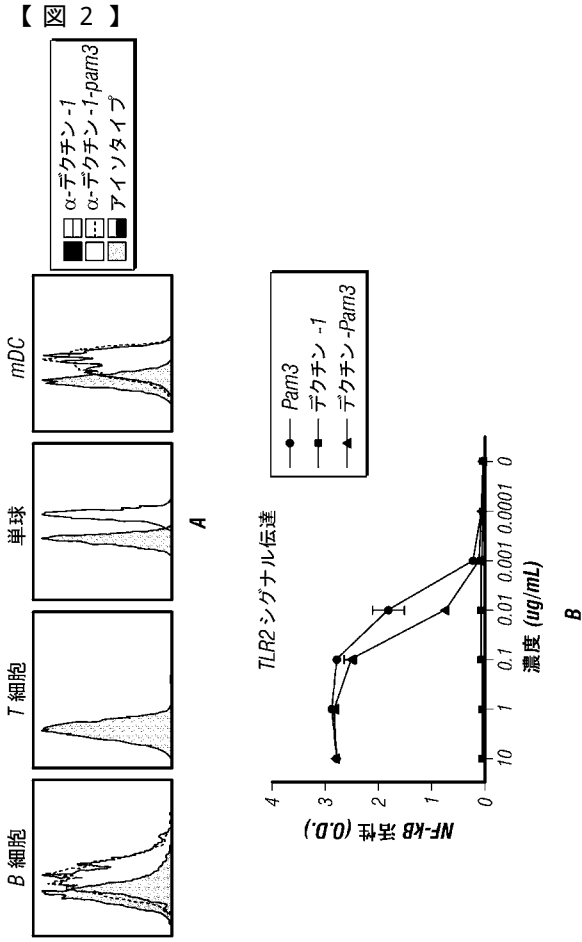


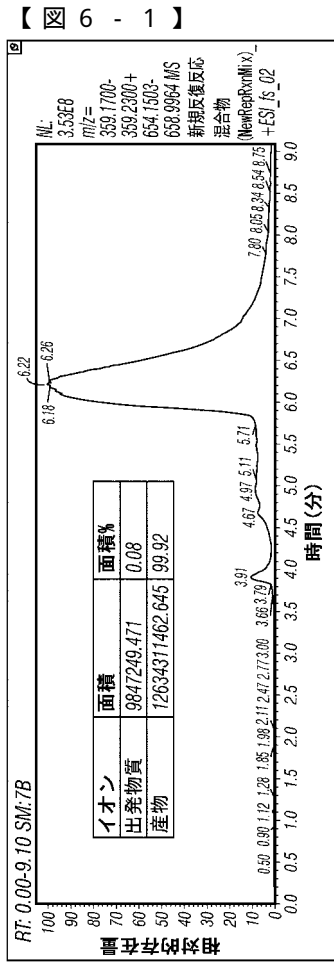
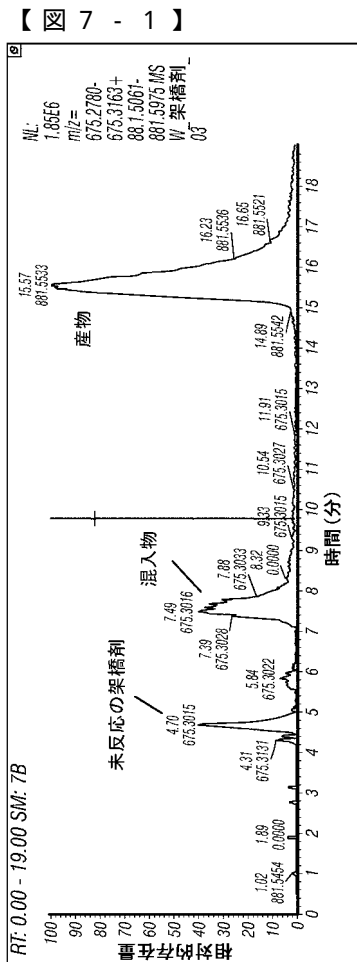
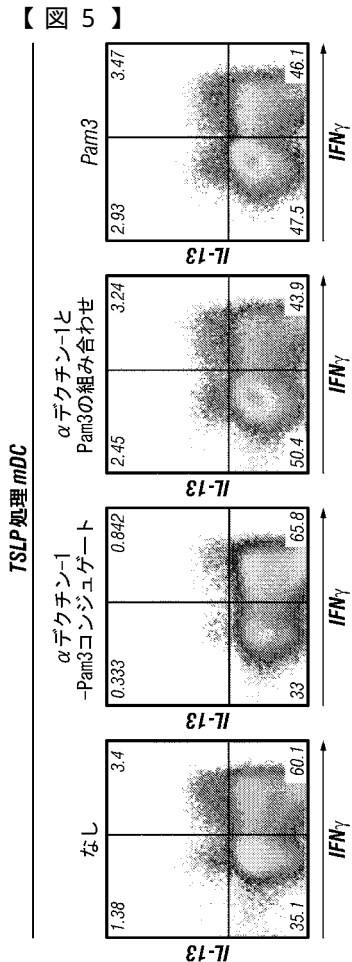
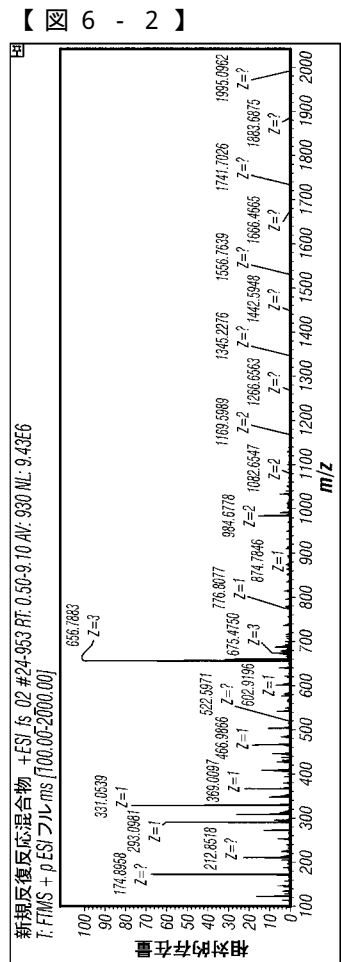
【 図 1 - 3 】



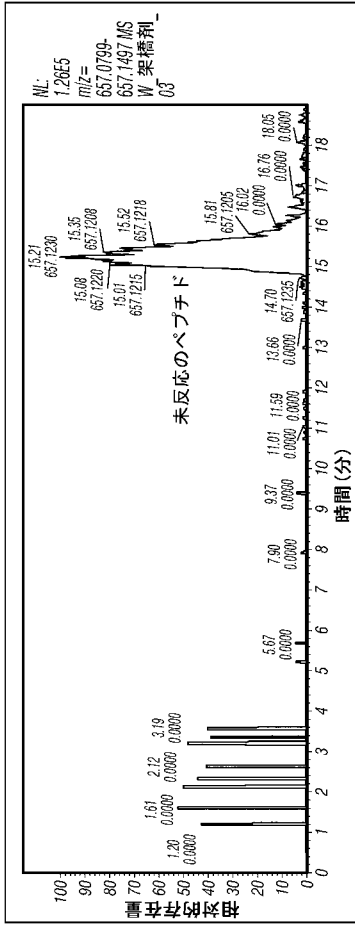
【 図 1 - 4 】



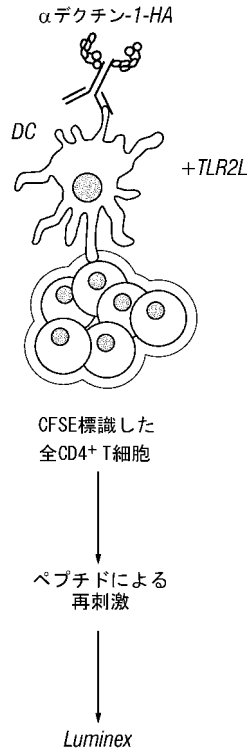




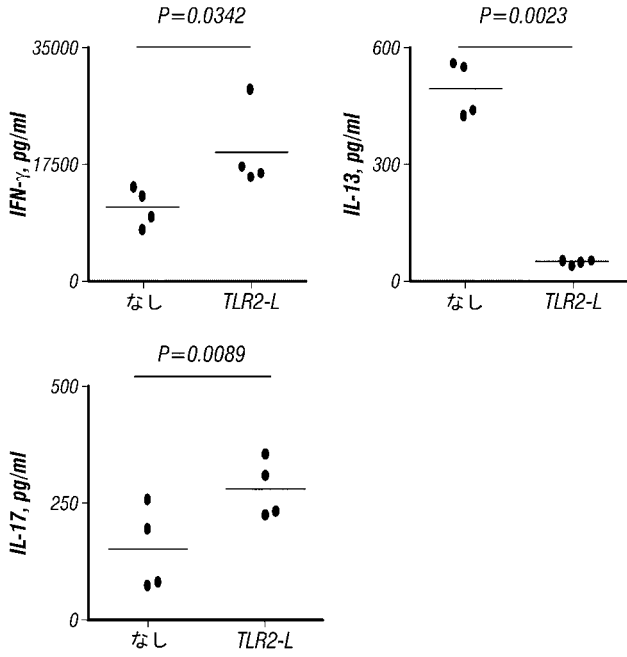
【 図 7 - 2 】



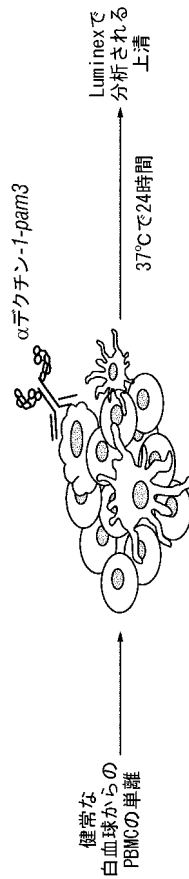
【 図 8 A 】



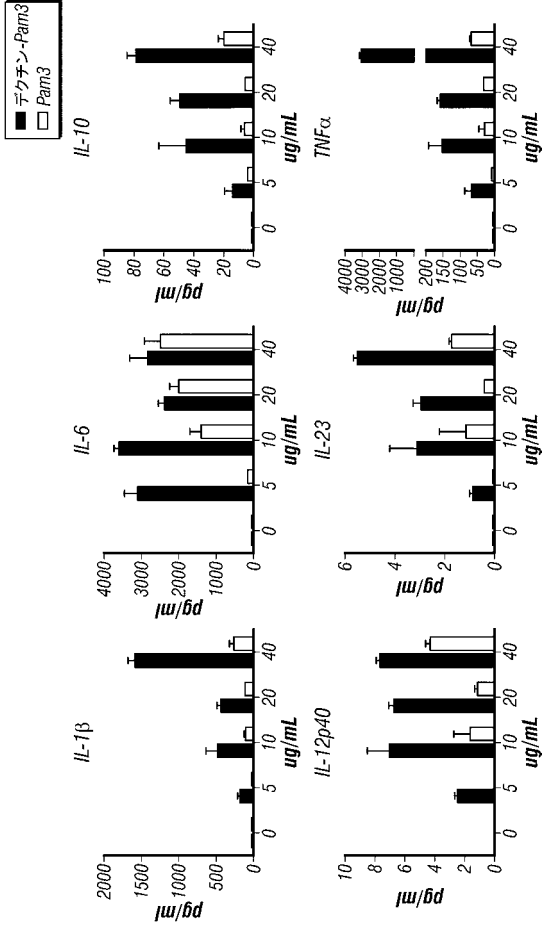
【 図 8 B 】



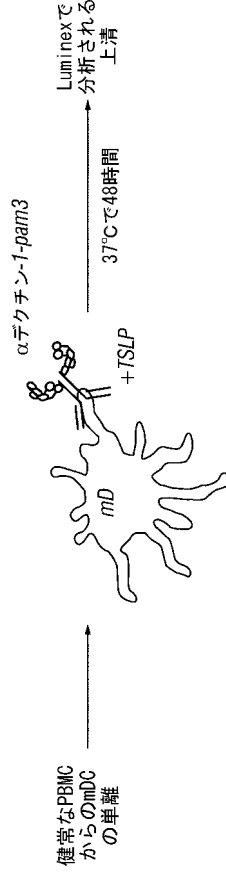
【 図 9 A - 1 】



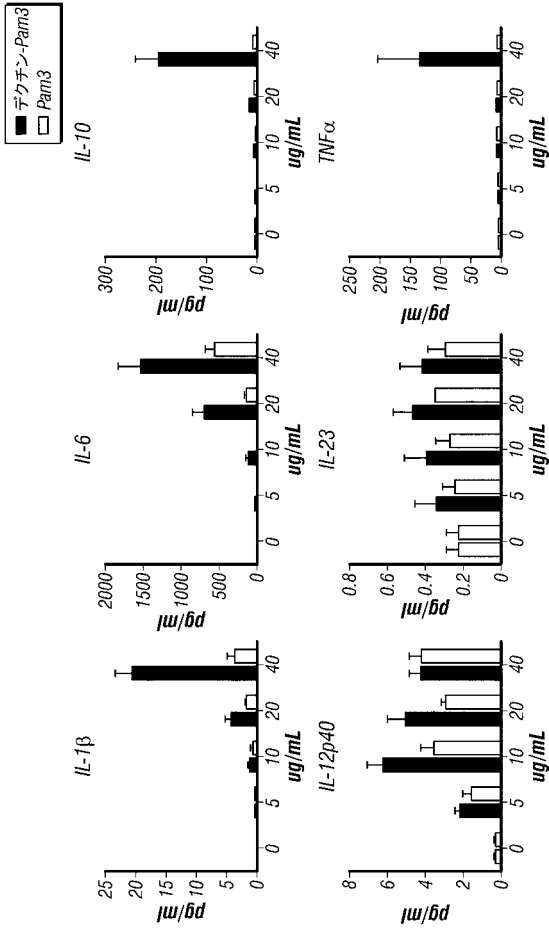
【 9 A - 2 】



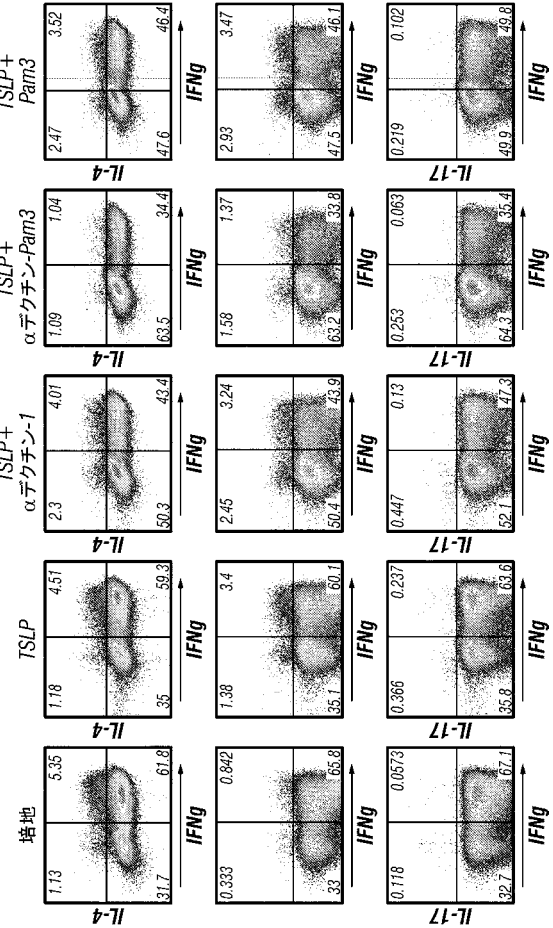
【 9 B - 1 】



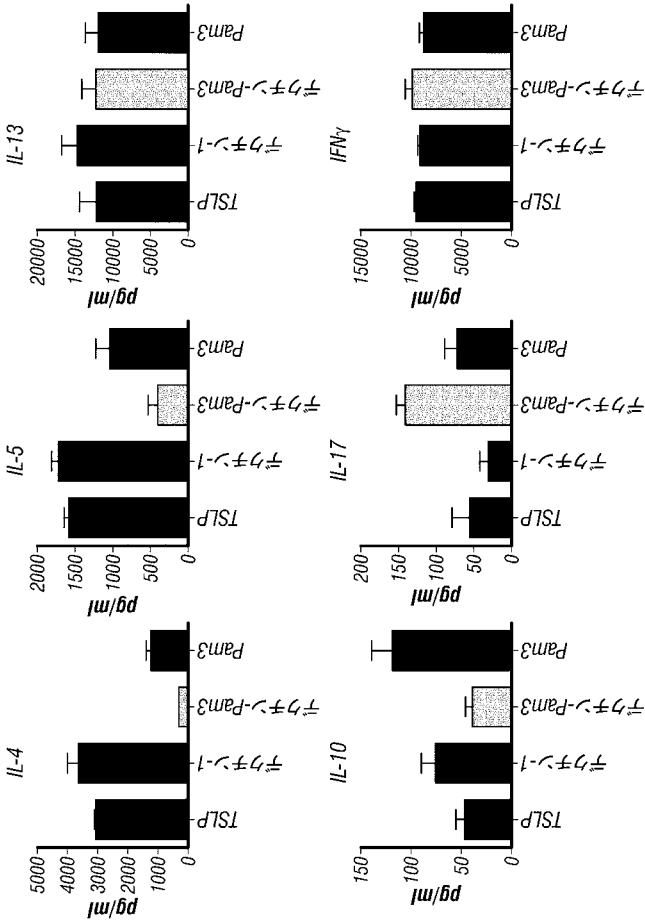
【 9 B - 2 】



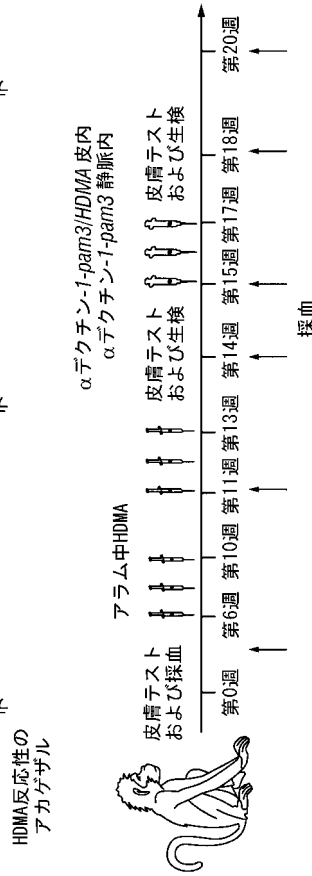
【 10 A 】



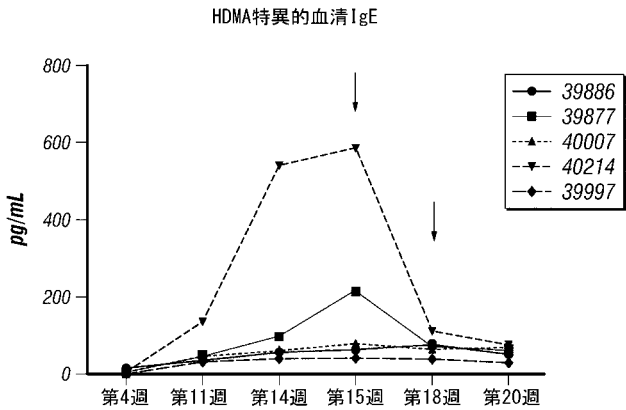
【図 1 0 B】



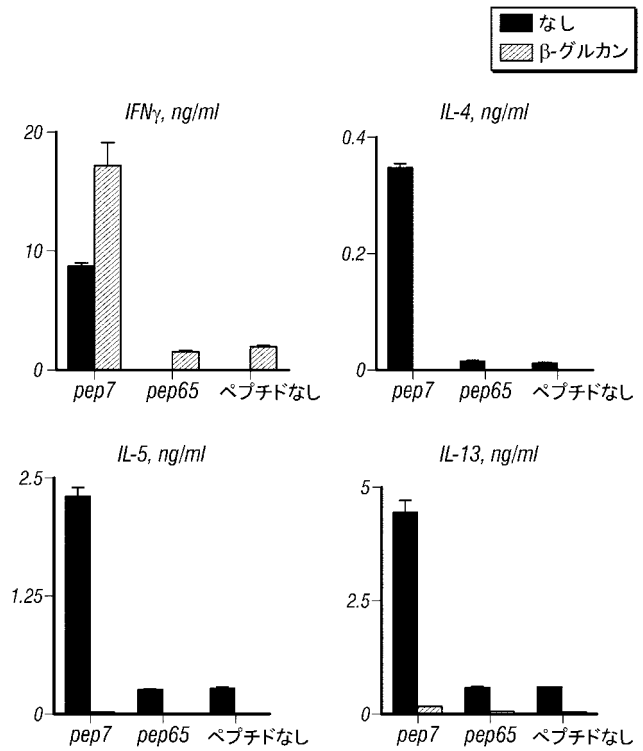
【図 1 1 A】



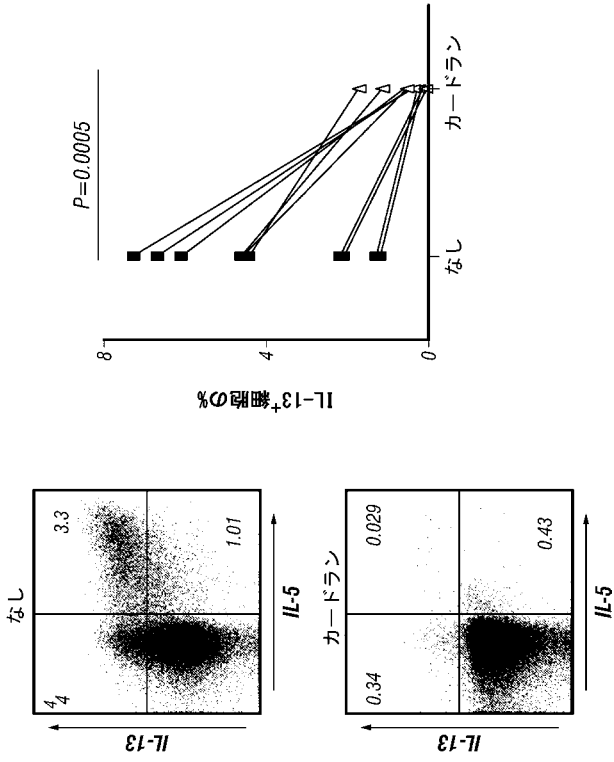
【図 1 1 B】



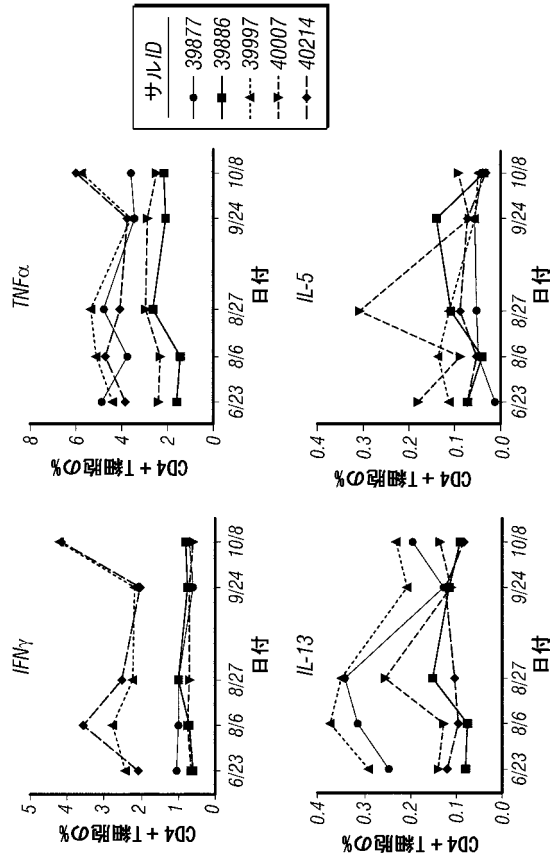
【図 1 2】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配列表 】

2017525655000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/33696
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/00, A61K 39/395, C07K 16/00, C07K 16/28, C07K 14/33, C07K 14/47 (2015.01) CPC - C07K 14/4741, C07K 16/2851, C07K 14/33, C12N 5/0639, C07K 2319/42 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8)- A61K 39/00, A61K 39/395, C07K 16/00, C07K 16/28, C07K 14/33, C07K 14/47(2015.01) CPC- C07K 14/4741, C07K 16/2851, C07K 14/33, C12N 5/0639, C07K 2319/42 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8)- C12P 21/08, C12N 5/0784 (2015.01) USPC- 424/182.1, 435/375, 530/391.7, 424/134.1, 424/178.1, 435/375, 530/387.3 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); PatBase, Google/Scholar; Pam 3 CSK 4, Pam3CSK4, Pam3Cys-Ser-(Lys)473HCl, Pam3Cys-SK4KKK, DC, TLR, agonist, APC, DC, targeted delivery, DC vaccine, CpG oligodeoxynucleotides, DEC205, CD205, dectin-1, anti-dectin-1, conjugate, allergy, asthma...		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/0052193 A1 (Oh, et al.) 28 February 2013 (28.02.2013) claims 8, 9, 18, 20, 24,	1-8, 63-70, 116, 117
Y	US 2012/0231023 A1 (Zurawski, et al.) 13 September 2012 (13.09.2012) para [0010], [0047], [0049]	1-8, 63-70, 116, 117
Y	Ferwerda, et al. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. Cell Microbiol. 2008, 10(10):2058-66; Abstract, pg 2060, col 1 to col 2	1, 5, 8/5, 66, 69/66, 70/69/66
Y	Drake, et al. The therapeutic potential of Toll-like receptor 7 stimulation in asthma. Inflamm Allergy Drug Targets. 2012, 11(6):484-91; Abstract, pg 2, para 2	6, 7, 8(5,7), 67, 68, 70/69/(67,68)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 August 2015 (23.08.2015)		Date of mailing of the international search report <b>15 SEP 2015</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/33696

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

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 9-62, 71-115  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	Z
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	17/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	11/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/04	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/60	
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	51/00	
A 6 1 K	38/43 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	A 6 1 K	38/43	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
		C 0 7 K	19/00	

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

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 オー サンコン  
アメリカ合衆国 2 1 2 3 7 メリーランド州 ボルチモア ケーターハム コート 4 5

(72)発明者 ケイン ボブ  
アメリカ合衆国 7 5 2 0 4 テキサス州 ダラス スイート 5 0 1 ライブ オーク ストリ

ート 3 3 1 0 ベイラー リサーチ インスティテュート内

(72)発明者 ブラウスキ ジェラルド

アメリカ合衆国 7 6 0 6 5 テキサス州 ミッドロージアン ジョーダン レーン 7 6 2 0

Fターム(参考) 4C076 AA95 BB11 BB13 CC04 CC06 CC07 CC15 CC16 CC18 EE23  
EE41 EE59 FF02

4C084 AA01 AA02 AA13 AA17 BA44 DC01 MA66 NA05 NA13 NA14  
ZA591 ZA592 ZA681 ZA682 ZA891 ZA892 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132  
ZB261 ZB262

4C085 AA03 AA21 AA25 DD62 DD63 EE01 GG02 GG05 HH03 HH11  
KA03 KB74 KB82 LL05 LL09 LL18

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA59  
ZA68 ZA89 ZB11 ZB13 ZB26

4H045 DA76 EA20 FA30 FA40