

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5800809号
(P5800809)

(45) 発行日 平成27年10月28日 (2015. 10. 28)

(24) 登録日 平成27年9月4日 (2015. 9. 4)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28 Z N A
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 N 15/02 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 C
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
請求項の数 44 (全 79 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2012-519021 (P2012-519021)	(73) 特許権者	506000184
(86) (22) 出願日	平成22年7月9日 (2010. 7. 9)		イナート・ファルマ・ソシエテ・アノニム
(65) 公表番号	特表2012-532851 (P2012-532851A)		I N N A T E P H A R M A P H A R M
(43) 公表日	平成24年12月20日 (2012. 12. 20)		A S. A.
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/059946		フランス、エフー１３００９マルセイユ、
(87) 国際公開番号	W02011/004028		アブニュ・ドゥ・リュミニエー１１７番
(87) 国際公開日	平成23年1月13日 (2011. 1. 13)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成25年6月26日 (2013. 6. 26)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	61/224, 548	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成21年7月10日 (2009. 7. 10)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100170520
			弁理士 笹倉 真奈美
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 T L R 3 結合剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト T L R 3 ポリペプチドに特異的に結合し、T L R 3 シグナル伝達を阻害するモノクローナル抗体であって、その二価結合親和性においてサブナノモル K_D で、酸性条件下で、前記 T L R 3 ポリペプチドに特異的に結合する、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

d s R N A T L R 3 リガンドと前記 T L R 3 ポリペプチドとの結合を遮断することなく、T L R 3 シグナル伝達を調節する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

樹状細胞内での T L R 3 シグナル伝達を調節する、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

前記酸性条件は、4. 5 ~ 6. 5 の間の p H を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

二価結合親和性においてサブナノモル K_D で、中性条件下で、T L R 3 ポリペプチドに特異的に結合する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

前記中性条件は、6. 6 ~ 7. 4 の p H を含む、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

T L R 3 ポリペプチドへの結合において、

20

(a) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号34および35を有する抗体(34A3)、

(b) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号10および11を有する抗体(29H3)、

(c) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号18および19を有する抗体(28F11)、

(d) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号26および27を有する抗体(23C8)、および

(e) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号2および3を有する抗体(31C3)

10

からなる群から選択される抗体と競合する、請求項1記載の抗体。

【請求項8】

(a) (i) 配列番号4、5および6でそれぞれ示される重鎖CDR1、2および3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)アミノ酸配列と、(ii) 配列番号7、8および9でそれぞれ示される軽鎖CDR1、2および3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)アミノ酸配列と、を有する抗体；

(b) (i) 配列番号12、13および14でそれぞれ示される重鎖CDR1、2および3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)アミノ酸配列と、(ii) 配列番号15、16および17でそれぞれ示される軽鎖CDR1、2および3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)アミノ酸配列と、を有する抗体；

20

(c) (i) 配列番号20、21および22でそれぞれ示される重鎖CDR1、2および3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)アミノ酸配列と、(ii) 配列番号23、24および25でそれぞれ示される軽鎖CDR1、2および3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)アミノ酸配列と、を有する抗体；

(d) (i) 配列番号28、29および30でそれぞれ示される重鎖CDR1、2および3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)アミノ酸配列と、(ii) 配列番号31、32および33でそれぞれ示される軽鎖CDR1、2および3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)アミノ酸配列と、を有する抗体；ならびに

(e) (i) 配列番号36、37および38でそれぞれ示される重鎖CDR1、2および3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)アミノ酸配列と、(ii) 配列番号39、40および41でそれぞれ示される軽鎖CDR1、2および3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)アミノ酸配列と、を有する抗体；

30

からなる群から選択される、請求項1～7のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項9】

マウス抗体である、請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項10】

キメラ、ヒトまたはヒト化抗体である、請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項11】

IgGアイソタイプである、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項12】

40

前記抗体の前記アイソタイプは、IgG4である、請求項11に記載の抗体。

【請求項13】

FcγRに実質的に結合しないFc領域を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項14】

Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、二重特異性抗体、一本鎖抗体断片、または複数の異なる抗体断片を含む多重特異性抗体から選択される抗体断片である、請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項15】

毒性部分にコンジュゲートされるかまたは共有結合される、請求項1～14のいずれか

50

一項に記載の抗体。

【請求項 1 6】

T L R 3 発現細胞による内在化能がある、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 7】

検出可能な部分にコンジュゲートされるかまたは共有結合される、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の抗体をキメラ化またはヒト化することによって得られる抗体。

【請求項 1 9】

請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の抗体を含む、キット。

【請求項 2 0】

請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の抗体を産生するハイブリドーマまたは組換え宿主細胞。

【請求項 2 1】

請求項 7 または 8 に記載の抗体を産生する、請求項 2 0 に記載の細胞。

【請求項 2 2】

抗体 3 1 C 3 または抗体 2 9 H 3 を産生し、ここに、抗体 3 1 C 3 はそれぞれ配列番号 2 および 3 の V H および V L 領域を有する抗体であり、抗体 2 9 H 3 はそれぞれ配列番号 1 0 および 1 1 の V H および V L 領域を有する抗体である、請求項 2 0 に記載の細胞。

【請求項 2 3】

哺乳類対象における T L R 3 ポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生する方法であって、a) 非ヒト哺乳動物を、ヒト T L R 3 ポリペプチドを含む免疫原で免疫するステップと、b) 前記免疫動物から、酸性および中性条件下で前記 T L R 3 ポリペプチドに高親和性に結合し、かつ T L R 3 シグナル伝達を調節する抗体を選択するステップと、を含む、方法。

【請求項 2 4】

選択された前記抗体は、中性条件の場合と比較して、酸性条件下で、T L R 3 ポリペプチドに対する結合親和性の実質的低下を全く有しない、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記抗体は、T L R 3 リガンドと T L R 3 ポリペプチドとの結合を遮断することなく、T L R 3 シグナル伝達を阻害するように選択される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

哺乳類対象における T L R 3 ポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生する方法であって、a) 非ヒト哺乳動物を、ヒト T L R 3 ポリペプチドを含む免疫原で免疫するステップと、b) 前記免疫動物から、T L R 3 リガンドと T L R 3 ポリペプチドとの結合を遮断することなく、T L R 3 シグナル伝達を阻害する抗体を選択するステップと、を含む、方法。

【請求項 2 7】

ステップ (b) において調製された前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 2 3 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

ヒト T L R 3 ポリペプチドに特異的に結合する前記抗体の能力が評価されるステップをさらに含む、請求項 2 3 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

ヒト T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 2 9 H 3 および／または 3 1 C 3 と競合する前記抗体の能力が評価されるステップをさらに含み、ここに、抗体 2 9 H 3 はそれぞれ配列番号 1 0 および 1 1 の V H および V L 領域を有する抗体であり、抗体 3 1 C 3 はそれぞれ配列番号 2 および 3 の V H および V L 領域を有する抗体である、請求項 2 3 ～

10

20

30

40

50

28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記選択されたモノクローナル抗体の断片または誘導体を作製するステップをさらに含む、請求項23～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

前記断片または誘導体は、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、二重特異性抗体、一本鎖抗体断片、複数の異なる抗体断片を含む多重特異性抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体からなる群から選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

請求項1～18のいずれか一項に記載の抗体、ならびに薬学的に許容できる担体を含む、医薬組成物。

10

【請求項33】

自己免疫、炎症、アレルギー、喘息、感染、肝硬変および敗血からなる群から選択される疾患を処置または予防するための、請求項32に記載の医薬組成物。

【請求項34】

前記疾患は、感染である、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項35】

前記疾患は、感染に関連した炎症である、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項36】

前記疾患は、肺炎症である、請求項33または35に記載の医薬組成物。

20

【請求項37】

前記疾患は、関節リウマチである、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項38】

前記疾患は、敗血である、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項39】

前記疾患は、肝硬変である、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項40】

前記疾患は、糖尿病である、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項41】

前記疾患は、骨粗鬆症である、請求項33に記載の医薬組成物。

30

【請求項42】

前記疾患は、関節リウマチを有する患者における骨粗鬆症である、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項43】

免疫調節剤、コルチコステロイド、免疫抑制剤、抗生物質、抗ウイルス剤および抗炎症剤からなる群から選択される適切な追加的な治療剤と組み合わせた、請求項33～42のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項44】

癌を処置または予防するための、請求項15または16のいずれか一項に記載の抗体を含む医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、TLR3に特異的に結合する、場合によってさらに、シグナル伝達を調節する、例えば阻害する、抗体（例えばモノクローナル抗体）、抗体断片、およびその誘導体に関する。本発明はまた、かかる抗体を産生する細胞、かかる抗体を作製する方法；抗体の断片、変異体、および誘導体；これらを含む医薬組成物；抗体を使用し、疾患、例えば自己免疫疾患、炎症性疾患などを診断、処置または予防する方法、に関する。

【背景技術】

【0002】

50

ショウジョウバエ (*Drosophila*) の *Toll* タンパク質は、背腹パターンを調節し、また古い宿主防御機構を示すと考えられている。ヒトにおいては、TLRは、先天性免疫の重要な成分であると考えられている。ヒトおよびショウジョウバエの *Toll* タンパク質配列は、タンパク質鎖の全長にわたって相同性を示す。ヒト *Toll* 様受容体のファミリーは、10の高度に保存された受容体タンパク質、TLR1～TLR10からなる。ショウジョウバエ *Toll* のように、ヒトTLRは、病原体関連分子パターン (PAMP) を認識するロイシンリッチリピート (LRR) ドメイン、およびヒトインターロイキン-1 (IL-1) 受容体の細胞質ドメインに対して相同な細胞質ドメインからなる細胞外ドメインを有するI型膜貫通タンパク質である。ショウジョウバエ *Toll* および IL-1 受容体の双方におけるシグナル伝達経路と同様、ヒト *Toll* 様受容体は、NF- κ B経路を通じてシグナル伝達する。

10

【0003】

様々な哺乳類のTLRが多数の特性およびシグナル形質導入機序を共有するが、それらの生物学的機能は非常に異なる。これは、部分的には、4つの異なるアダプター分子 (MyD88、TIRAP、TRIFおよびTRAF) がTLRとの様々な組み合わせにおいて関連し、かつ異なるシグナル伝達経路を媒介するという事実に起因する。さらに、1つのTLRに対する異なるリガンドは、異なるシグナル形質導入経路を優先的に活性化しうる。さらに、TLRは、様々な造血および非造血細胞内で異なる形で発現される。したがって、TLRリガンドに対する応答は、TLRによって活性化されるシグナル経路だけでなく、個別のTLRが発現される細胞の性質に依存する。

20

【0004】

Toll 様受容体3 (TLR3) は、TLR3シグナル伝達が炎症および自己免疫条件に関与している場合の治療標的として、多大な注目を受けている。親出願の (特許文献1) は、hTLR3タンパク質の核酸およびアミノ酸配列を提供している。 (非特許文献1) は、細胞表面TLR3に結合する抗TLR3抗体の使用について開示している。抗体C1130は、TLR3に対して活性化することが述べられており、また (特許文献2) 中に記載されている。TLR3を阻害するポリクローナル抗体については、 (非特許文献2) 中に記載された。 (特許文献3) および (非特許文献3) は、細胞区画TLR3ではなく細胞表面TLR3に結合しそれを阻害することが報告されており、または脊髄系DC内の抗体クローンTLR3.7 (eBioScience Inc. (San Diego)) に対応する抗体について記載している。 (特許文献4) は、細胞表面上でTLR3を発現することが報告されている上皮細胞内でのサイトカイン産生を阻害することが報告されている抗体C1068について記載している。C1068は、TLR3への結合において、抗体TLR3.7と競合することが述べられている ((特許文献5) を参照)。PCT特許出願の (特許文献5) は、抗TLR3抗体を提供する。かかる抗体は、dsRNAを遮断することが述べられており、またdsRNAのTLR3への結合を阻止することが提起されている。研究利用のための他の抗TLR3抗体は、R&D Systems Corp. 製のポリクローナル抗TLR3抗体、Abcam製の抗体40C1285および抗体619F7、713E4、716G10、IMG-5631およびIMG-5348 (全部がImgenex, Corp. 製) を含む。

30

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】 国際公開第98/50547号パンフレット

【特許文献2】 国際公開第2007/051164号パンフレット

【特許文献3】 国際公開第03/106499号パンフレット

【特許文献4】 国際公開第06/060513号パンフレット

【特許文献5】 国際公開第2010/051470号パンフレット

【非特許文献】

【0006】

50

【非特許文献1】LeBouteillerら、(2005年) J. Biol. Chem. 280(46):38133-38145頁

【非特許文献2】Cavassaniら、(2008年) J. Exp. Med. 205:2609-2621頁

【非特許文献3】Matsumotoら、(2003年) J. Immunol. 171:3154-3162頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかし、今日まで数種類の抗TLR3抗体が産生されている一方、これらの抗体は、一般にあくまで研究目的であって、治療用途は意図されていない。本明細書中でさらに説明されるように、本開示は、現在使用可能な抗TLR3抗体の中で、それらは、実験観察を行うための一部の研究設定において有用でありうる一方、例えばTLR3を調節するための治療剤としての用途に対して最適ではない。したがって、改善されたTLR3に特異的な抗体を提供するという需要がある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

一態様では、本発明は、ヒトTLR3に特異的に結合するモノクローナル抗体（限定はされないが、抗体断片および誘導体を含む）を含む新規の組成物、ならびにそれらを使用する方法を提供する。一態様では、抗体は、TLR3リガンドのTLR3ポリペプチドへの結合を遮断することなく、TLR3シグナル伝達を阻害する。一態様では、抗体は、ヒトTLR3に、酸性条件下、また特に細胞の酸性化細胞内区画（例えば、エンドサイトーシス経路エンドソーム（endosomal）、リソソーム区画）内で遭遇される場合に代表的な条件下で結合する。かかる酸性条件は、一般に、約pH6.5未満のpH、または約pH4.5～6.5の間、または約pH5.6によって特徴づけられる。

【0009】

本明細書中の実施形態のいずれかの一態様では、抗体は、細胞の酸性化細胞内区画（例えば、エンドサイトーシス経路エンドソーム、リソソーム区画）内で、TLR3シグナル伝達を調節し、場合によって阻害する。

【0010】

本明細書中の実施形態のいずれかの一態様では、抗体は、樹状細胞（DC）（例えば、脊髄DC、単球由来DC）内で、TLR3シグナル伝達を調節し、場合によって阻害する。

【0011】

本明細書中の実施形態のいずれかの一態様では、抗体は、場合により、ヒトTLR3への結合に対し、酸性条件下で、中性条件下より実質的に低い親和性を有しないものとして特徴づけることが可能であり、例えばこの場合、TLR3への結合における K_D は、0.2-、0.3-、-0.4、0.5-、1.0-、もしくは $1.5-\log_{10}$ を超えない程度に低下する。中性条件は、一般に、6.6～7.4の間のpH、例えば細胞質内で見出される7.2のややアルカリ性pHによって特徴づけられる。場合により、抗体は、ヒトTLR3への結合に対し、酸性条件下で、中性条件下とは実質的に異なる（より低いまたは高い）親和性を有することなく、例えばこの場合、TLR3への結合における K_D は、中性および酸性条件下（conditional）で、0.2-、0.3-、0.4-、0.5-、1.0-、もしくは $1.5-\log_{10}$ を超えない程度に異なる。

【0012】

本明細書中の実施形態のいずれかの他の態様では、酸性条件下での、抗体のTLR3に対する二価結合親和性は、場合により、約100、50、10、5、もしくは1ナノモルを超えない（すなわち親和性が向上した）、好ましくはサブナノモルまたは場合によって約300、200、100もしくは10ピコモルを超えない平均 K_D によって特徴づけられうる。

【0013】

本明細書中の実施形態のいずれかの他の態様では、本抗体は、TLR3リガンドのTLR3ポリペプチドへの結合を遮断することなく、TLR3シグナル伝達を阻害する。TLR3リガンドは、一般に、抗TLR3抗体以外のリガンドとなり、また、天然または非天然TLR3リガンド、場合により、ポリAU（ポリアデニル酸：ポリウリジル酸）またはポリIC（ポリイノシン酸：ポリシチジル酸）などのdsRNAに基づくリガンドであってもよい。特に、発明者らは、本発明に従う抗体が、dsRNAなどのTLR3リガンドがTLR3ポリペプチドに既に結合されている場合であっても、TLR3シグナル伝達を阻害可能であることを確立している。本発明に従う抗体はまた、予備活性化された（pre-activated）条件下、例えばIFN α の存在下であっても、TLR3シグナル伝達を阻害可能である。本発明に従う抗体は、確立された自己免疫疾患、例えば、異常細胞内に、dsRNAなどの天然TLR3リガンド、および／または、IFN α 、特に高レベルのIFN α の存在を有する患者を処置するのに有効であると考えられる。本抗体はまた、TLR3リガンド結合部位がdsRNA分子によって占有され、潜在的にはより広範な全体的結合が可能になる場合であっても、TLR3に結合する利点を有することになる。

10

【0014】

本開示は、酸性条件下でヒトTLR3に結合する抗体が、TLR3を、単独にまたは主に細胞質区画内で、また主にエンドサイトーシス経路の区画（例えばエンドソーム）内で発現する細胞（脊髄樹状細胞（M $\ddot{u}$ DC）；単球由来DC（MoDC））内でのTLR3シグナル伝達を調節する、特に阻害する強力な能力を有することを示す。本抗体は、dsRNAへの結合に関与しないTLR3中の領域に結合し、かつ本抗体は、酸性条件下でdsRNAがTLR3に結合することを阻止しない。本組成物および方法は、多くの用途にとって有用であり、特に、細胞質（例えばエンドサイトーシス経路区画に局在化された）TLR3が標的化される場合に、TLR3シグナル伝達を（例えばインビボで）調節することに適している。細胞質TLR3シグナル伝達を調節することは、酸性細胞質区画（例えばエンドソーム）内でTLR3を発現するDCまたは他の細胞内でのTLR3シグナル伝達の調節が有益である場合の疾患を処置または予防するのに有用でありうる。例えば、DCの、アポトーシスまたは壊死細胞に由来する抗原（急性炎症の間での組織壊死過程を含む）を取り込む能力については十分に文書化されていることから（Albertら（2004年）Nat. Rev. Immunol. 4: 223-231頁）、DC内でのTLR3シグナル伝達の阻害（例えば、DCによるサイトカイン産生の阻害によって認められる）は、炎症または自己免疫疾患の処置または予防において用いられうる（Cavassaniら、（2008年））。場合により、本抗体は、TLR3シグナル伝達を阻害し、例えば、TLR3リガンドによるTLR3受容体の刺激によって誘発されるサイトカイン産生（例えばIP10）を阻害する。

20

30

【0015】

エンドソームおよびリソソームは、細胞内部の膜結合区画であり、エンドサイトーシス経路の一部を形成し、また通常はエンドソーム膜のプロトンポンピングATPアーゼの作用に起因して酸性である。原位置でのリソソーム（lysosomal）pHの最初の測定値は、マクロファージ内で4.7～4.8のpHであることが判明し、受容体依存性エンドサイトーシスに関与する線維芽細胞エンドソームのpHは、約5.5であることが判定された。TLR3の初期試験によると、それは単球由来DC内の細胞質内で発現されており、またそれはおそらくはエンドサイトーシス経路の細胞内区画内でそのリガンドに結合することが同定された（Matsumotoら、（2003年）J. Immunol. 171: 3154-3162頁）。その後、TLR3は、樹状細胞、星状細胞、マクロファージ、T細胞、上皮細胞、線維芽細胞および肝細胞内の細胞のエンドソーム区画内で発現されることが報告されているが、TLR3はまた、細胞表面上、特に上皮細胞上、また炎症の一部の症例ではマクロファージ上で見出されている（Cavassaniら、2008年、上記）。エンドソーム酸性化の阻害剤であるクロロキンによる処理により、DC内でのTLR3シグナル伝達が阻害されることから、エンドソーム酸性化は、TLR3シ

40

50

グナル伝達における役割を有することが示されている。酸性化エンドソーム区画に対応する酸性条件下（例えば約5.6または約6.5未満のpH）でTLR3に結合する、本明細書で提供される抗体は、酸性条件下でその親和性を失う抗体に対し、エンドソーム区画内でのTLR3への効率的な高親和性結合、また場合によってそのさらなる調節を可能にする利点を有し、したがって細胞表面TLR3に対してそのさらなる効果を発揮しうる。例示される抗体は、主にサイトソーム（cytosomal）区画内でTLR3を発現することが知られているDC内のTLR3に対して強力な阻害活性を有する。

【0016】

一実施形態では、本発明は、ヒトTLR3に特異的に結合し、かつTLR3シグナル伝達を阻害する、例えば、TLR3のリガンド（例えば、TLR3の天然もしくは合成リガンド、核酸に基づくリガンド、dsRNA、ウイルスdsRNA、ポリIC、ポリAU）のTLR3ポリペプチドへの結合を遮断することのない、TLR3リガンドによるTLR3受容体の刺激によって誘発されるサイトカイン産生を阻害する、モノクローナル抗体を提供する。TLR3ポリペプチドがかかる抗体によって結合される場合、dsRNAは、TLR3ポリペプチドにさらに結合し、残存する非抗体結合TLR3および／または他のdsRNA受容体（すなわちRIG-I、MDA-5、TLR7など）への結合に利用可能なdsRNAが減少する可能性があり、それにより、毒性の増大、不適切なシグナル伝達カスケード活性化などの望ましくない副作用、およびdsRNAが原因となってシグナル伝達が誘発されてもたらされる症状、例えば慢性炎症が、低減される可能性がある。かかる抗体組成物および方法は、多くの用途、特にTLR3シグナル伝達に関連した疾患を処置または予防するのに有用であり、またその作用機序を考慮すると、本発明の抗体は、TLR3ポリペプチドをアネルギー化（anergizing）または阻害するのに使用可能である。場合により、本抗体は、TLR3の二本鎖RNAリガンドのTLR3ポリペプチドへの結合を検出可能な程度にまで低下させないものとして特徴づけることが可能である。本抗体はまた、酸性条件下で、例えば酸性化エンドソーム区画内で遭遇される場合に代表的な条件下で、ヒトTLR3に高親和性で結合可能であってもよく、そうでなくてもよい。一実施形態では、TLR3によってシグナル伝達を阻害しうる抗体が探求される場合、TLR3に特異的に結合し、またTLR3の二本鎖RNAリガンドのTLR3ポリペプチドへの結合を遮断することなくTLR3シグナル伝達を阻害する抗体が、さらに、本明細書中に記載の酸性条件下、また特に細胞の酸性化エンドソーム区画内で遭遇される場合に代表的な条件下で、ヒトTLR3に結合しかつそれを阻害する能力がありうることは有利となる。

【0017】

本発明の実施形態のいずれかの一態様では、抗体は、場合によって酸性および／または中性条件下で、TLR3ポリペプチドへの結合において、モノクローナル抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3の任意の1つまたは任意の組み合わせと競合する。一実施形態では、本発明の抗体は、場合によって酸性および／または中性条件下で、TLR3ポリペプチドへの結合において、

(a) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号2および3を有する抗体（31C3）、

(b) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号10および11を有する抗体（29H3）、

(c) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号18および19を有する抗体（28F11）、

(d) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号26および27を有する抗体（23C8）、および

(e) VHおよびVL領域としてそれぞれ配列番号34および35を有する抗体（34A3）

からなる群から選択される抗体と競合する。

【0018】

一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 3 1 C 3 および 2 9 H 3 と競合し、一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 3 1 C 3 および 2 3 C 8 と競合し、一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 3 1 C 3 および 2 8 F 1 1 と競合し、一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 3 1 C 3 および 3 4 A 3 と競合する。一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 2 9 H 3 および 2 3 C 8 と競合し、一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 2 9 H 3 および 2 8 F 1 1 と競合し、一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 2 9 H 3 および 3 4 A 3 と競合する。一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 2 3 C 8 および 2 8 F 1 1 と競合し、一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 2 3 C 8 および 3 4 A 3 と競合する。一実施形態では、本抗体は、T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体 2 8 F 1 1 および 3 4 A 3 と競合する。

10

【0019】

一実施形態では、本発明の抗体は、

(a) 配列番号 6 1、6 4 および 6 5 から選択される軽鎖 C D R 1 (L C D R 1) アミノ酸配列；

(b) 配列番号 6 2、6 6 および 6 7 から選択される軽鎖 C D R 2 (L C D R 2) アミノ酸配列；および／または

(c) 配列番号 6 3、6 8、6 9 および 7 0 から選択される軽鎖 C D R 3 (L C D R 3) アミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

【0020】

一実施形態では、本発明の抗体は、

(a) 配列番号 7 1～7 6 から選択される重鎖 C D R 1 (H C D R 1) アミノ酸配列；

(b) 配列番号 7 7～8 1 から選択される重鎖 C D R 2 (H C D R 2) アミノ酸配列；および／または

(c) 配列番号 8 2～8 5 から選択される重鎖 C D R 3 (H C D R 3) アミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0021】

30

一実施形態では、本発明の抗体は、

(a) (i) 配列番号 4、5 および 6 でそれぞれ示される重鎖 C D R 1、2 および 3 (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) アミノ酸配列と、(i i) 配列番号 7、8 および 9 でそれぞれ示される軽鎖 C D R 1、2 および 3 (L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3) アミノ酸配列と、を有する抗体；

(b) (i) 配列番号 1 2、1 3 および 1 4 でそれぞれ示される重鎖 C D R 1、2 および 3 (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) アミノ酸配列と、(i i) 配列番号 1 5、1 6 および 1 7 でそれぞれ示される軽鎖 C D R 1、2 および 3 (L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3) アミノ酸配列と、を有する抗体；

(c) (i) 配列番号 2 0、2 1 および 2 2 でそれぞれ示される重鎖 C D R 1、2 および 3 (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) アミノ酸配列と、(i i) 配列番号 2 3、2 4 および 2 5 でそれぞれ示される軽鎖 C D R 1、2 および 3 (L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3) アミノ酸配列と、を有する抗体；

40

(d) (i) 配列番号 2 8、2 9 および 3 0 でそれぞれ示される重鎖 C D R 1、2 および 3 (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) アミノ酸配列と、(i i) 配列番号 3 1、3 2 および 3 3 でそれぞれ示される軽鎖 C D R 1、2 および 3 (L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3) アミノ酸配列と、を有する抗体；ならびに

(e) (i) 配列番号 3 6、3 7 および 3 8 でそれぞれ示される重鎖 C D R 1、2 および 3 (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) アミノ酸配列と、(i i) 配列番号 3 9、4 0 および 4 1 でそれぞれ示される軽鎖 C D R 1、2 および 3 (L C D R 1、L C D R 2

50

、LCDR3) アミノ酸配列と、を有する抗体；
からなる群から選択され、場合により、ここで前記配列のいずれかにおけるアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くが、異なるアミノ酸によって置換されうる。

【0022】

本発明の一実施形態では、本抗体は、モノクローナル抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3の任意の1つまたは任意の組み合わせに相当するTLR3エピトープに結合する。別の実施形態では、本抗体は、抗体31C3の抗原結合領域を含む。別の実施形態では、本抗体は、抗体29H3の抗原結合領域を含む。別の実施形態では、本抗体は、抗体23C8の抗原結合領域を含む。別の実施形態では、本抗体は、抗体28F11の抗原結合領域を含む。別の実施形態では、本抗体は、抗体34A3の抗原結合領域を含む。別の実施形態では、本抗体は、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3軽鎖可変領域配列の1つ、2つもしくは全部で3つのCDRを含む軽鎖、および／または、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3重鎖可変領域配列の1つ、2つもしくは全部で3つのCDRを含む重鎖を含む。別の実施形態では、本抗体は、場合によってヒトFc領域に融合された、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3またはその断片もしくは誘導体である。抗体29H3・7および31C3・1は、2009年7月3日に、Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) (Institut Pasteur, 25 rue de Docteur Roux, F-75724 Paris) に、それぞれCNCMI-4187およびCNCMI-4186の番号の下、寄託されている。抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3の抗原結合領域はまた、配列番号2～41で開示されている。

10

20

【0023】

本発明の一態様では、本発明に従う1つの抗体の軽鎖は、V遺伝子におけるVK19-14、VK aq4、VK12-41およびVK12-44、ならびにJ遺伝子におけるJK2から選択される、VL遺伝子再構成に由来する核酸配列から得られるかまたはそれによってコードされる。

【0024】

本発明の一態様では、本発明に従う1つの抗体の重鎖は、V遺伝子におけるVH36-60.a1.85、VHL558.1およびVHJ558.2、ならびにJ遺伝子におけるJH4またはJH2から選択される、VL遺伝子再構成に由来する核酸配列から得られるかまたはそれによってコードされる。

30

【0025】

本発明の別の態様では、本抗体は、配列番号4～9、12～17、20～25、28～33、36～41からなる群から選択される配列の1つ以上のCDRを有し、ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されうる。

【0026】

別の態様では、本発明は、TLR3に特異的に結合する抗体を提供し、ここで本抗体は、次の特性の1つ以上を有する。

40

- 酸性pH、例えば約6.5未満のpHまたは約4.5～6.5の間または約pH5.6で、TLR3ポリペプチドに対してサブナノモル親和性を有するか；または
- TLR3リガンドの存在下でTLR3シグナル伝達を阻害することが可能であるか；または
- 炎症性バックグラウンド下、例えばIFN α などの炎症性サイトカインの存在下でTLR3シグナル伝達を阻害することが可能であるか；または
- TLR3ポリペプチドへの結合において、31C3、29H3、28F11、23C8または34A3と競合するか；
- TLR3ポリペプチドへの結合において、dsRNAと競合しない

【0027】

50

一実施形態では、本抗体は、上掲の特性、すなわち、(a) および (b) ; (a)、(b) および (c) ; (a)、(b)、(c) および (d) ; または (a)、(b)、(c)、(d) および (e) を有する。一実施形態では、本抗体は、特性 (a) および (c) ; (a)、(c) および (d) ; または (a)、(c)、(d) および (e) を有する。一実施形態では、本抗体は、特性 (a) および (d) ; (a) および (e) ; または (a)、(d) および (e) を有する。一実施形態では、本抗体は、特性 (b) および (c) ; (b)、(c) および (d) ; または (b)、(c)、(d) および (e) を有する。一実施形態では、本抗体は、特性 (b) および (d) ; (b) および (e) ; または (b)、(d) および (e) を有する。一実施形態では、本抗体は、特性 (c) および (d) ; (c) および (e) ; または (c)、(d) および (e) を有する。一実施形態では、本抗体は、特性 (d) および (e) を有する。別の実施形態では、本抗体は、本明細書中に記載の抗 T L R 3 抗体の特性のいずれかをさらに有する。

10

【0028】

別の実施形態では、本明細書中の実施形態のいずれかの抗体は、T L R 3 ポリペプチドを表面上に発現する細胞によって内在化されうる。

【0029】

本発明の任意の態様の一実施形態では、配列番号で列挙されるアミノ酸配列は、1つ、2つ、3つもしくはそれより多くのアミノ酸置換を含む。別の実施形態では、本発明の任意の実施形態において、実施形態は、特定の配列番号のアミノ酸配列と少なくとも95%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有しうるアミノ酸配列を包含しうる。

20

【0030】

別の実施形態では、本発明は、31C3、29H3、28F11、23C8および34A3からなる群から選択される抗体と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗 T L R 3 抗体を提供する。

【0031】

一実施形態では、本抗体は、キメラであり、例えば非マウス、場合によってヒト定常領域を有する。一実施形態では、本抗体は、ヒトまたはヒト化である。別の実施形態では、本抗体は、マウス抗体である。別の実施形態では、本抗体は、他のヒト T L R (例えば T L R 4) に実質的に結合しない。

【0032】

本発明の実施形態のいずれかの一態様では、本抗体のアイソタイプは、I g G、場合によって I g G 1 または I g G 3 である。一実施形態では、本抗体は、F c ドメインを含むかまたは F c γ R によって結合されたアイソタイプである。

30

【0033】

本発明の実施形態のいずれかの一態様では、本抗体は、F a b、F a b'、F a b'-S H、F (a b')₂、F v、二重特異性抗体、一本鎖抗体断片、または複数の異なる抗体断片を含む多重特異性抗体から選択される抗体断片である。本発明の実施形態のいずれかの一態様では、本抗体は、F c ドメインを含まないか、または F c γ R によって実質的に結合されないアイソタイプである。一実施形態では、本抗体は、I g G 4 または I g G 2 アイソタイプである。実施例において示されるように、本発明の抗体の F (a b')₂ 断片は、D C 内での T L R 3 シグナル伝達に対するその調節能を保持し、それ故、それに F c ドメインが不在であるにもかかわらず、D C によって取り込まれた。かつては一般に、抗体は、少なくとも部分的に F c 受容体介在性取り込みにより、D C 内のエンドソーム経路に入ることになると考えられてきた (ヒト D C は、タイプ I (F c γ R I、C D 6 4) およびタイプ I I (F c γ R I I、C D 3 2) を含む数種の F c γ 受容体 (F c γ R) を発現する)。F c γ R に結合しないアイソタイプおよびフォーマットが、D C 内の T L R 3 を調節可能であるという実験結果により、T L R 3 発現細胞の (例えば F c γ R 介在性抗体に依存する細胞の細胞毒性を介する) 望ましくない欠損を誘発するリスクを伴うことなく、所望される特性を保持する抗体の開発が可能になる。例えば、F c γ R 結合を低下させるように修飾された I g G 4 アイソタイプまたは他の I g G アイソタイプは、血清

40

50

半減期などのそれらの有利な薬理学的特性故に使用可能である一方、例えばDC内で細胞死を誘発することなく、TLR3シグナル伝達を調節しうる。本発明の実施形態のいずれかの一態様では、抗TLR3抗体は、TLR3シグナル伝達を阻害し、またIgG4もしくはIgG2アイソタイプの定常領域を含む。本発明の実施形態のいずれかの一態様では、抗TLR3抗体は、TLR3シグナル伝達を阻害し、またFcγRに実質的に結合しない定常領域を含む。

【0034】

別の実施形態では、本抗体は、検出可能または有毒な部分にコンジュゲートされる (conjugated) かまたは共有結合される。

【0035】

別の態様では、本発明は、本発明の抗TLR3抗体を産生する細胞、例えばハイブリドーマまたは組換え宿主細胞を提供する。一実施形態では、本細胞は、クローン31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3である。関連する態様では、本発明は、a) 31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3抗体によって特異的に認識されるTLR3エピトープを含む抗原で免疫されている非ヒト哺乳類宿主に由来するB細胞を含むハイブリドーマを提供し、それはb) 不死化細胞に融合され、ここでハイブリドーマは、エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する。これらの態様の一実施形態では、モノクローナル抗体は、抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3に相当するエピトープに結合する。場合により、本細胞は、抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3の抗原結合領域を有する抗体を産生する。

【0036】

別の態様では、本発明は、抗体を試験する方法であって、

a) 場合によってTLR3リガンド (例えばdsRNA) のTLR3ポリペプチドへの結合を遮断することなく、TLR3シグナル伝達を阻害し、および／または

b) TLR3ポリペプチドへの結合において、抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と競合し、および／または

c) 酸性条件下、また特に細胞の酸性化細胞内区画内で遭遇される場合に代表的な条件下、例えば約pH 5.6、約pH 4.5～約6.5の間で、ヒトTLR3に結合する、(ここで場合により、酸性条件下でのTLR3に対する親和性は、中性条件下での結合に対し、実質的に異ならない、例えば低下しない)

可否かを判定するための抗体を試験するステップを含む方法を提供する。

【0037】

場合により、本方法は、サブステップ(a)および(b)、サブステップ(a)および(c)、サブステップ(b)および(c)またはサブステップ(a)、(b)および(c)に従って抗体を試験するステップを含む。

【0038】

場合により、本方法は、抗体を、それがTLR3シグナル伝達を阻害することが判定される場合、それがTLR3ポリペプチドへの結合において抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と競合することが判定される場合、ならびに／あるいは、酸性条件下および／または中性条件と比べて親和性の低下を伴わない場合にそれがヒトTLR3に結合することが判定される場合、選択するステップをさらに含む。場合により、本抗体は、それが樹状細胞内でのTLR3シグナル伝達を調節する、例えば阻害する能力についてさらに試験され、また抗体がDC内でのTLR3シグナル伝達を調節することが判定される場合、選択される。場合により、そのように選択された抗体は、疾患の処置または予防における使用のために選択される (例えば、TLR3シグナル伝達を阻害する抗体は、炎症および自己免疫疾患において使用されることになる)。場合により、そのように選択された多量の抗体が産生される (例えば組換え宿主細胞内で)。

【0039】

別の態様では、本発明は、哺乳類対象、特にヒト対象においてTLR3に特異的に結合

する抗体を産生する方法であって、（例えば、非ヒト哺乳動物を、T L R 3 ポリペプチドを含む免疫原で免疫することにより）複数の抗体を産生するステップと；前記複数から、

a) T L R 3 シグナル伝達を、場合により、T L R 3 リガンド（例えばd s R N A）のT L R 3 ポリペプチドへの結合を遮断することなく阻害し、および／または

b) T L R 3 ポリペプチドへの結合において、抗体3 1 C 3、2 9 H 3、2 3 C 8、2 8 F 1 1もしくは3 4 A 3と競合し、および／または

c) ヒトT L R 3に、酸性条件下、また特に細胞の酸性化細胞内区画内で遭遇される場合に代表的な条件下、例えば約p H 5. 6、約p H 4. 5～約6. 5の間で結合する（ここで場合により、酸性条件下でのT L R 3に対する親和性は、中性条件下での結合と比べて実質的に異ならない、例えば低下しない）、

抗体を選択するステップと、を含む方法を提供する。

10

【0040】

場合により、本方法は、サブステップ（a）および（b）、サブステップ（a）および（c）、サブステップ（b）および（c）、またはサブステップ（a）、（b）および（c）に従い、抗体を選択するステップを含む。場合により、本方法は、樹状細胞内でのT L R 3 シグナル伝達を調節する、例えば阻害する能力を有する抗体を選択する（抗体がD C内でのT L R 3 シグナル伝達を調節することが判定される場合に選択される）ステップをさらに含む。

【0041】

別の態様では、本発明は、抗体を試験する方法であって、a) 試験抗体を提供するステップと、b) 前記試験抗体が、細胞の表面でのT L R 3の発現における低下を誘発するか否かを評価するステップと、c) 前記抗体が、細胞の表面でのT L R 3の発現における低下を誘発しない場合、前記試験抗体を、疾患（例えば本明細書で開示される疾患のいずれか）の処置における候補として選択するステップと、を含む方法を提供する。

20

【0042】

別の態様では、本発明は、抗体を試験する方法であって、a) 試験抗体を提供するステップと、b) 前記試験抗体の結合親和性を、酸性条件下、例えば5. 6のp Hで評価するステップと、c) 前記抗体が酸性条件下で結合親和性を有する場合（例えば、サブナノモル親和性、中性条件の場合に対して親和性の実質的低下がないなど）、前記試験抗体を疾患の処置における候補として選択するステップと、を含む方法を提供する。

30

【0043】

別の態様では、本発明は、抗体を試験する方法であって、a) 試験抗体を提供するステップと、b) 前記試験抗体が、T L R 3 リガンド、例えばd s R N Aの存在下で、T L R 3 タンパク質に結合できるか否かを評価するステップと、c) 前記抗体がT L R 3 リガンドの存在下でT L R 3 タンパク質に結合できる場合、前記試験抗体を疾患の処置における候補として選択するステップと、を含む方法を提供する。

【0044】

別の態様では、本発明は、抗体を選択する方法であって、a) 試験抗体を提供するステップと、b) 前記試験抗体が、炎症性サイトカイン、すなわちI F N α の存在下で、T L R 3 タンパク質に結合できるか否かを評価するステップと、c) 前記試験抗体を疾患の処置における候補として選択するステップと、を含む方法を提供する。

40

【0045】

別の態様では、本発明は、抗体を試験する方法であって、a) 試験抗体を提供するステップと、b) 前記試験抗体が、例えばT L R 3 発現細胞により、内在化されうるか否かを評価するステップと、c) 前記抗体が内在化されうる（好ましくは、ここで抗体は、迅速に、例えば2時間以内に内在化される）場合、前記試験抗体を疾患の処置における候補として選択するステップと、を含む方法を提供する。一実施形態では、疾患は、炎症性疾患である。一実施形態では、疾患は、癌である。

【0046】

一実施形態では、調製される抗体は、モノクローナル抗体である。別の実施形態では、

50

本方法は、前記抗体がヒト T L R 3 ポリペプチドに特異的に結合する能力が評価されるステップをさらに含む。一実施形態では、抗体が他の T L R ファミリーメンバに結合する能力が評価される。別の実施形態では、本方法は、選択されるモノクローナル抗体の断片または誘導体を作製するステップをさらに含む。一実施形態では、断片または誘導体は、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b') 2、F v、二重特異性抗体、一本鎖抗体断片、多重特異性抗体（複数の異なる抗体断片、ヒト化抗体、およびキメラ抗体を含む）からなる群から選択される。別の実施形態では、非ヒト哺乳動物は、マウスである。

【0047】

別の態様では、本発明は、患者における疾患を処置または予防する方法であって、本発明の T L R 3 抗体を患者に投与するステップを含む方法を提供する。別の実施形態では、本方法は、患者に適切な追加的な治療剤を投与するステップをさらに含み、例えば特に T L R 3 抗体が T L R 3 シグナル伝達を阻害する場合、追加的な作用剤は、免疫調節剤、コルチコステロイド、免疫抑制剤、抗生物質、抗炎症剤などからなる群から選択してもよい。特に、T L R 3 発現細胞（例えば癌細胞）を除去するため、T L R 3 抗体が、T L R 3 発現細胞によって内在化され、および／または毒素もしくは細胞毒性薬に結合される場合、追加的な作用剤は、抗癌剤、細胞毒性剤などからなる群から選択してもよい。一態様では、本発明は、自己免疫、炎症、アレルギー、喘息、感染、骨粗鬆症、肝硬変および敗血、癌または本明細書で検討される他の疾患から選択される疾患を処置または予防するための方法であって、治療有効量の阻害性 T L R 3 抗体を、それを必要とする患者に投与するステップを含む方法を提供する。本抗体は、前記疾患を処置または予防するのに十分な時間投与される。

【0048】

一実施形態では、本発明の抗体は、診断アッセイ、またはより一般的には、インビトロで T L R 3 ポリペプチドを検出するための任意のアッセイにおいて使用してもよい。一態様では、本発明は、（例えば生物学的試料中の）T L R 3 ポリペプチドを検出するインビトロでの方法であって、T L R 3 ポリペプチド（例えば、T L R 3 ポリペプチドを発現する細胞、精製 T L R 3 ポリペプチド、生物学的試料など）を本発明のモノクローナル抗体と接触状態にするステップと、抗体と T L R 3 ポリペプチドとの結合を検出するステップと、を含む方法を提供する。

【0049】

本発明のこれらのおよびさらなる有利な態様および特徴は、本明細書中の他の箇所で、さらに説明されうる。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】脊髄 DC 上での T L R 3 活性化マーカーの阻害を示す。図 1 A：C D 8 6 発現のレベル、図 1 B：I L - 6 分泌、図 1 C：I P - 1 0 分泌。すべての図面は、抗体 3 1 C 3 が、対照と比較して、T L R 3 リガンド誘発性応答を阻害することを示す。

【図2】Md DC 上での T L R 3 活性化マーカーの阻害を示す。図 2 A：C D 8 6 発現のレベル、図 2 B：I P - 1 0 分泌。すべての図面は、抗体 2 9 H 3 が、対照と比較して、T L R 3 リガンド誘発性応答を阻害することを示す。

【図3】抗体 3 1 C 3 の F (a b) ' 2 断片を精製全 3 1 C 3 抗体（「P u r」によって示される）と比較した、脊髄 DC 上での T L R 3 活性化マーカーの阻害を示す。図 3 A：C D 8 6 発現のレベル、図 3 B：I P - 1 0 分泌。図面は、抗体 3 1 C 3 の F (a b) ' 2 断片が、精製全 3 1 C 3 抗体と同様、T L R 3 リガンド誘発性応答を阻害することを示す。

【図4】抗体 2 9 H 3 の F (a b) ' 2 断片を精製全 2 9 H 3 抗体（「P u r」によって示される）と比較した、Md DC 上での T L R 3 活性化マーカーの阻害を示す。図 4 A：C D 8 6 発現のレベル、図 4 B：I P - 1 0 分泌。図面は、抗体 2 9 H 3 の F (a b) ' 2 断片が、精製全 2 9 H 3 抗体と同様、T L R 3 リガンド誘発性応答を阻害することを示す。

【図5】本発明に従う抗体が、TLR3チップと比較して、市販の抗体より強い結合性を有する場合の結合親和性の比較を示す。

【図6】TLR3受容体に対するリガンドであるポリAUの存在下または不在下での、TLR3チップに対する本発明に従う抗体の結合性を示す。図面は、本発明の抗体の結合が、dsRNAのTLR3 dsRNA固定部位への結合を遮断しないことを示す。

【図7】TLR3チップ上での29H3の存在が31C3の結合を遮断し、またその逆もいえることを示す。これらの結果は、両抗体が、重複するかまたは高度に類似したエピトープに対して競合することを示す傾向がある。

【図8】コンピュータモデリングによって生成される、ヒトTLR3タンパク質の細胞外ドメインの分子表面マップを示す。

【図9】ルシフェラーゼに基づくレポーター遺伝子活性（293T-TLR3-ISRE）におけるTLR3シグナル伝達の阻害についてのアッセイの結果を示し、この場合、ルシフェラーゼにおける倍数増加がポリAU用量の関数として示される。要するに、抗TLR3抗体31C3の存在下でのレポーターアッセイにおいて、dsRNA TLR3アゴニストを使用し、TLR3シグナル伝達が誘発され、またTLR3シグナル伝達が評価された。抗体31C3は、TLR3阻害活性を全く有しない対照抗TLR3抗体と比較して、TLR3シグナル伝達を用量依存性に強力に阻害した。

【図10】図10Aは、対照（Abなし：白点）と比較した、本発明に従う市販のTLR3.7抗体（黒点）、28F11（白三角）、23C8（白四角）および31C3（黒四角）抗体での、293T-TLR3ルシフェラーゼアッセイを用いる、TLR3シグナル伝達の用量依存性阻害を示す。図10Bは、31C3（黒四角）、23C8および34A3（黒三角）抗体と比較するアッセイにおける同じ結果を示す。

【図11】抗体なし（黒点）と比較した、異なる条件下での31C3（白四角）または23C8（塗りつぶした黒四角）抗TLR3抗体の効果を示す。IP-10分泌は縦軸のng/mlで示され、添加されるdsRNAの用量は横軸のμg/mlで示される。図11Aは、標準条件（予備活性化なし）下でのTLR3シグナル伝達の阻害を示す。図11Bは、ポリAU予備刺激下でのTLR3シグナル伝達の阻害を示す。図11Cは、IFNα予備刺激下でのTLR3シグナル伝達の阻害を示す。

【図12】動力学アッセイの結果を示す。図12Aは、31C3抗体における（ポリAU用量に依存する）ng/mlでのIP-10分泌を示し、図12Bは、23C8抗体における結果を示す。TLR3 mAbは、dsRNAに対して、1時間30分前（黒×印）、同時（黒プラス「+」）、または1時間30分後（白四角）のいずれかに培地に添加され、dsRNA単独（黒点）は、陽性対照として提供される。

【図13】インビトロでの、TLR3発現細胞内での31C3 mAbによるヒトTLR3の特異的認識を示す。31C1 mAbでの細胞内FACS染色におけるヒストグラム特性は、HEK293T対照細胞およびヒトTLR3が形質移入された293T細胞について示される。未染色物は、対照アイソタイプIgG1の場合に得られる蛍光強度範囲を示す。

【図14】脊髄DC上でのTLR3誘発性活性化マーカーおよびサイトカイン分泌の阻害を示す。図14A：IP-10分泌、図14B：CD86発現のレベル。すべての図面は、抗体31C3（黒点）、28F11（黒三角）および23C8（黒四角）（ここでは50μg/mlの用量で示される）が、対照と比較して、TLR3リガンド誘発性応答を阻害することを示す。

【図15】図15Aおよび図15Bは、本発明に従う抗体の結合親和性を示す。図15Aは、本発明に従う抗体が、TLR3チップに対し、市販の（すなわちTLR3.7）抗体より強い結合性を有することを示す。図15Bは、TLR3チップが31C3抗体で予め飽和されている場合での、前記チップに対する本発明に従う抗体の結合性を示す。図15Aおよび15Bに示される結合レベルの比較により、チップが31C3抗体で予め飽和されている場合、本発明に従う抗体がhTLR3に対して低下した結合性を有するのに対し、市販のTLR3.7抗体が31C3抗体の存在下または不在下で同じ結合レベルを保持

10

20

30

40

50

することが明示される。

【図16】図16Aおよび図16Bは、TLR3受容体に対するリガンドであるポリAUの存在下または不在下での、TLR3チップに対する本発明に従う28F11、34A3および23C8抗体の結合性を示す。図面は、本発明の抗体の結合が、dsRNAのTLR3 dsRNA固定部位への結合を遮断しないことを示す。

【図17】34A3抗体の、rhTLR3（太線）単独または31C3で飽和されたチップ（点線）に対する結合性を示す。図面は、2つの抗体が、hTLR3への結合において、31C3と競合することを示す。

【図18】本発明に従う抗体のCDRの系統樹を示す。図18Aは、軽鎖CDRにおける系統樹を示し、図18Bは、重鎖CDRにおける系統樹を示す。図面は、抗体28F11（28.2）、31C3（31）および23C8（23）の間に高いCDR相同性があり、かつ、23H3（29）および34A3（34）がアミノ酸配列内により多くの差異を有することを示す。

【図19】図19AおよびBは、34A3抗体による脊髄DC上のTLR3活性化マーカーの阻害を示す。図19A：IP-10分泌、図19B：IL-6分泌。すべての図面は、抗体34A3（黒三角）が、対照（Abなし—白点）および31C3（黒四角、陽性対照）と比較して、TLR3リガンド誘発性応答を阻害することを示す。

【図20】実施例8に記載される内在化アッセイのFACS分析を示す。図20Aは、抗体結合TLR3タンパク質の不在下での293T-ISR/TLR3細胞の標準蛍光を示す陰性対照を示す。図20Bは、293T-ISR/TLR3細胞系におけるTLR3発現のレベルを示す陽性対照である。図20CおよびDはそれぞれ、24時間または2時間のインキュベーション後に31C3抗体とカップリングされるTLR3タンパク質の割合を示す。図20Bと同様の蛍光を示す図20Dおよび20Fでは、抗体31C3によるTLR3の結合が、293T-ISR/TLR3細胞系でのTLR3の発現を下方調節しないことが確認される。

【図21】図21Aおよび21Bは、TLR3受容体に対するリガンドであるポリAUの存在下または不在下での、TLR3チップに対する本発明に従う28F11、34A3および23C8抗体の結合性を示す。図面は、本発明の抗体の結合が、dsRNAのTLR3 dsRNA固定部位への結合を遮断しないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0051】

はじめに

本発明は、自己免疫、炎症、アレルギー、喘息、肝硬変、骨粗鬆症、感染、癌および敗血などの障害の予防および処置に適した抗体および特にTLR3調節性抗体を産生し、使用するための新規の方法を提供する。抗体、抗体誘導体、抗体断片、およびそれらを産生する細胞が、それらを産生する方法ならびに抗体および化合物を使用して患者を処置または診断する方法と同様、包含される。

【0052】

高親和性が抗体において望ましい一方、一般に高ピコモル～低ナノモルの範囲内での親和性を有することが報告されているすべての抗体が、インビトロで親和性が成熟している。科学文献によると、100 pMにインビボでの親和性の上限があり、かつ、抗原に対する親和性が推定される上限を超えるB細胞産生抗体であれば、正常な免疫応答の間に選択的利点を全く有しなくなることが理由で、これが生じうることが提起されている。しかし、ヒトTNF- α に約5.3 pMの結合親和性（K（D））で結合する抗TNF- α 抗体「TSK114」を含む高親和性抗体の例が存在し、それは最初は臨床的に関連するインフリキシマブ（レミケード）およびアダリムマブ（ヒュミラ）mAbの場合より約1,000倍および100倍高かった（Songら、（2008年）Exp. Mol. Med. 40（1）：35-42頁）。高親和性抗体を得ることは、抗原に依存する可能性があるが、これまで利用可能なTLR3抗体は、せいぜいナノモルでの親和性を示している。しかし、本抗TLR3抗体は、極めて高い親和性（10ピコモル相当であり、また100

ピコモルより高い、2つの抗体がかかる親和性を中性および酸性条件の双方で維持した場合を含む)を示した。

【0053】

本発明は、少なくとも部分的には、酸性化エンドソーム区画内で遭遇される場合に対応する酸性条件下で、TLR3に特異的かつ効率的に結合するモノクローナル抗体の発見に基づく。アッセイされる極めて多数の抗体の中で、酸性条件下で高親和性でのTLR3への結合を保持する特定の抗体が現れた一方、例えば市販される他の抗体およびTLR3への結合またはTLR3の調節において選択される他の抗体は、初期にTLR3に対してより高い(例えば $2-10 \log_{10}$ 高めの)親和性を示したにもかかわらず親和性が低下し、および/または、中性条件下であっても低い親和性を有した。用いられる酸性条件は、酸性化エンドソーム区画内で認められる場合と同様のpH5.6であったが、それは炎症症状においてTLR3シグナル伝達が生じると考えられる条件に対応する。

10

【0054】

酸性条件は、一般に、タンパク質の構造に作用するとともに、タンパク質-タンパク質相互作用に作用することが知られている。例えば、他のペプチドに結合されないMHCクラスIIペプチドが、エンドソームの酸性条件下で速やかに分解することは知られている。しかし、この場合、pH5.6の酸性条件下で固定化TLR3に対する高い結合親和性が低下した抗体は、酸性条件下(pH3)で予め精製されていた。理論に拘束されたくないが、これは、結合親和性の低下が生じた原因は、酸性条件での抗体の固有の不安定性(分解)ではなく、むしろ抗体とその標的抗原との間での相互作用における修飾であったことを示唆する。

20

【0055】

TLR3リガンドのポリ(I-C)が、酸性pH時に限ってTLR3に結合し、それを活性化することから、pHの変化に起因する抗体-TLR3相互作用における修飾は、dsRNAとTLR3との相互作用に作用すると考えられる。試験によると、ポリ(I-C)(および他のdsRNA)が、酸性条件(すなわち、pHが4.5~6.5の範囲内、または約5.6の酸性条件)下で静電ポテンシャルの変化を受けうる、中性pHでの正の静電ポテンシャルのTLR3の領域内で、TLR3に結合することが報告されている。しかし、本抗体は、抗体の結合親和性が実質的に変化しない状態を維持する程度に酸性化される条件下で、静電ポテンシャルにおいて実質的な変化を受けない(または、例えば正の静電ポテンシャルの領域よりも少ない変化を受ける)エピトープに結合すると考えられる。一態様では、これは、抗体が、例えばTLR3への結合における K_D が0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、もしくは $1.5-10 \log_{10}$ を超えない程度に異なる場合、酸性条件下でヒトTLR3への結合に対して中性条件下と比べて実質的に異なる(より低いおよび/またはより高い)親和性を有しないことから、抗体のTLR3に対する親和性の観点から顕現しうる。酸性および中性条件下でのTLR3への結合における K_D は、抗体31C3および29H7において、 $0.5-10 \log_{10}$ に満たない程度に異なった。本発明の抗体が結合する相手のエピトープは、中性pHで負の静電ポテンシャルを有しうると考えられる。TLR3タンパク質の表面上での負、正または中性の静電ポテンシャルの領域は、図8またはさらにChoeら、(2005年) Science 309:581-585頁(その開示内容は、参照により本明細書中に援用される)の図5Dにおいて示される。dsRNAリガンドのTLR3への結合に干渉することによってTLR3を阻害する抗体は、TLR3のグリコシル化を含まない表面上のC末端近傍の正または中性の静電ポテンシャルの領域に結合し、それにより、静電ポテンシャルのより大幅な変化を受けうるTLR3の領域内に結合する可能性が高まるが、本抗体は、dsRNAリガンドへの結合に関与しないTLR3の領域に結合しながらも、TLR3タンパク質により、例えばTLR3が最終的にシグナルを変換するのに必要とされる高次構造をとることを阻害することにより、シグナル伝達を阻害する能力を保持するよう見られる。

30

40

【0056】

本発明はまた、少なくとも部分的には、TLR3シグナル伝達経路を特異的かつ効率的

50

に阻害する高親和性モノクローナル抗体の発見に基づく。発明者らは、ヒト TLR3 上に存在するエピトープ、例えば TLR3 シグナル伝達を阻害し、また TLR3 リガンドでの刺激に応答してサイトカイン放出を阻害する場合に特に効率的な、抗体 31C3、29H3、23C8、28F11 もしくは 34A3 によって認識されるエピトープを同定している。

【0057】

TLR3 シグナル伝達を阻害する本発明の抗体は、TLR3 シグナル伝達を阻害することが有益である場合、自己免疫疾患、炎症性疾患および他の疾患を処置および／または予防するのに特に有用となる。自己免疫および炎症性疾患は、身体内に通常存在する物質および組織に対する身体の過剰反応免疫応答から発症する。自己免疫および炎症性疾患の双方においては、症状は、ヒト適応または先天免疫系の異常な反応を通じて発症する。自己免疫においては、患者の免疫系は、身体自体のタンパク質に対して活性化される。（例えば炎症症状を来しうる感染における）炎症性疾患においては、それは免疫系の過剰反応と、それに続く下流シグナル伝達（TNF、IFN など）であり、それは問題を引き起こす。自己免疫疾患は、自己抗原を認識し、かつ組織破壊を媒介する T および B 細胞の増殖に起因する。ウイルス感染は、長い間、自己免疫を引き起こすかまたは明らかに促進すると疑われてきた。Langら、(J. Clin. Invest. 116: 2456-2463 頁、2006 年) においては、ウイルスがさらに別の機序を通じて自己免疫損傷を引き起こしうることを示されている。

【0058】

最近では、dsRNA が TLR3 に対するリガンドであることは確立されており (Alexopoulosら、(2001 年)、Nature 413: 732-738 頁)、またより最近では、1 つもしくは複数の損傷組織から放出される RNA の場合、TLR3 リガンドとしても作用しうることを示されている (Karikoら、(2004 年) J. Biol. Chem.)。免疫複合体内部での TLR のその内因性 RNA リガンドによる不適切な活性化は、ほぼ間違いなく、様々な炎症および自己免疫疾患の病原に寄与する重要な要素である。最近の論文では、TLR3 リガンドが、敗血、または自己免疫疾患、例えば関節リウマチ (Bokarewaら、(2008 年) Eur J. Immunol.)、全身性エリテマトーデス (Rahmanら、(2006 年) Springer Sem. in Immunopathol.)、および糖尿病 (Nature Med 2005 年) の間に認められる過剰炎症応答を増幅する場合の、炎症性疾患における TLR3 の役割が示唆されている (Cavassaniら、2008 年)。TLR3 が、ウエスタンリザーブ (Western Reserve) ワクシニアウイルスなどのウイルス感染において有害な役割を果たし (この場合、TLR3 は、ウイルス複製、有害な肺炎症および白血球の肺への動員に寄与する)、罹患率の増加またはウエストナイルウイルス (WNV) (この場合、TLR3 は、ウイルスが血液脳関門 (BBB) を越え、致死性脳炎を引き起こすことを可能にする) をもたらしうることも報告されている。エンドソームの場合 (例えば脊髄 DC 内) に対応する pH 条件下で、TLR3 を阻害する本発明の抗体は、これらの症状、例えば限定はされないが、ウイルス感染自体およびウイルス感染によって引き起こされるかまたは促進される症状 (例えば自己免疫または炎症症状) の処置および予防において有用となる。

【0059】

Zordev-Kh, Valevskyら、(2009 年) Hepatology 49 は、肝細胞増殖が TLR3 の不在下での部分肝切除後に加速される間、IL-6 および可溶性のインターロイキン-6 受容体 (sIL-6R) のレベルが有意に低下したこと、またさらに、部分肝切除後、TLR3 シグナル伝達が肝細胞内で誘発され、NF-κB の活性化がもたらされ、また、クッパー細胞内での活性化 TLR3 の存在が NF-κB 活性化を阻害することを報告している。したがって、TLR3 シグナル伝達は、肝再生の開始を低下させることが見出され、それ故、本発明の抗 TLR3 抗体は、特に、肝臓損傷、例えば肝硬変を含む疾患、あるいは、アルコール依存症、B もしくは C 型肝炎感染または脂

肪肝疾患などのかかる肝臓損傷を発症させることで知られる疾患を処置および予防するための、肝再生を誘発する方法において使用できる。

【0060】

Kimら、(2009年) *Immunol. Lett.* は、TLR3が、RA滑膜内での破骨細胞形成を、ヒト単球を直接刺激することで破骨細胞分化を促進し、また、RA-FLSにおいて間接的にRANKL発現を誘発することにより、直接的かつ間接的に促進することを報告している。RANKLの発現は、RA滑膜内での破骨細胞の分化を促進し、また抗RANKL抗体(denosumab, Amgen Inc.)は、骨粗鬆症の処置において有効である。したがって、本発明の抗TLR3抗体は、特にRA患者における、炎症性骨破壊、例えば骨粗鬆症を処置および予防するのに使用できる。

10

【0061】

Wenら、(2004年) *J. Immunol.* 172:3172-3180頁は、自己免疫疾患がウイルス様刺激によって誘発されうること示唆し、そこではTLR3がかかる誘発を媒介しうるものとして同定されている。結果によると、インスリン単独または他のTLRリガンド(CpG、LPS、PGN)ではなく、ポリICとインスリンとの併用により、マウスモデルにおいて膵島の自己免疫糖尿病およびアポトーシスを誘発されることが示される。さらに、TLR3は、他のTLRと比較して、すべての個体において最高の発現レベルを示した。したがって、本発明の抗TLR3抗体は、糖尿病および膵島自己免疫を処置および予防するのに使用できる。

【0062】

20

酸性条件下でTLR3に結合する本発明の抗体は、一般に、細胞表面TLR3およびエンドソームTLR3の双方に高親和性で結合することから、抗体は、TLR3の標的化(例えば調節)が有用である場合の任意の状況(例えば疾患の処置または予防)下で有用となる。TLR3は、マクロファージの表面における炎症のいくつかの症例に見出されており、エンドソーム酸性化(acidification)のクロロキン中和時でのTLR3の遮断は、それに反し、一部で抗炎症活性を示した(Cavassaniら、2008年、上記)。しかし、本発明の抗体は、疾患の処置または予防において、細胞質(例えばエンドソーム)区画内でのTLR3によるシグナル伝達を調節すること(例えば阻害すること)が有用であるかまたは求められる場合、他の抗体を超える最高の利点を有することになり、またかかる区画でのTLR3のシグナル伝達を調節することの相対的重要性は、疾患に依存しうる。かかる疾患の一例が関節リウマチであり、エンドソーム区画で発現されるTLR3は、エンドソーム酸性化の阻害剤であるクロロキンによる処理により、TLR3シグナル伝達が阻害され、かつ関節リウマチを有する患者に由来する滑液培養物からの炎症性サイトカインの産生が阻害されることから、関節リウマチにおいて重要な役割を果たすと考えられる(Sacreら、(2008年) *J. Immunol.* 181:8002-8009頁)。エンドソーム区画で発現されるTLR3は、mDCが、文書で十分に立証された、抗原をアポトーシスまたは壊死細胞(急性炎症中の組織壊死の間を含む)から取り込む能力を有することから、DC(例えば脊髄DC)が増悪疾患に関与する場合の多数の他の疾患において重要な役割を果たすと考えられる。

30

【0063】

40

本抗体がTLR3に特異的であることから、それはまた、TLR3またはTLR3発現細胞の精製、インビトロ、生体外、もしくはインビボでのTLR3受容体の調節(例えば活性化または阻害)、インビボでの破壊を意図したTLR3発現細胞の標的化、またはインビボ、生体外、もしくはインビトロでのTLR3の特異的標識/結合を含む他の目的のため、例えば、免疫プロットティング、IHC分析(すなわち凍結生検に対する)、FACS分析、および免疫沈降などの方法において、使用できる。

【0064】

定義

「TLR3リガンド」は、本明細書で使用される場合、インビトロ、生体外、もしくはインビボでTLR3に特異的に結合し、その活性を改変しうる任意の化合物を示す。本化

50

合物は、天然リガンド、例えば、一般に d s R N A またはウイルス d s R N A、またはポリ I C もしくはポリ A U などの合成リガンドでありうる。本化合物は、無機もしくは有機化合物または因子を含む任意のタイプの分子、例えば、タンパク質（抗体など）、核酸、炭水化物、脂質、または任意の他の分子実体でありうる。さらに、かかる化合物は、活性化または阻害を含む任意の方法で、また任意の機序により、例えば、受容体に結合し、天然リガンドの場合と同様に活性を誘発または遮断するか、あるいは受容体に結合し、他のリガンドへの接近を遮断することにより、T L R 3 受容体を調節しうる。好ましくは、リガンドは、受容体を活性化することから、それを使用し、T L R 3 発現細胞によるサイトカインの産生を誘発することが可能である。

【0065】

用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を示す。重鎖における定常ドメインのタイプに応じて、抗体は、5つの主要なクラス、すなわち、I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M のうちの1つに指定される。これらのいくつかは、サブクラスまたはアイソタイプ、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 などさらに分類される。典型的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含む。各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖対から構成され、各対は、1つの「軽」鎖（約 25 k D a）および1つの「重」鎖（約 50 ~ 70 k D a）を有する。各鎖の N 末端は、主に抗原認識に関与する約 100 ~ 110 以上のアミノ酸からなる可変領域を定める。可変軽鎖（V_L）および可変重鎖（V_H）という用語はそれぞれ、これらの軽鎖および重鎖を示す。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、「α」、「δ」、「ε」、「γ」および「μ」と称される。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元構造は周知である。I g G および／または I g M は、それらが生理学的状態における最も一般的な抗体であり、またそれらが研究室セッティング（laboratory setting）において最も容易に作製されることから、本発明で使用される抗体の好ましいクラスであり、I g G が特に好ましい。好ましくは、本発明の抗体は、モノクローナル抗体である。ヒト化、キメラ、ヒト、またはそれ以外ではヒトに適した抗体が特に好ましい。「抗体」はまた、本明細書中に記載の抗体のいずれかの任意の断片または誘導体を含む。

【0066】

用語「に特異的に結合する」は、抗体が、好ましくは、競合結合アッセイにおいて、タンパク質の組換え形態、その中のエピトープ、または単離標的細胞の表面上に存在する天然タンパク質のいずれかを用いて評価される場合、結合パートナー、例えば T L R 3 に結合しうることを意味する。競合結合アッセイおよび特異的結合を判定するための他の方法は、下記にさらに説明され、当該技術分野で周知である。

【0067】

抗体が特定のモノクローナル抗体（例えば、31C3、29H3、23C8、28F11 もしくは 34A3）「と競合する」といわれる場合、それは、抗体が、組換え T L R 3 分子または表面に発現される T L R 3 分子のいずれかを使用する結合アッセイにおいて、モノクローナル抗体と競合することを意味する。例えば、結合アッセイにおいて、試験抗体が、31C3、29H3、23C8、28F11 もしくは 34A3 の T L R 3 ポリペプチドまたは T L R 3 発現細胞への結合を低下させる場合、抗体は、31C3、29H3、23C8、28F11 もしくは 34A3 とそれぞれ「競合する」といわれる。

【0068】

用語「親和性」は、本明細書で使用される場合、抗体のエピトープへの結合の力を意味する。抗体の親和性は、 $[A b] \times [A g] / [A b - A g]$ （式中、 $[A b - A g]$ は抗体-抗原複合体のモル濃度であり、 $[A b]$ は未結合抗体のモル濃度であり、かつ $[A g]$ は未結合抗原のモル濃度である）として定義される解離定数 K_d によって与えられる。親和定数 K_a は、 $1 / K_d$ によって定義される。m A b の親和性を測定するための好ましい方法は、Harlow ら、「Antibodies: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Pre

10

20

30

40

50

ss, Cold Spring Harbor, N. Y.、1988年)、Coliganら編、「Current Protocols in Immunology」、Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N. Y. (1992年、1993年)、およびMuller、Meth. Enzymol. 92: 589-601頁(1983年)(参考文献は、全体として参照により本明細書中に援用される)において見出されうる。mAbの親和性を判定するための、当該技術分野で周知の1つの好ましい標準的方法は、Biacore機器の使用である。

【0069】

本発明に関連する範囲内で、「決定基」は、ポリペプチド上での相互作用または結合の部位を示す。

【0070】

用語「エピトープ」は、抗原決定基として定義され、抗体が結合する対象の抗原上の場所または領域である。タンパク質エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基、ならびに特異的抗原に結合する抗体またはペプチドによって有効に遮断されるアミノ酸残基、すなわち抗体の「フットプリント」内部のアミノ酸残基を含んでもよい。それは、例えば抗体または受容体と結合しうる複合抗原分子上の最も単純な形態または最小の構造領域である。エピトープは、線状または立体配座的／構造的であってもよい。用語「線状エピトープ」は、アミノ酸の線状配列(一次構造)上に隣接するアミノ酸残基からなるエピトープとして定義される。用語「立体配座的または構造的エピトープ」は、全部が隣接しておらず、それ故、分子のフォールディング(二次、三次および／または四次構造)によって互いに隣接した状態になる、アミノ酸の線状配列の分離した部分を示すアミノ酸残基からなるエピトープとして定義される。立体配座的エピトープは、三次元構造に依存する。したがって、用語「立体配座的」は、「構造的」と交換可能に使用されることが多い。

【0071】

「免疫原性断片」は、本明細書中で、(i)膜結合受容体およびそれに由来する突然変異体を含む、前記断片に結合する、および／または前記断片を含む任意の形態の分子に結合する抗体の産生、(ii)任意のMHC分子および前記断片に由来するペプチドを含む二分子複合体に対して反応するT細胞を含むT細胞応答の刺激、(iii)哺乳類免疫グロブリンをコードする遺伝子を発現するバクテリオファージまたは細菌などの形質移入媒体の結合、などの免疫応答を引き起こす能力がある任意のポリペプチドまたはペプチド断片を意味する。あるいは、免疫原性断片はまた、上で規定されるような、免疫応答を引き起こす能力がある任意の作成物、例えば共有カップリングによって担体タンパク質にコンジュゲートされたペプチド断片、前記ペプチド断片をそのアミノ酸配列内に含むキメラ組換えポリペプチドコンストラクトを示し、また詳細には、配列が前記断片をコードする部分を含むcDNAが形質移入された細胞を含む。

【0072】

「毒性」または「細胞毒性」ペプチドまたは小分子は、細胞の増殖を減速させ、停止させ、または食い止めるか、それらの活性を任意の検出可能な方法で低下させるか、あるいはそれらを直接的もしくは間接的に殺滅することが可能な任意の化合物を包含する。好ましくは、毒性または細胞毒性化合物は、細胞を直接的に殺滅するか、アポトーシスを引き起こすかまたはそれ以外により、作用する。毒性「ペプチド」は、本明細書で使用される場合、任意のペプチド、ポリペプチド、またはそれらの誘導体、例えば非天然アミノ酸または修飾された結合を伴うペプチドもしくはポリペプチド誘導体を含みうる。毒性「小分子」は、好ましくは10kD未満、5kD、1kD、750D、600D、500D、400D、300D、もしくはそれより小さいサイズを有する任意の毒性化合物または因子を含みうる。

【0073】

「ヒトに適した」抗体は、例えば本明細書中に記載の治療方法を意図した、ヒトにおいて安全に使用可能な任意の抗体、誘導体化抗体、または抗体断片を示す。ヒトに適した抗体は、あらゆるタイプのヒト化、キメラ、または完全ヒト抗体、あるいは、抗体の少なく

10

20

30

40

50

とも一部が、ヒトに由来するかまたは一般に天然非ヒト抗体が使用される場合に引き起こされる免疫応答を回避するように修飾される場合の任意の抗体を含む。

【0074】

本発明の目的のため、「ヒト化」または「ヒト」抗体は、1つ以上のヒト免疫グロブリンの定常および可変フレームワーク領域が、動物免疫グロブリンの結合領域、例えばCDRと融合された抗体を示す。かかる抗体は、結合領域の由来となる非ヒト抗体の結合特異性を維持するが、非ヒト抗体に対する免疫反応を回避するように設計される。かかる抗体は、抗原接種に応答して特異的ヒト抗体を産生するように「改変」されているトランスジェニックマウスまたは他の動物から得ることができる（例えば、Greenら、（1994年）Nature Genet 7:13頁；Lonbergら、（1994年）Nature 368:856頁；Taylorら、（1994年）Int Immun 6:579頁（これらの全教示内容は参照により本明細書中に援用される）を参照）。完全ヒト抗体はまた、遺伝子または染色体形質移入（chromosomal transfection）法、ならびにファージディスプレイ技術（それら全部は当該技術分野で既知である）により、作製されうる（例えば、McCaffertyら、（1990年）Nature 348:552-553頁を参照）。ヒト抗体はまた、インビトロで活性化されたB細胞によって産生されうる（例えば、米国特許第5,567,610号明細書および米国特許第5,229,275号明細書（それら全体が参照により援用される）を参照）。

10

【0075】

「キメラ抗体」は、（a）定常領域またはその一部が改変されるか、置換されるか、または交換されることで、抗原結合部位（可変領域）が、異なるまたは改変されたクラス、エフェクター機能および／または種の定常領域、またはキメラ抗体に新しい特性（例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬剤など）を与える完全に異なる分子に連結される場合；あるいは（b）可変領域またはその一部が、改変されるか、置換されるか、または交換されることで、可変領域が異なるまたは改変された抗原特異性を有する場合の、抗体分子である。

20

【0076】

用語「Fcドメイン」、「Fc部分」および「Fc領域」は、抗体重鎖のC末端断片、例えば、ヒトγ（ガンマ）重鎖のアミノ酸（aa）230個～aa450個の、または抗体重鎖の他のタイプ（例えば、ヒト抗体におけるα、δ、εおよびμ）におけるその対応配列、またはその天然アロタイプを示す。他に規定がなければ、免疫グロブリンについての一般に認められたKabatアミノ酸の番号付けが、本開示全体を通じて用いられる（Kabatら、（1991年）「Sequences of Protein of Immunological Interest」、第5版、United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MDを参照）。

30

【0077】

用語「単離された」、「精製された」または「生物学的に純粋な」は、通常的に材料に伴う（その天然状態で見出される）成分を実質的または本質的に含まない材料を示す。純度および等質性は、典型的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高性能液体クロマトグラフィーなどの分析化学技術を用いて判定される。調製物中に存在する優勢種であるタンパク質は、実質的に精製される。

40

【0078】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを示すように本明細書中で交換可能に使用される。同用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的な化学的模倣体（chemical mimetic）である場合のアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーに適用される。

【0079】

50

用語「組換え体」は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関連して使用される場合、細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種の核酸もしくはタンパク質の導入または天然の核酸もしくはタンパク質の改変によって修飾されているか、あるいは、細胞がそのように修飾された細胞に由来することを示す。したがって、例えば、組換え細胞は、天然（非組換え）形態の細胞内で見出されない遺伝子を発現するか、または、通常では異常発現される（発現されるかもしくは全く発現されない条件下で）天然遺伝子を発現する。

【0080】

本発明と関連する範囲内で、共通の決定基に「結合する」抗体という用語は、前記決定基に特異性および／または親和性を伴って結合する抗体を示す。

10

【0081】

抗TLR3抗体の産生

本発明の抗体は、TLR3に特異的に結合する。さらに、本発明の抗体は、酸性化エンドソーム区画内で遭遇される場合に対応する酸性条件下でTLR3に結合する。さらに、本発明の抗体は、TLR3シグナル伝達経路に対する阻害能がある。阻害抗体がTLR3シグナル伝達経路を特異的に阻害する能力により、それらは極めて多数の用途において、特に、本明細書中に記載のように、TLR3シグナル伝達経路の阻害、すなわちさらに、サイトカインおよびケモカイン分泌ならびに細胞活性化を回避することが望ましい場合の疾患を処置または予防するのに有用になる。

【0082】

20

一実施形態では、本発明は、ヒトTLR3に結合し、かつヒトTLR3への結合においてモノクローナル抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と競合する抗体を提供する。抗体31C3は、番号CNCMI-4186下で2009年7月3日に、Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM)、Institut Pasteur (25 rue de Docteur Roux, F-75724 Paris) に31C3.1として寄託された細胞によって産生される。抗体29H3は、番号CNCMI-4186下で2009年7月3日に、Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM)、Institut Pasteur (25 rue de Docteur Roux, F-75724 Paris) に29H3.7として寄託された細胞によって産生される。

30

【0083】

「TLR3」、「TLR3ポリペプチド」および「TLR3受容体」は、交換可能に使用され、Toll様受容体 (TLR) ファミリーのメンバであるToll様受容体3を示すように本明細書で使用される。ヒトTLR3のアミノ酸配列は、配列番号1で示される (NCBI登録番号NP_003256、その開示内容は参照により本明細書中に援用される)。ヒトTLR3 mRNA配列は、NCBI登録番号NM_003265で記載される。ヒトTLR3配列はまた、PCT特許公開番号、国際公開第98/50547号パンフレット (その開示内容は参照により本明細書中に援用される) 中に記載される。

【0084】

40

一態様では、本発明は、モノクローナル抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と競合し、モノクローナル抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と実質的もしくは本質的に同じ、または同じ、TLR3分子上のエピトープまたは「エピトープ部位」を認識し、それに結合し、またはそれに対する免疫特異性を有する抗体を提供する。他の実施形態では、モノクローナル抗体は、抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3からなるか、またはその誘導体もしくは断片である。

【0085】

好ましい抗体が抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と同じエピトープに結合する一方、本抗体は、TLR3ポリペプチドの任意の部分を認識し、

50

かつそれに対して産生されうることは理解されるであろう。例えば、T L R 3 の任意の断片、好ましくも限定されないヒト T L R 3、または T L R 3 断片の任意の組み合わせは、抗体を産生するための免疫原として使用でき、また本発明の抗体は、T L R 3 ポリペプチド内部の任意の位置でエピトープを認識することが、それらが本明細書中に記載の M d D C もしくは M o D C などの T L R 3 発現細胞上でそのように作用しうる限り、可能である。一実施形態では、認識されたエピトープは、細胞表面上に存在し、すなわちそれらは、細胞外部に存在する抗体に接近可能である。最も好ましくは、エピトープは、抗体 3 1 C 3、2 9 H 3、2 3 C 8、2 8 F 1 1 もしくは 3 4 A 3 によって特異的に認識されるエピトープである。さらに、T L R 3 内部の異なるエピトープを認識する抗体は、併用されることで、例えば、異なる個体中で最大の有効性および大きさを有する T L R 3 ポリペプチドに結合しうる。

10

【0086】

本発明の抗体は、当該技術分野で既知の種々の技術によって産生してもよい。典型的には、それらは、非ヒト動物、好ましくはマウスの、T L R 3 ポリペプチド、好ましくはヒト T L R 3 ポリペプチドを含む免疫原による免疫によって産生してもよい。T L R 3 ポリペプチドは、ヒト T L R 3 ポリペプチドの完全長配列、またはその断片もしくは誘導体、典型的には免疫原性断片、すなわち、T L R 3 ポリペプチドを発現する細胞の表面上に暴露されるエピトープ、好ましくは 3 1 C 3、2 9 H 3、2 3 C 8、2 8 F 1 1 もしくは 3 4 A 3 抗体によって認識されるエピトープを含むポリペプチドの一部を含んでもよい。かかる断片は、典型的には、成熟ポリペプチド配列の少なくとも約 7 の連続アミノ酸、さらにより好ましくはその少なくとも約 10 の連続アミノ酸を有する。断片は、典型的には、本質的に受容体の細胞外ドメインに由来する。好ましい実施形態では、免疫原は、脂質膜内、典型的には細胞の表面にある野生型ヒト T L R 3 ポリペプチドを含む。特定の実施形態では、免疫原は、無傷細胞、特に無傷ヒト細胞、場合によって処理または溶解される場合を含む。別の好ましい実施形態では、ポリペプチドは、組換え T L R 3 ポリペプチドである。

20

【0087】

非ヒト哺乳動物を抗原で免疫するステップは、マウスにおける抗体の産生を刺激するための当該技術分野で周知の任意の方法で実施してもよい（例えば、E. Harlow および D. Lane、「Antibodies: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY) (1988 年)（その全開示内容は、参照により本明細書中に援用される）を参照）。免疫原は、場合によってアジュバント、例えば完全または不完全フロイドアジュバントを有する緩衝液に懸濁または溶解される。免疫原の量、緩衝液のタイプおよびアジュバントの量を測定するための方法は、当業者にとって周知であり、本発明に対して決して限定的ではない。これらのパラメータは、異なる免疫原に対して異なる場合があるが、容易に解明される。

30

【0088】

同様に、抗体の産生を刺激するのに十分な免疫の位置および頻度もまた、当該技術分野で周知である。典型的な免疫プロトコルでは、非ヒト動物は、1 日目と約 1 週間後に再度、抗原が腹腔内に注射される。この後、約 20 日目に、場合によって不完全フロイドアジュバントなどのアジュバントを用いる、抗原のリコール注射 (recall injection) が行われる。リコール注射は、静脈内に行われ、数日間連続して繰り返してもよい。この後、40 日目に、典型的にはアジュバントを用いずに、静脈内または腹腔内のいずれかにブースター注射が行われる。このプロトコルにより、約 40 日後、抗原特異的抗体を産生する B 細胞の産生がもたらされる。他のプロトコルもまた、免疫において使用される抗原に特異的な抗体を発現する B 細胞の産生がもたらされる限り、用いてもよい。

40

【0089】

ポリクローナル抗体の調製においては、血清が、免疫非ヒト動物および周知の技術によ

50

って単離されるその中に存在する抗体から得られる。TLR3ポリペプチドと反応する抗体を得るため、血清を、固体支持体に結合された上に示される免疫原のいずれかを用いて親和性精製してもよい。

【0090】

他の実施形態では、非免疫非ヒト哺乳動物由来のリンパ球が単離され、インビトロで成長され、次いで細胞培養物中の免疫原に暴露される。次いで、リンパ球は採取され、下記の融合ステップが実施される。

【0091】

好ましいモノクローナル抗体においては、次のステップは、抗体産生ハイブリドーマを形成するための、免疫非ヒト哺乳動物由来の脾細胞の単離およびそれに続くそれら脾細胞と不死化細胞との融合である。非ヒト哺乳動物からの脾細胞の単離は、当該技術分野で周知であり、また、単一の細胞懸濁液を生成するため、典型的には、麻酔された非ヒト哺乳動物から脾臓を取り出し、それを小片に切断し、脾細胞を脾膜からセルストレーナー（cell strainer）のナイロンメッシュを通して適切な緩衝液に搾り出すことを含む。細胞は、洗浄され、遠心分離され、任意の赤血球を溶解する緩衝液に再懸濁される。溶液は、再び遠心分離され、ペレット中に残存するリンパ球は、最終的に新しい緩衝液に再懸濁される。

【0092】

リンパ球は、一旦単離され、単一の細胞懸濁液中に存在する場合、不死細胞系に融合される。これは、典型的にはマウス骨髄腫細胞系であるが、ハイブリドーマの作製に有用な多数の他の不死細胞系は、当該技術分野で既知である。好ましいマウス骨髄腫系は、限定はされないが、Salk Institute Cell Distribution Center（San Diego, U. S. A.）から入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、American Type Culture Collection（Rockville, Maryland, U. S. A.）から入手可能なX63 Ag8653およびSP-2細胞に由来するものを含む。融合は、ポリエチレングリコールまたはそれに類するものを使用して行われる。次いで、得られたハイブリドーマは、未融合の親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する1種以上の物質を含有する選択培地中で成長される。例えば、親骨髄腫細胞に酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRRT）が欠損している場合、ハイブリドーマ用の培地は、典型的にはヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（同物質はHGPRT欠損細胞の成長を阻止する）を含むことになる（HAT培地）。

【0093】

ハイブリドーマは、典型的にはマクロファージの栄養補給層上で成長される。マクロファージは、好ましくは、脾細胞を単離するために使用される、非ヒト哺乳動物の同腹子に由来し、また、典型的には、ハイブリドーマをプレーティングする数日前に不完全フロインドアジュバントまたはそれに類するものでプライミングされる。融合方法は、Goding、「Monoclonal Antibodies: Principles and Practice」、59-103頁（Academic Press、1986年）（その開示内容は参照により本明細書中に援用される）中に記載されている。

【0094】

細胞は、コロニー形成および抗体産生にとっての十分な時間、選択培地中で成長させておく。これは通常、約7～約14日間である。

【0095】

次いで、ハイブリドーマコロニーは、TLR3ポリペプチド遺伝子産物、場合により、抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3によって特異的に認識されるエピトープに特異的に結合する抗体の産生についてアッセイされる。アッセイは、典型的には、比色ELISA型アッセイであるが、ハイブリドーマが成長するウェルに適合しうる場合には任意のアッセイを用いてもよい。他のアッセイは、ラジオイムノアッセイまたは蛍光活性化細胞選択を含む。所望される抗体産生が陽性のウェルについて試験し

10

20

30

40

50

、1つ以上の異なるコロニーが存在するか否かが判定される。2つ以上のコロニーが存在する場合、細胞は、再クローン化され、成長され、単一の細胞のみが所望される抗体を産生するコロニーを生じさせていることが確認されうる。典型的には、本抗体はまた、下記のように、パラフィン包埋組織切片内でのT L R 3 ポリペプチド、例えばT L R 3 発現細胞に対する結合能について試験されることになる。

【0096】

本発明のモノクローナル抗体を産生することが確認されているハイブリドーマは、適切な培地、例えばD M E MまたはR P M I - 1 6 4 0中でより大量に成長されうる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍として、インビボで成長されうる。

【0097】

モノクローナル抗体（または腹水）を含有する増殖培地は、所望されるモノクローナル抗体を産生するほど十分に成長した後、細胞から分離され、その中に存在するモノクローナル抗体は精製される。精製は、典型的には、ゲル電気泳動、透析、クロマトグラフィー（プロテインAもしくはプロテインG-セファローズ、またはアガロースもしくはセファローズビーズなどの固体支持体に連結された抗マウスI gを使用）によって行われる（すべては、例えば、「Antibody Purification Handbook」、Biosciences、発刊番号18-1037-46、Edition AC（その開示内容はここで参照により援用される）中に記載されている）。結合抗体は、典型的には、抗体含有画分の即時中和を伴う低pH緩衝液（pH3.0以下のグリシンもしくは酢酸塩緩衝液）の使用により、プロテインA／プロテインGカラムから溶出される。これらの画分は、必要に応じ、プールされ、透析され、濃縮される。

【0098】

外見上単一のコロニーを有する陽性のウェルは、典型的には、再クローン化および再アッセイがなされることで、1つのモノクローナル抗体のみが検出され、産生されていることが確認される。

【0099】

抗体はまた、例えば、Wardら、Nature、341（1989年）、544頁（その全開示内容は参照により本明細書中に援用される）に開示されるように、免疫グロブリンのコンビナトリアルライブラリの選択によって産生されてもよい。

【0100】

T L R 3、特に、モノクローナル抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と実質的もしくは本質的に同じエпитープに結合する1つ以上の抗体の同定については、抗体競合が評価可能な、種々の免疫学的スクリーニングアッセイのいずれか1つを用いて容易に判定されうる。多くのかかるアッセイは、通常的に実施され、当該技術分野で周知である（例えば、米国特許第5,660,827号明細書、1997年8月26日に交付（具体的には参照により本明細書中に援用される）を参照）。本明細書中に記載の抗体が結合するエпитープを実際に決定することが、本明細書中に記載のモノクローナル抗体と同じもしくは実質的に同じエпитープに結合する抗体を同定するために決して必要とされないことが理解されるであろう。

【0101】

例えば、試験されるべき試験抗体が異なる動物源から得られるか、またはさらに異なるI gアイソタイプである場合、対照（例えば、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3）および試験抗体が混合され（または予備吸着され）、T L R 3 ポリペプチドを含有する試料に適用されるような単純な競合アッセイを用いてもよい。ウエスタンブロッティングに基づくプロトコルおよびB I A C O R E分析の使用は、かかる競合試験における使用に適する。

【0102】

特定の実施形態では、対照抗体（例えば、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3）を、様々な量の試験抗体と、T L R 3 抗原試料に適用する前のある期間、予備混合する（例えば、約1:10または約1:100）。他の実施形態では、対照

10

20

30

40

50

および様々な量の試験抗体は、TLR3抗原試料に暴露する間、単純に混合しうる。（例えば、未結合抗体を除去するための分離または洗浄技術を用いることにより）結合抗体を遊離抗体から、また、（例えば、種特異的またはアイソタイプ特異的二次抗体を使用するかまたは31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3を検出可能な標識で特異的に標識することにより）31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3を試験抗体から区別できる限り、試験抗体が31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3の抗原への結合を低下させるか否かを判定することができ、それは試験抗体が31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と実質的に同じエピトープを認識することが示される。完全に無関係な抗体の不在下での（標識）対照抗体の結合は、高値の対照としての機能を果たしうる。低値の対照は、標識（31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3）抗体を全く同じタイプ（31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3）の未標識抗体とともにインキュベートすることによって得られる可能性があり、この場合、競合が生じ、かつ標識抗体の結合が低下することになる。試験アッセイでは、試験抗体の存在下での標識抗体の反応性における有意な低下は、実質的に同じエピトープを認識する試験抗体、すなわち、標識（31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3）抗体と「交差反応する」または「競合する」抗体を示唆する。31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3のTLR3抗原への結合を、少なくとも約50%、例えば少なくとも約60%、またはより好ましくは少なくとも約80%もしくは90%（例えば、約65～100%）低下させる任意の試験抗体（31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3：試験抗体が約1：10～約1：100の間での任意の比）は、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と実質的に同じエピトープまたは決定基に結合する抗体であると考えられる。好ましくは、かかる試験抗体は、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3のTLR3抗原への結合を、少なくとも約90%（例えば約95%）低下させることになる。

【0103】

競合はまた、例えばフローサイトメトリー試験によって評価しうる。かかる試験では、所与のTLR3ポリペプチドを担持する細胞は、最初に例えば、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3とともに、次いで蛍光色素またはビオチンで標識された試験抗体とともにインキュベートしうる。飽和量の31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3とのプレインキュベーション時に得られる結合が、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3とのプレインキュベーションを伴わない抗体によって得られる（蛍光を介して測定される）結合の、約80%、好ましくは約50%、約40%もしくはそれ未満（例えば、約30%、20%もしくは10%）である場合、抗体は、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と競合するといわれる。あるいは、飽和量の試験抗体とプレインキュベートされる細胞上の（蛍光色素またはビオチンによる）標識31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3抗体の場合に得られる結合が、試験抗体とのプレインキュベーションを伴わない場合に得られる結合の、約80%、好ましくは約50%、約40%、もしくはそれ未満（例えば、約30%、20%もしくは10%）である場合、抗体は、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3と競合するといわれる。

【0104】

また、試験抗体が、上部にTLR3抗原が固定化されている表面に飽和濃度で予備吸着され、適用されている単純な競合アッセイを用いてもよい。単純な競合アッセイにおける表面は、好ましくはBIACOREチップ（または表面プラズモン共鳴分析に適した他の媒体）である。次いで、対照抗体（例えば、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3）は、TLR3飽和濃度で表面と接触状態にされ、対照抗体のTLR3および表面への結合が測定される。対照抗体のこの結合は、試験抗体の不在下での対照抗体のTLR3含有表面への結合と比較される。試験アッセイにおいては、試験抗体の存在下での対照抗体によるTLR3含有表面での結合における有意な低下は、試験抗体が対照

抗体と実質的に同じエピトープを認識することで、試験抗体が対照抗体と「交差反応する」ことを示す。対照（31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3など）抗体のTLR3抗原への結合が少なくとも約30%以上、好ましくは約40%低下した任意の試験抗体は、対照（例えば、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3）と実質的に同じエピトープまたは決定基に結合する抗体であると考えられうる。好ましくは、かかる試験抗体は、対照抗体（例えば、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3）のTLR3抗原への結合を少なくとも約50%（例えば、少なくとも約60%、少なくとも約70%、もしくはそれより大きく）低下させることになる。対照および試験抗体の順序は入れ替え可能であり、すなわち、競合アッセイにおいて、対照抗体が最初に表面に結合でき、その後試験抗体が表面と接触状態にされることは理解されるであろう。好ましくは、TLR3抗原に対してより高い親和性を有する抗体は、最初に表面に結合され、これは、二次抗体において認められる結合性の低下（抗体が交差反応していると仮定）がより顕著になると想定されることが理由である。かかるアッセイのさらなる例が、例えば、Saunala（1995年）J. Immunol. Methods 183:33-41頁（その開示内容は参照により本明細書中に援用される）に提供される。

【0105】

抗体がエピトープ領域内で結合するか否かの判定は、当業者に既知の方法で行ってもよい。かかるマッピング／特徴づけ方法の一例としては、抗TLR3抗体に対するエピトープ領域は、TLR3タンパク質中での暴露されるアミン／カルボキシルの化学修飾を用いるエピトープ「フットプリンティング」によって判定されうる。かかるフットプリンティング技術の1つの具体例は、HXMS（質量分析によって検出される水素－重水素交換）の使用であり、ここでは、受容体およびリガンドタンパク質のアミド陽子での水素／重水素交換、結合、および逆交換が生じ、ここでタンパク質結合に関与する骨格アミド基は、逆交換から保護され、したがって重水素化されたままになる。関連領域は、この場所で、ペプシンタンパク質加水分解、高速マイクロボア高性能液体クロマトグラフィー分離、および／またはエレクトロスプレーイオン化質量分析によって同定されうる。例えば、Ehring H、「Analytical Biochemistry」、第267巻（2）、252-259頁（1999年）Engen J. R. およびSmith D. L.（2001年）Anal. Chem. 73、256A-265Aを参照のこと。好適なエピトープ同定技術の別の例が、核磁気共鳴エピトープマッピング（NMR）であり、この場合、典型的には、遊離抗原および抗原結合ペプチド、例えば抗体と複合体を形成する抗原の二次元NMRスペクトルにおけるシグナルの位置が比較される。抗原は、典型的には、15Nで選択的に同位体標識されることで、NMRスペクトルにおいて、抗原に対応するシグナルのみが見られ、かつ抗原結合ペプチドからのシグナルが全く見られない。抗原結合ペプチドとの相互作用に関与するアミノ酸に由来する抗原シグナルは、典型的には、複合体のスペクトルにおける位置を、遊離抗原のスペクトルに対してシフトさせることになり、また結合に関与するアミノ酸は、そのようにして同定されうる。例えば、Ernst Schering Res Found Workshop. 2004年；（44）：149-67頁；Huang et Journal of Molecular Biology、第281巻（1）、61-67頁（1998年）；ならびにSaitoおよびPatterson、Methods. 1996年6月；9（3）：516-24頁を参照のこと。

【0106】

エピトープマッピング／特徴づけはまた、質量分析法を用いて実施可能である。例えば、Downard、J Mass Spectrom. 2000年4月；35（4）：493-503頁ならびにKisellarおよびDownard、Anal Chem. 1999年5月1日；71（9）：1792-801頁を参照のこと。また、プロテアーゼ消化技術は、エピトープマッピングおよび同定と関連して有用でありうる。抗原決定基関連領域／配列は、プロテアーゼ消化により、例えばpH7～8でのo/n消化のために

トリプシンをTLR3に対して約1:50の比で使用し、続いてペプチド同定のための質量分析(MS)で分析することにより、判定されうる。抗TLR3結合剤によってトリプシン切断から保護されたペプチドは、後に、トリプシン消化を受けた試料と、抗体とともにインキュベートされ、次いで例えばトリプシンによる消化を受けた試料と、の比較によって同定されうる(それによって結合剤に対するフットプリントが明らかになる)。キモトリプシン、ペプシンなどのような他の酵素は、同様のエピトープ特徴づけ方法において使用しうる。さらに、酵素消化は、潜在的な抗原決定基配列が、表面暴露されていない(それ故、免疫原性/抗原性の観点で最も関連性が少ない)TLR3ポリペプチドの領域内に含まれるか否かを分析するための迅速な方法を提供しうる。類似技術の考察については、例えばManc a、Ann Ist Super Sanita. 1991年; 27: 15-9頁を参照のこと。

10

【0107】

部位特異的突然変異誘発は、結合エピトープの解明のために有用な別の技術である。例えば、「アラニン走査」においては、タンパク質セグメント内の各残基がアラニン残基と置換され、結合親和性における結果が測定される。突然変異が結合親和性の有意な低下(resuction)をもたらす場合、結合に関与する可能性が最も高い。構造エピトープに特異的なモノクローナル抗体(すなわち、フォールディングされていないタンパク質に結合しない抗体)を使用し、アラニン置換が、タンパク質のフォールディング全体に影響を与えないことを検証することが可能である。例えば、ClacksonおよびWells、Science 1995年; 267: 383-386頁; およびWells、Proc Natl Acad Sci USA 1996年; 93: 1-6頁を参照のこと。

20

【0108】

また、エピトープ「フットプリンティング」に対して、電子顕微鏡を使用してもよい。例えば、Wangら、Nature 1992年; 355: 275-278頁では、天然ササゲモザイクウイルスのカプシド表面上のFab断片の物理的フットプリントを測定するため、低温電子顕微鏡、三次元画像再構成、およびX線結晶学の協調的活用が用いられた。

【0109】

エピトープ評価のための「非標識(label-free)」アッセイの他の形態として、表面プラズモン共鳴(SPR, BIACORE)および反射干渉分光法(RifS)が挙げられる。例えば、Fagerstromら、Journal Of Molecular Recognition 1990年; 3: 208-14頁; Niceら、J. Chromatogr. 1993年; 646: 159-168頁; Leipertら、Angew. Chem. Int. Ed. 1998年; 37: 3308-3311頁; Krogerら、Biosensors and Bioelectronics 2002年; 17: 937-944頁を参照のこと。

30

【0110】

本発明の抗体と同じもしくは実質的に同じエピトープに結合する抗体が、本明細書中に記載の典型的な競合アッセイの1つ以上において同定されうることも着目すべきである。

40

【0111】

一旦、TLR3に対する結合能があり、および/または他の所望される特性を有する抗体が同定されると、それらはまた、典型的には、例えば本明細書中に記載の標準的方法を用い、それらの他のポリペプチド、例えば関連のないポリペプチドおよび他のTLRファミリーメンバ(例えば、ヒトTLR1、2、もしくは4~10)に対する結合能について評価されることになる。望ましくは、抗体は、あくまでTLR3、例えばヒトTLR3に対して実質的な親和性で結合し、関連のないポリペプチドまたは他のTLRファミリーメンバ(例えば、TLR2もしくはTLR4; アミノ酸残基1~23でのシグナルペプチドを含むヒト前駆体TLR4のアミノ酸配列は、NCBI登録番号NP_612564に見出され、その開示内容は参照により本明細書中に援用される)に有意なレベルで結合しな

50

い。しかし、T L R 3 に対する親和性が、他の T L R ファミリーメンバ（または他の関連のないポリペプチド）の場合より実質的に高い（例えば、5 倍、1 0 倍、5 0 倍、1 0 0 倍、5 0 0 倍、1 0 0 0 倍、1 0、0 0 0 倍、もしくはそれより高い）限り、抗体は本方法における使用に適することが理解されるであろう。

【0 1 1 2】

抗体の T L R 3 発現細胞への結合はまた、非ヒト霊長類、例えばカニクイザル、またはマウスなどの他の哺乳類において評価しうる。したがって、本発明は、抗体、ならびにその断片および誘導体を提供し、ここで前記抗体、断片または誘導体は、T L R 3 に特異的に結合し、さらにそれは、非ヒト霊長類、例えばカニクイザルに由来する T L R 3 に結合する。場合により、細胞内取り込みまたは局在化、場合により、エンドサイトーシス経路などの細胞内区画内での局在化が、T L R 3 が発現される細胞および／または細胞内区画へ容易に取り込まれる抗体を選択するため、評価される。細胞内取り込みまたは局在化は、一般に、抗体がその活性を発揮することが求められるかまたは考えられている細胞内、例えば D C 内で測定されることになる。細胞内取り込みまたは局在化は、標準的方法により、例えば検出可能な部分（例えば蛍光部分）で標識された抗体を使用する共焦点染色により、評価しうる。

【0 1 1 3】

脊椎動物または細胞内での抗体の免疫および産生時、特定の選択ステップを実施し、特許請求される抗体を単離してもよい。これに関連し、特定の実施形態では、本発明はまた、かかる抗体を産生する方法であって、（a）非ヒト哺乳動物を、T L R 3 ポリペプチドを含む免疫原で免疫するステップと；（b）前記免疫動物から抗体を調製するステップと；（c）T L R 3 に結合する能力がある、ステップ（b）からの抗体を選択するステップと、を含む方法に関する。本抗体は、細胞質区画（例えばエンドソーム区画）内の場合に対応する酸性条件下、例えば約 5. 5 ～ 6. 5 の間の p H で、T L R 3 への結合について試験しうる。

【0 1 1 4】

酸性条件下でのヒト T L R 3 に対する抗体の二価結合親和性は、測定可能である。抗体は、例えば、約 1 0 0、6 0、1 0、5、もしくは 1 ナノモル以下（すなわち親和性が向上）、好ましくはサブナノモル、または場合により、約 3 0 0、2 0 0、1 0 0 もしくは 1 0 ピコモル以下の平均 K_D により、特徴づけることが可能である。 K_D は、例えば、組換え的に生成されたヒト T L R 3 タンパク質のチップ表面上への固定化、それに続く溶液中で試験されるべき抗体の適用（例えば本実施例中に示される）により、測定可能である。酸性および中性条件下での結合性に類似した結合性を保持する抗体を選択するため、例えば酸性 p H での結合親和性が実質的に低下しない場合、例えば T L R 3 への結合における K_D が、非酸性 p H で認められる場合より、0. 2 -、0. 3 -、0. 5 -、1. 0 -、もしくは 1. 5 - $\log_{10}$ 以下だけ低下する場合、中性 p H（例えば 7. 2）での結合と酸性 p H（例えば 4. 5 ～ 6 - 5 の範囲内の p H）での結合との間に認められる差異の最小化を試みることができる。一実施形態では、本方法は、T L R 3 への結合において、抗体 3 1 C 3、2 9 H 3、2 3 C 8、2 8 F 1 1 もしくは 3 4 A 3 と競合する能力がある、（b）からの抗体を選択するステップ（d）をさらに含む。

【0 1 1 5】

実施形態のいずれかの一態様では、本方法によって調製される本抗体は、モノクローナル抗体である。別の態様では、本発明の方法に従う抗体を産生するために使用される非ヒト動物は、哺乳動物、例えば齧歯類、ウシ、ブタ、家禽、ウマ、ウサギ、ヤギ、またはヒツジである。本発明の抗体は、3 1 C 3、2 9 H 3、2 3 C 8、2 8 F 1 1 もしくは 3 4 A 3 を包含する。しかし、他の抗体が、本明細書中に記載の方法を用いて得ることが可能であり、それ故、本発明の抗体は、3 1 C 3、2 9 H 3、2 3 C 8、2 8 F 1 1 もしくは 3 4 A 3 以外の抗体でありうることは理解されるであろう。さらに、本発明の抗体は、場合により、抗体 T L R 3. 7 のいずれか（e B i o S c i e n c e I n c. （S a n D i e g o））、国際公開第 0 6 / 0 6 0 5 1 3 号パンフレットの抗体 C 1 0 6 8、国際

公開第2007/051164号パンフレットの抗体C1130、国際公開第2010/051470号パンフレットで開示された抗体のいずれか、例えば抗体1～19およびF17～F19、抗体40C1285 (Abcam)、または抗体619F7、713E4、716G10、IMG-5631、IMG-315もしくはIMG-5348 (全部がImgenex Corp. 製) あるいはそれらの誘導体 (例えば、全部または一部において抗原結合領域を含む)、以外の抗体であるように特定化しうる。

【0116】

他の実施形態によると、TLR3ポリペプチド上に存在するエピトープに結合する抗体をコードするDNAは、本発明のハイブリドーマから単離され、適切な宿主への形質移入にとって適切な発現ベクター内に挿入される。次いで、宿主は、抗体、またはその変異体、例えば、そのモノクローナル抗体のヒト化バージョン、抗体の活性断片、抗体の抗原認識部分を含むキメラ抗体、または検出可能な部分を含むバージョンの組換え産生のために使用される。

10

【0117】

本発明のモノクローナル抗体、例えば、抗体31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3をコードするDNAは、従来の手順を用い (例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合する能力があるオリゴヌクレオチドプローブの使用により)、容易に単離され、配列決定されうる。DNAは、一旦単離されると、発現ベクターに挿入可能であり、次いでそれは、通常は免疫グロブリンタンパク質を産生しない、大腸菌 (E. coli) 細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または骨髓腫細胞などの宿主細胞に形質移入され、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成が得られる。本明細書中の他の箇所で記載のように、抗体の結合特異性を最適化することを目的に、かかるDNA配列は、例えば、抗体をヒト化する、断片もしくは誘導体を産生する、または例えば抗原結合部位において抗体の配列を修飾するといった多数の目的のいずれかのため、修飾しうる。

20

【0118】

抗体をコードするDNAの細菌内での組換え発現は、当該技術分野で周知である (例えば、Skerrera、*「Curr. Opinion in Immunol.*)、5、256頁 (1993年) ; およびPluckthun、*Immunol.* 130、151頁 (1992年) を参照。

30

【0119】

抗体のTLR3シグナル伝達に対する調節能の評価

特定の実施形態では、本発明の抗体は、TLR3ポリペプチドによるシグナル伝達を調節し、例えば阻害し、結果としてTLR3発現細胞の活性または挙動を調節することができる。例えば、抗体は、TLR3発現細胞の活性化を阻害してもよく、例えばそれらはTLR3シグナル伝達経路を、場合によってdsRNAなどの天然もしくは内因性リガンドのTLR3への結合を遮断することなく阻害可能であり、場合により、それらは、TLR3タンパク質がTLR3リガンドの存在下でホモ二量体を形成する能力を遮断し、それ故、シグナル伝達カスケードの開始を遮断してもよい。したがって、これらの抗体は、「中和」または「阻害」または「遮断」抗体と称される。かかる抗体は、特に、TLR3発現免疫細胞の活性を低下させるため、例えば過剰なTLR3発現細胞の活性または数を含む症状の処置または予防において、またはTLR3発現細胞活性の低下が、症状またはその任意の徴候を改善、予防、除去、またはいくらか改善しうる場合、有用である。

40

【0120】

様々な範囲の細胞アッセイを用い、抗体のTLR3シグナル伝達に対する調節能を評価することが可能である。分子、細胞に基づく、および動物に基づくモデルを含む多数のアッセイのいずれかを用い、抗TLR3抗体のTLR3発現細胞活性に対する調節能を評価することが可能である。例えば、細胞に基づくアッセイを、TLR3を発現する細胞がdsRNA、ウイルスdsRNA、ポリIC、もしくはポリAU、または別のTLR3リガンドに暴露され、かつ、抗体がリガンドの結合または受容体の刺激を破壊する能力 (例え

50

ば、本明細書中に記載の TLR3 細胞活性、例えばインターフェロン発現、NFkB 活性、NK 細胞活性化などのいずれかを試験することによって判定される) が評価されるように、用いることが可能である。アッセイにおいて使用される TLR3 リガンドは、限定はされないが、精製リガンド組成物として、非 TLR3 リガンドとの混合物中、天然組成物中、細胞内もしくは細胞の表面上を含む任意の好適な形態でありえ、あるいは溶液中または固体支持体上で細胞によって分泌されうる (例えばリガンドを産生する細胞がアッセイで使用される)。

【0121】

TLR3 発現細胞の活性はまた、リガンドの不在下で、細胞を抗体自体に暴露し、細胞の活性または挙動の任意の態様に対するその効果を評価することによって評価しうる。かかるアッセイにおいては、TLR3 発現細胞のベースラインレベルの活性 (例えば、サイトカイン産生、増殖、下記参照) が、リガンドの不在下で得られ、また抗体または化合物がベースライン活性レベルを変更する能力が検出される。かかる一実施形態では、高スループットスクリーニングアプローチを用い、受容体の活性化に作用可能な化合物が同定される。

10

【0122】

TLR3 活性に反映する任意の好適な生理的变化を用い、試験抗体または抗体誘導体を評価することが可能である。例えば、種々の効果、例えば遺伝子発現における変化 (例えば NFkB 応答性遺伝子)、タンパク質分泌 (例えばインターフェロン)、細胞成長、細胞増殖、pH、細胞内二次メッセンジャー、例えば、 Ca^{2+} 、IP3、cGMP、もしくは cAMP、または NK 細胞に対する活性化能などの活性を測定することができる。一実施形態では、受容体の活性は、サイトカイン、例えば TLR3 応答性サイトカイン、炎症誘発性サイトカインの産生を検出することによって評価される。

20

【0123】

TLR3 の調節は、ほとんどの場合、例えば、IRF3、IRF7、IKKε および/または TBK1 を含む、例えば MyD88 独立性/IRF 依存性シグナル形質導入経路を含む、TLR/IL-1R シグナル形質導入経路に基づく、多数の考えられる読み出しシステム (readout system) のいずれかを使用して評価されうる (Akira および Takeda (2004 年) Nature Review Immunol. 4: 499-511 頁)。これらの経路は、KB キナーゼ複合体を含むキナーゼを活性化する。TLR3 の活性化は、TLR シグナル伝達の任意の態様を試験することによって評価されうる。例えば、TLR シグナル伝達の活性化は、タンパク質-タンパク質会合 (例えば、IRF と TBK および/または IKKε)、タンパク質の細胞内局在化 (NK-kB の核への移動など)、および遺伝子発現 (例えば、NK-kB 感受性遺伝子の発現) における変化、ならびにサイトカイン産生 (例えば、IFN-γ、IL-6、IP10、MCP-1 の産生および分泌) を引き起こす。任意のかかる変化は、検出可能であり、それを用いて TLR3 活性化が検出されうる。一実施形態では、TLR3 の刺激は、培養の 18~20 時間後に上清を回収し、IFN-γ、IL-6、IP-10 および/または MCP-1 のレベルをサンドイッチ ELISA によって測定することによって検出される。別の実施形態では、TLR3 の刺激は、培養の 18~20 時間後に上清を回収し、IFN-γ、IL-6、IP-10 および/または MCP-1 のレベルをサンドイッチ ELISA によって測定することによって検出される。

30

40

【0124】

一実施形態では、TLR3 を天然に発現する細胞、例えば DC (例えば脊髄 DC または単球由来 DC) が使用される。別の実施形態では、TLR3 の刺激およびその結果としてのシグナル形質導入経路の活性化時、検出可能な遺伝子産物の発現を引き起こすレポーターコンストラクトを有する細胞が使用される。アッセイにとって特に有用なレポーター遺伝子およびレポーター遺伝子コンストラクトは、例えば、NF-kB または特に IRF、IRF3、IRF7、IKKε、TBK1 によって媒介されるシグナル伝達に感受性を示すプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む。かかるプロモーター

50

の例として、限定はされないが、I L-1 α 、I L-6、I L-8、I L-12 p40、I P-10、C D80、C D86、およびT N F- α に対するものが挙げられる。T L R感受性プロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子は、限定はされないが、酵素（例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（C A T）など）、生物発光マーカー（例えば、緑色蛍光タンパク質（G F P、例えば米国特許第5, 491, 084号明細書）、青色蛍光タンパク質（B F P、例えば米国特許第6, 486, 382号明細書）など）、表面発現分子（例えば、C D25、C D80、C D86）、および分泌分子（例えば、I L-1、I L-6、I L-8、I L-12 p40、T N F- α ）を含みうる。例えば、H c k e r Hら、（1999年）E M B O J. 18: 6973-82頁；M u r p h y T Lら、（1995年）M o l C e l l B i o l 15: 5258-67頁（それらの開示内容は参照により本明細書中に援用される）を参照のこと。使用に適したレポータープラスミドは、市販されている（I n v i v o G e n（S a n D i e g o, C A））。一実施形態では、アッセイは、ヒトT L R3ポリペプチドを発現するように作製された宿主細胞内で、試験組成物が、T L R3シグナル伝達に対して応答性を示すプロモーター（例えばI S R E、I F N刺激応答因子）の制御下で、ルシフェラーゼ発現（または他のレポーター）を誘発するか否かを判定するステップを含む。

10

【0125】

酵素活性の読み出しに依存するアッセイにおいては、基質がアッセイの一部として供給され、また検出は、化学発光、蛍光、着色、放射性標識の取り込み、薬剤耐性、光学密度、または酵素活性の他のマーカーの測定を含みうる。分子の表面発現に依存するアッセイにおいては、検出は、フローサイトメトリー（F A C S）分析または機能アッセイを用いて行われうる。分泌分子は、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）またはバイオアッセイを用いてアッセイ可能である。これらや他の好適な読み出しシステムの多くは、当該技術分野で周知であり、市販されている。好ましくは、レポーターシステムは、いずれが使用される場合でも定量化可能である。

20

【0126】

別の実施形態では、T L R3発現細胞に対する抗体の効果は、インビボで非ヒト霊長類において評価される。例えば、本発明の抗T L R3抗体を含む医薬組成物は、健常であるかまたはある症状、例えば自己免疫疾患または炎症を発症している非ヒト霊長類に投与され、また、例えば、霊長動物におけるT L R3発現細胞の数または活性、サイトカインの存在および／もしくはレベル、または症状の進行に対する投与の効果がアッセイされる。これらのT L R3に関連するパラメータのいずれかにおいて検出可能な変化を及ぼす任意の抗体または抗体誘導体もしくは断片は、本明細書中に記載の方法における使用のための候補である。

30

【0127】

本明細書中に記載のアッセイのいずれかにおいて、細胞内でのT L R3刺激性活性の任意の検出可能な尺度における、5%、10%、20%、好ましくは30%、40%、50%、最も好ましくは60%、70%、80%、90%、95%、もしくはそれより大きい増加または減少は、試験抗体が本方法における使用に適することを示す。

40

【0128】

阻害性抗T L R3抗体を評価する場合、抗体を有利に選択し、炎症または自己免疫に関連した任意のパラメータを変更しうる。例えば、抗体は、細胞内での活性化、特に炎症性サイトカインの産生を低下させるように選択しうる。細胞は、例えば炎症または自己免疫疾患を患う個体から得られる細胞であってもよい。

【0129】

抗体C D R配列

本発明の実施形態のいずれかの一態様では、抗体は、式（I）～（X X）から選択される各式に従うC D R1、2および／または3配列を有する重鎖および／または軽鎖を含みうる。本明細書中の任意の実施形態では、特定のH C D R1～3またはL C D R-1～3

50

は、式 (I) ~ (XX) の配列を有するものとして特定されうる。好ましい一実施形態では、本抗体は、3つのLCDRを含む軽鎖および3つのHCDRを含む重鎖を含む。場合により、軽鎖および／または重鎖可変領域のいずれかが、IgGタイプの免疫グロブリン定常領域、場合によってヒト定常領域、場合によってIgG1またはIgG4アイソタイプに融合される場合の抗体が提供される。

【0130】

一実施形態では、LCDR1は、式 (I) :

R-A-S-E-N-I-Y-S-Xaa₁-L-A (I) (配列番号61)、
(式中、Xaa₁は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₁は、Ser、TyrもしくはAsnであってもよい。) 10
に属する。

【0131】

一実施形態では、LCDR2は、式 (II) :

Xaa₂-A-K-T-L-A-E (II) (配列番号62)
(式中、Xaa₂は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₂は、AsnもしくはTyrであってもよい。) 20
に属する。

【0132】

一実施形態では、LCDR3は、式 (III) :

Q-H-H-Y-G-T-P-Xaa₃-T (III) (配列番号63) 20
(式中、Xaa₃は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₃は、Tyr、Phe、Proであってもよい。) 20
に属する。

【0133】

一実施形態では、LCDR1は、式 (IV) :

Xaa₄-A-S-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-
Xaa₁₁-Xaa₁₂ (IV) (配列番号64)
(式中、Xaa₄~Xaa₁₂は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₄は、Arg、SerもしくはLysであってもよく、および／または、Xaa₅は、Glu、SerもしくはGlnであってもよく、および／または、Xaa₆は、AsnもしくはSerであってもよく、および／または、Xaa₇は、IleもしくはValであってもよく、および／または、Xaa₈は、欠失、TyrもしくはArgであってもよく、および／または、Xaa₉は、SerもしくはThrであってもよく、および／または、Xaa₁₀は、Tyr、AsnもしくはSerであってもよく、および／または、Xaa₁₁は、Leu、MetもしくはValであってもよく、および／または、Xaa₁₂は、AlaもしくはPheであってもよい。) 30
に属する。

【0134】

一実施形態では、LCDR1は、式 (V) :

Xaa₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆-L-A-Xaa₁₇ (V) (配列番号65) 40
(式中、Xaa₁₃~Xaa₁₇は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₁₃は、Leu、AsnもしくはTyrであってもよく、および／または、Xaa₁₄は、AlaもしくはThrであってもよく、および／または、Xaa₁₅は、LysもしくはSerであってもよく、および／または、Xaa₁₆は、AsnもしくはThrであってもよく、および／または、Xaa₁₇は、GluもしくはSerであってもよい。) 40
に属する。

【0135】

一実施形態では、LCDR2は、式 (VI) :

50

X a a₁₈ - A - X a a₁₉ - X a a₂₀ - X a a₂₁ - X a a₂₂ - X a a₂₃ (V I)
(配列番号 66)

(式中、X a a₁₉ ~ X a a₂₃ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、X a a₁₈ は、T y r、A s nもしくはL e uであってもよく、および／または、X a a₁₉ は、S e rもしくはL y sであってもよく、および／または、X a a₂₀ は、A s nもしくはT h rであってもよく、および／または、X a a₂₁ は、L e uもしくはA r gであってもよく、および／または、X a a₂₂ は、A l aもしくはH i sであってもよく、および／または、X a a₂₃ は、T h rもしくはG l uであってもよい。)

に属する。

10

【0136】

一実施形態では、L C D R 2 は、式 (V I I) :

L - X a a₂₄ - S - N - X a a₂₅ - X a a₂₆ - X a a₂₇ (V I I) (配列番号 67)

(式中、X a a₂₄ ~ X a a₂₇ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、X a a₂₄ は、T h rもしくはA l aであってもよく、および／または、X a a₂₅ は、L e uもしくはA r gであってもよく、および／または、X a a₂₆ は、A l aもしくはH i sであってもよく、および／または、X a a₂₇ は、S e rもしくはT h rであってもよい。)

に属する。

20

【0137】

一実施形態では、L C D R 3 は、式 (V I I I) :

Q - X a a₂₈ - X a a₂₉ - X a a₃₀ - G - X a a₃₁ - P - X a a₃₂ - T (V I I I) (配列番号 68)

(式中、X a a₂₈ ~ X a a₃₂ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、X a a₂₈ は、H i sもしくはG l nであってもよく、および／または、X a a₂₉ は、H i sもしくはT r pであってもよく、および／または、X a a₃₀ は、T y rもしくはT h rであってもよく、および／または、X a a₃₁ は、T h rもしくはA s nであってもよく、および／または、X a a₃₂ は、T y r、P h eもしくはP r oであってもよい。)

に属する。

30

【0138】

一実施形態では、L C D R 3 は、式 (I X) :

X a a₃₃ - X a a₃₄ - H - X a a₃₅ - X a a₃₆ - X a a₃₇ - P - X a a₃₈ - T (I X) (配列番号 69)

(式中、X a a₃₃ ~ X a a₃₈ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、X a a₃₃ は、G l nもしくはL e uであってもよく、および／または、X a a₃₄ は、H i sもしくはG l nであってもよく、および／または、X a a₃₅ は、T r pもしくはT y rであってもよく、および／または、X a a₃₆ は、A s nもしくはG l yであってもよく、および／または、X a a₃₇ は、T y rもしくはT h rであってもよく、および／または、X a a₃₈ は、T y r、P h eもしくはP r oであってもよい。)

に属する。

40

【0139】

一実施形態では、L C D R 3 は、式 (X) :

X a a₃₉ - Q - X a a₄₀ - X a a₄₁ - X a a₄₂ - X a a₄₃ - P - X a a₄₄ - T (X) (配列番号 70)

(式中、X a a₄₀ ~ X a a₄₄ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、X a a₃₉ は、G l nもしくはL e uであってもよく、および／または、X a a₄₀ は、T r pもしくはH i sであってもよく、および／または、

50

Xaa₄₁は、ThrもしくはTrpであってもよく、および／または、Xaa₄₂は、GlyもしくはAsnであってもよく、および／または、Xaa₄₃は、AsnもしくはTyrであってもよく、および／または、Xaa₄₄は、ProもしくはTyrであってもよい。)

に属する。

【0140】

一実施形態では、HCDR1は、式(XI)：

G-Y-S-F-T-G-Y-Xaa₄₅-Xaa₄₆-H(XI) (配列番号71)

(式中、Xaa₄₅～Xaa₄₆は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₄₅は、PheもしくはTyrであってもよく、および／または、Xaa₄₆は、MetもしくはIleであってもよい。)

10

に属する。

【0141】

一実施形態では、HCDR1は、式(XII)：

G-Y-S-F-T-Xaa₄₇-Y-Xaa₄₈-M-H(XII) (配列番号72)

(式中、Xaa₄₇～Xaa₄₈は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₄₇は、GlyもしくはAlaであってもよく、および／または、Xaa₄₈は、PheもしくはTyrであってもよい。)

に属する。

20

【0142】

一実施形態では、HCDR1は、式(XIII)：

G-Y-S-F-T-Xaa₄₉-Y-Y-Xaa₅₀-H(XIII) (配列番号73)

(式中、Xaa₄₉～Xaa₅₀は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₄₉は、GlyもしくはAlaであってもよく、および／または、Xaa₅₀は、IleもしくはMetであってもよい。)

に属する。

【0143】

一実施形態では、HCDR1は、式(XIV)：

G-Y-Xaa₅₁-F-T-Xaa₅₂-Y-Xaa₅₃-Xaa₅₄-Xaa₅₅(XIV) (配列番号74)

30

(式中、Xaa₅₁～Xaa₅₅は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₅₁は、ValもしくはSerであってもよく、および／または、Xaa₅₂は、Thr、GlyもしくはAlaであってもよく、および／または、Xaa₅₃は、Ser、TyrもしくはPheであってもよく、および／または、Xaa₅₄は、IleもしくはMetであってもよく、および／または、Xaa₅₅は、TyrもしくはHisであってもよい。)

に属する。

【0144】

一実施形態では、HCDR1は、式(XV)：

40

G-Y-S-Xaa₅₆-T-Xaa₅₇-G-Y-Xaa₅₈-Xaa₅₉-H(XV) (配列番号75)

(式中、Xaa₅₆～Xaa₅₉は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₅₆は、IleもしくはPheであってもよく、および／または、Xaa₅₇は、欠失もしくはSerであってもよく、および／または、Xaa₅₈は、Ser、TyrもしくはPheであってもよく、および／または、Xaa₅₉は、Trp、IleもしくはMetであってもよい。)

に属する。

【0145】

一実施形態では、HCDR1は、式(XVI)：

50

G-Y-Xaa₆₀-Xaa₆₁-T-Xaa₆₂-Xaa₆₃-Y-S-Xaa₆₄-Xaa₆₅ (XVI) (配列番号76)

(式中、Xaa₆₀~Xaa₆₅は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₆₀は、ValもしくはSerであってもよく、および/または、Xaa₆₁は、PheもしくはIleであってもよく、および/または、Xaa₆₂は、ThrもしくはSerであってもよく、および/または、Xaa₆₃は、欠失もしくはGlyであってもよく、および/または、Xaa₆₄は、IleもしくはTrpであってもよく、および/または、Xaa₆₅は、TyrもしくはHisであってもよい。)

に属する。

10

【0146】

一実施形態では、HCDR2は、式(XVII)：

R-I-N-P-Y-Xaa₆₆-G-A-T-S-Xaa₆₇-N-Xaa₆₈-N-F-K-D (XVII) (配列番号77)

(式中、Xaa₆₆~Xaa₆₈は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₆₆は、AsnもしくはTyrであってもよく、および/または、Xaa₆₇は、欠失もしくはTyrであってもよく、および/または、Xaa₆₈は、ArgもしくはGlnであってもよい。)

に属する。

20

【0147】

一実施形態では、HCDR2は、式(XVIII)：

R-I-N-P-Y-Xaa₆₆-G-A-T-S-Y-N-Q-N-F-K-D (XVIII) (配列番号78)

(式中、Xaa₆₆は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₆₆は、AsnもしくはTyrであってもよい。)

に属する。

【0148】

一実施形態では、HCDR2は、式(IX)：

R-I-N-P-Y-N-G-A-T-S-Y-N-Xaa₆₈-N-F-K-D (IX) (配列番号79)

(式中、Xaa₆₈は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₆₈は、ArgもしくはGlnであってもよい。)

に属する。

30

【0149】

一実施形態では、HCDR2は、式(XX)：

Y-I-Xaa₆₉-Xaa₇₀-Y-Xaa₇₁-G-Xaa₇₂-T-Xaa₇₃-Y-N-Xaa₇₄-Xaa₇₅-Xaa₇₆-Xaa₇₇-Xaa₇₈ (XX) (配列番号80)

(式中、Xaa₆₉~Xaa₇₈は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₆₉は、AspもしくはHisであってもよく、および/または、Xaa₇₀は、欠失もしくはProであってもよく、および/または、Xaa₇₁は、SerもしくはAsnであってもよく、および/または、Xaa₇₂は、IleもしくはAspであってもよく、および/または、Xaa₇₃は、SerもしくはAsnであってもよく、および/または、Xaa₇₄は、GlnもしくはProであってもよく、および/または、Xaa₇₅は、LysもしくはSerであってもよく、および/または、Xaa₇₆は、PheもしくはLeuであってもよく、および/または、Xaa₇₇は、LysもしくはArgであってもよく、および/または、Xaa₇₈は、GlyもしくはSerであってもよい。)

に属する。

40

【0150】

50

一実施形態では、HCDR2は、式(XXI)：

$Xaa_{79} - I - Xaa_{80} - Xaa_{81} - Y - Xaa_{82} - G - Xaa_{83} - T - Xaa_{84} - Xaa_{85} - N - Xaa_{86} - Xaa_{87} - Xaa_{88} - Xaa_{89} - Xaa_{90}$ (XXI) (配列番号81)

(式中、 $Xaa_{79} \sim Xaa_{90}$ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、 Xaa_{79} は、ArgもしくはTyrであってもよく、および／または、 Xaa_{80} は、Asn、AspもしくはHisであってもよく、および／または、 Xaa_{81} は、欠失もしくはProであってもよく、および／または、 Xaa_{82} は、Tyr、AsnもしくはSerであってもよく、および／または、 Xaa_{83} は、Ile、AspもしくはAlaであってもよく、および／または、 Xaa_{84} は、SerもしくはAsnであってもよく、および／または、 Xaa_{85} は、欠失もしくはTyrであってもよく、および／または、 Xaa_{86} は、Pro、ArgもしくはGlnであってもよく、および／または、 Xaa_{87} は、Ser、LysもしくはAsnであってもよく、および／または、 Xaa_{88} は、PheもしくはLeuであってもよく、および／または、 Xaa_{89} は、LysもしくはArgであってもよく、および／または、 Xaa_{90} は、AspもしくはGlyであってもよい。)

に属する。

【0151】

一実施形態では、HCDR3は、式(XXII)：

$Xaa_{91} - Xaa_{92} - G - Xaa_{93} - Xaa_{94} - Y - Xaa_{95} - F - D - Y$ (XXII) (配列番号82)

(式中、 $Xaa_{91} \sim Xaa_{95}$ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、 Xaa_{91} は、AspもしくはSerであってもよく、および／または、 Xaa_{92} は、AspもしくはGlyであってもよく、および／または、 Xaa_{93} は、GlyもしくはAsnであってもよく、および／または、 Xaa_{94} は、AsnもしくはThrであってもよく、および／または、 Xaa_{95} は、Proもしくは欠失であってもよい。)

に属する。

【0152】

一実施形態では、HCDR3は、式(XXIII)：

$Xaa_{96} - Xaa_{97} - Xaa_{98} - Xaa_{99} - Xaa_{100} - Y - Xaa_{101} - Xaa_{102} - D - Y$ (XXIII) (配列番号83)

(式中、 $Xaa_{96} \sim Xaa_{102}$ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、 Xaa_{96} は、SもしくはDであってもよく、および／または、 Xaa_{97} は、G、TDであってもよく、および／または、 Xaa_{98} は、G、Kもしくは欠失であってもよく、および／または、 Xaa_{99} は、G、L、Nもしくは欠失であってもよく、および／または、 Xaa_{100} は、Y、T、G、Nであってもよく、および／または、 Xaa_{101} は、P、Gもしくは欠失であってもよく、および／または、 Xaa_{102} は、M、FもしくはLであってもよい。)

に属する。

【0153】

一実施形態では、HCDR3は、式(XXIV)：

$Xaa_{103} - Xaa_{104} - Xaa_{105} - Xaa_{106} - Xaa_{107} - Xaa_{108} - Xaa_{109} - F - D - Y$ (XXIV) (配列番号84)

(式中、 $Xaa_{103} \sim Xaa_{109}$ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、 Xaa_{103} は、Asp、Ser、Gluであってもよく、および／または、 Xaa_{104} は、AspもしくはGlyであってもよく、および／または、 Xaa_{105} は、GlyもしくはAsnであってもよく、および／または、 Xaa_{106} は、Asn、TyrもしくはGlyであってもよく、および／または、 Xaa_{107} は、Asn、ThrもしくはTyrであってもよく、および／または、 Xaa_{108}

10

20

30

40

50

₈ は、TyrもしくはGlyであってもよく、および／または、Xaa₁₀₉ は、Tyr、Proもしくは欠失であってもよい。) に属する。

【0154】

一実施形態では、HCDR3は、式 (XXV) :

Xaa₁₁₀ - G - Xaa₁₁₁ - Xaa₁₁₂ - Y - Xaa₁₁₃ - Xaa₁₁₄ - Xaa₁₁₅ - D - Y (XXV) (配列番号85)

(式中、Xaa₁₁₀ ~ Xaa₁₁₅ は、保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であってもよく、好ましくは、Xaa₁₁₀ は、GluもしくはAspであってもよく、および／または、Xaa₁₁₁ は、Asnもしくは欠失であってもよく、および／または、Xaa₁₁₂ は、Tyrもしくは欠失であってもよく、および／または、Xaa₁₁₃ は、TyrもしくはGlyであってもよく、および／または、Xaa₁₁₄ は、TyrもしくはGlyであってもよく、および／または、Xaa₁₁₅ は、MetもしくはPheであってもよい。)

に属する。

【0155】

一実施形態では、本発明の抗体は、

a 配列番号61、64および65から選択される軽鎖CDR1 (LCDR1) アミノ酸配列；および／または

b 配列番号62、66および67から選択される軽鎖CDR2 (LCDR2) アミノ酸配列；および／または

c 配列番号63、68、69および70から選択される軽鎖CDR3 (LCDR3) アミノ酸配列を含む軽鎖を含みうる。

【0156】

一実施形態では、本発明の抗体は、

a 配列番号71 ~ 76から選択される重鎖CDR1 (HCDR1) アミノ酸配列；および／または

b 配列番号77 ~ 81から選択される重鎖CDR2 (HCDR2) アミノ酸配列；および／または

c 配列番号82 ~ 85から選択される重鎖CDR3 (HCDR3) アミノ酸配列を含む重鎖を含みうる。

【0157】

抗体29H3

細胞産生抗体29H3は、登録番号I-4187下でCNCMに寄託されており、抗体29H3はまた、配列決定されている。重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号10として挙げられ、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号11として挙げられる。重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸配列が、それぞれ配列番号53および54として挙げられる。一実施形態では、本発明は、モノクローナル抗体29H3と本質的に同じエピトープまたは決定基に結合する抗体を提供し、場合により、本抗体は、抗体29H3の抗原結合領域を含む。本明細書中の実施形態のいずれかにおいては、抗体29H3は、それをコードするそのアミノ酸配列および／または核酸配列によって特徴づけられうる。好ましい一実施形態では、モノクローナル抗体は、29H3のFabまたはF(ab')₂部分を含む。また、29H3の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体が提供される。一実施形態によると、モノクローナル抗体は、29H3の重鎖可変領域の3つのCDRを含む。また、29H3の可変の軽鎖可変領域または29H3の軽鎖可変領域の1つ、2つ、もしくは3つのCDRをさらに含むモノクローナル抗体が提供される。場合により、任意の1つ以上の前記軽鎖または重鎖CDRは、1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのアミノ酸修飾 (例えば、置換、挿入または欠失) を含む。場合により、抗体29H3の抗原結合領域の一部もしくは全部を含む軽鎖および／または重鎖可変領域のいずれかが、IgGタ

10

20

30

40

50

イプの免疫グロブリン定常領域、場合によってヒト定常領域、場合によって I g G 1 もしくは I g G 4 アイソタイプに融合される場合の抗体が提供される。別の好ましい実施形態では、抗体は、29H3である。

【0158】

別の態様では、本発明は、抗体をコードする精製ポリペプチドを提供し、ここで抗体は、配列番号12で示されるアミノ酸配列を含むVHCDR1領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号13で示されるアミノ酸配列を含むVHCDR2領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号14で示されるアミノ酸配列を含むVHCDR3領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号15で示されるアミノ酸配列を含むVLCDR1領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号16で示されるアミノ酸配列を含むVLCDR2領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；および／または配列番号17で示されるアミノ酸配列を含むVLCDR3領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）を含む。

10

【0159】

さらに別の態様では、本発明は、重鎖および／または軽鎖（それぞれ少なくとも3つのCDRを有する）を含む抗体を提供し、ここで少なくとも3つのCDRのうちの1つ、2つ、もしくは3つは、重鎖および軽鎖の各々に対する配列番号12～14および15～17の配列を有し、またここで抗体は酸性条件下でTLR3に特異的に結合する。

20

【0160】

別の態様では、本発明は、

a 配列番号10の重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

b 配列番号11の軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

c 配列番号10の重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；および配列番号11の軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

30

d 配列番号12、13および14で示される重鎖CDR1、2および3（HCDR1、HCDR2、HCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

e 配列番号15、16および17でそれぞれ示される軽鎖CDR1、2および3（LCDR1、LCDR2、LCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

f 配列番号12、13および14で示される重鎖CDR1、2および3（HCDR1、HCDR2、HCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換可能である）；および配列番号15、16および17で示される軽鎖CDR1、2および3（LCDR1、LCDR2、LCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

40

g 配列番号10のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

h 配列番号11のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である軽鎖可変領域（ここでこれらのアミ

50

ノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい)

を含むヒト T L R 3 に結合する抗体を提供する。

【0161】

本明細書中の実施形態のいずれかの別の態様では、重鎖および軽鎖の C D R 1、2 および 3 のいずれかは、特定の C D R または C D R セット (対応する配列番号で列挙される) と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90% もしくは 95% の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有するものとして特徴づけられうる。

【0162】

別の態様では、本発明は、T L R 3 との結合において、上記の (a) ~ (h) のモノクローナル抗体と競合する抗体を提供する。

【0163】

抗体 31C3

細胞産生抗体 31C3 は、登録番号 I-4186 下で C N C M に寄託されており、抗体 31C3 はまた、配列決定されている。重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 2 として挙げられ、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 3 として挙げられる。重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸配列が、それぞれ配列番号 51 および 52 で挙げられる。特定の実施形態では、本発明は、モノクローナル抗体 31C3 と本質的に同じエピトープまたは決定基に結合する抗体を提供し、場合により、本抗体は、抗体 31C3 の抗原結合領域を含む。本明細書中の実施形態のいずれかにおいては、抗体 31C3 は、それをコードするそのアミノ酸配列および／または核酸配列によって特徴づけられうる。好ましい一実施形態では、モノクローナル抗体は、31C3 の F a b または F (a b ')₂ 部分を含む。また、31C3 の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体が提供される。一実施形態によると、モノクローナル抗体は、31C3 の重鎖可変領域の 3 つの C D R を含む。また、31C3 の可変の軽鎖可変領域または 31C3 の軽鎖可変領域の 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの C D R をさらに含むモノクローナル抗体が提供される。場合により、任意の 1 つ以上の前記軽鎖または重鎖 C D R は、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、もしくは 5 つのアミノ酸修飾 (例えば、置換、挿入または欠失) を含む。場合により、抗体 31C3 の抗原結合領域の一部もしくは全部を含む軽鎖および／または重鎖可変領域のいずれかが、I g G タイプの免疫グロブリン定常領域、場合によってヒト定常領域、場合によってヒト I g G 1 もしくは I g G 4 アイソタイプに融合される場合の抗体が提供される。別の好ましい実施形態では、抗体は、31C3 である。

【0164】

別の態様では、本発明は、抗体をコードする精製ポリペプチドを提供し、ここで抗体は、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を含む V H C D R 1 領域 (ここでこれらのアミノ酸の 1 つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; 配列番号 5 で示されるアミノ酸配列を含む V H C D R 2 領域 (ここでこれらのアミノ酸の 1 つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; 配列番号 6 で示されるアミノ酸配列を含む V H C D R 3 領域 (ここでこれらのアミノ酸の 1 つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列を含む V L C D R 1 領域 (ここでこれらのアミノ酸の 1 つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; 配列番号 8 で示されるアミノ酸配列を含む V L C D R 2 領域 (ここでこれらのアミノ酸の 1 つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を含む V L C D R 3 領域 (ここでこれらのアミノ酸の 1 つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) を含む。

【0165】

さらに別の態様では、本発明は、重鎖および／または軽鎖 (それぞれ少なくとも 3 つの C D R を有する) を含む抗体を提供し、ここで少なくとも 3 つの C D R のうちの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つは、重鎖および軽鎖の各々に対する配列番号 4 ~ 6 および 7 ~ 9 の配列を有し、またここで抗体は酸性条件下で T L R 3 に特異的に結合する。

【0166】

別の態様では、本発明は、

a 配列番号2の重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されている）；または

b 配列番号3の軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されている）；または

c 配列番号2の重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されている）；および配列番号3の軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されている）；または

10

d 配列番号4および5で示される重鎖CDR1および2（HCDR1、HCDR2、）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されている）、場合により、ここで重鎖は、配列番号4、5および6で示されるCDR1、2および3（HCDR1、HCDR2、HCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されている）；または

e 配列番号7、8および9で示される軽鎖CDR1、2および3（LCDR1、LCDR2、LCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されている）；または

f 配列番号4、5および6で示される重鎖CDR1、2および3（HCDR1、HCDR2、HCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は、異なるアミノ酸によって置換されている）；および配列番号7、8および9で示される軽鎖CDR1、2および3（LCDR1、LCDR2、LCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されている）；または

20

g 配列番号2のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されている）；または

h 配列番号3のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されている）

30

を含むヒトTLR3に結合する抗体を提供する。

【0167】

本明細書中の実施形態のいずれかの別の態様では、重鎖および軽鎖のCDR1、2および3のいずれかは、特定のCDRまたはCDRセット（対応する配列番号で列挙される）と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有するものとして特徴づけられる。

【0168】

40

別の態様では、本発明は、TLR3との結合において、上記の（a）～（h）のモノクローナル抗体と競合する抗体を提供する。

【0169】

抗体23C8

抗体23C8は、配列決定されている。重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号26として挙げられ、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号27として挙げられる。重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸配列が、それぞれ配列番号57および58で挙げられる。特定の実施形態では、本発明は、モノクローナル抗体23C8と本質的に同じエピトープまたは決定基に結合する抗体を提供し、場合により、本抗体は、抗体23C8の抗原結合領域を含む。本明細書中の実施形態のいずれかにおいては、抗体23C8は、それをコ

50

ードするそのアミノ酸配列および／または核酸配列によって特徴づけられうる。好ましい一実施形態では、モノクローナル抗体は、23C8のFabまたはF(ab')₂部分を含む。また、23C8の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体が提供される。一実施形態によると、モノクローナル抗体は、23C8の重鎖可変領域の3つのCDRを含む。また、23C8の可変の軽鎖可変領域または23C8の軽鎖可変領域の1つ、2つ、もしくは3つのCDRをさらに含むモノクローナル抗体が提供される。場合により、任意の1つ以上の前記軽鎖または重鎖CDRは、1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのアミノ酸修飾（例えば、置換、挿入または欠失）を含みうる。場合により、抗体23C8の抗原結合領域の一部もしくは全部を含む軽鎖および／または重鎖可変領域のいずれかが、IgGタイプの免疫グロブリン定常領域、場合によってヒト定常領域、場合によってヒトIgG 1もしくはIgG 4アイソタイプに融合される場合の抗体が提供される。別の好ましい実施形態では、抗体は、23C8である。

【0170】

別の態様では、本発明は、抗体をコードする精製ポリペプチドを提供し、ここで抗体は、配列番号28で示されるアミノ酸配列を含むVHCDR1領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号29で示されるアミノ酸配列を含むVHCDR2領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号30で示されるアミノ酸配列を含むVHCDR3領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号31で示されるアミノ酸配列を含むVLCDR1領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号32で示されるアミノ酸配列を含むVLCDR2領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号33で示されるアミノ酸配列を含むVLCDR3領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）を含む。

【0171】

さらに別の態様では、本発明は、重鎖および／または軽鎖（それぞれ少なくとも3つのCDRを有する）を含む抗体を提供し、ここで少なくとも3つのCDRのうちの1つ、2つ、もしくは3つは、重鎖および軽鎖の各々に対する配列番号28～30および31～33の配列を有し、またここで抗体は酸性条件下でTLR3に特異的に結合する。

【0172】

別の態様では、本発明は、

a 配列番号26の重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

b 配列番号27の軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

c 配列番号26の重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；および配列番号27の軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

d 配列番号28および29で示される重鎖CDR1および2（HCDR1、HCDR2、）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；場合により、ここで重鎖は、配列番号28、29および30で示されるCDR1、2および3（HCDR1、HCDR2、HCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

e 配列番号31、32および33で示される軽鎖CDR1、2および3（LCDR1、LCDR2、LCDR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

f 配列番号28、29および30で示される重鎖CDR1、2および3（HCDR1

、H C D R 2、H C D R 3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；および配列番号31、32および33で示される軽鎖C D R 1、2および3（L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

g 配列番号26のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

h 配列番号27のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）

を含むヒトT L R 3に結合する抗体を提供する。

【0173】

本明細書中の実施形態のいずれかの別の態様では、重鎖および軽鎖のC D R 1、2および3のいずれかは、特定のC D RまたはC D Rセット（対応する配列番号で列挙される）と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有するものとして特徴づけられうる。

【0174】

別の態様では、本発明は、T L R 3との結合において、上記の（a）～（h）のモノクローナル抗体と競合する抗体を提供する。

【0175】

抗体28F11

抗体28F11は、配列決定されている。重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号18として挙げられ、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号19として挙げられる。重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸配列は、それぞれ配列番号55および56で挙げられる。特定の実施形態では、本発明は、モノクローナル抗体28F11と本質的に同じエピトープまたは決定基に結合する抗体を提供し、場合により、本抗体は、抗体28F11の抗原結合領域を含む。本明細書中の実施形態のいずれかにおいては、抗体28F11は、それをコードするそのアミノ酸配列および／または核酸配列によって特徴づけられうる。好ましい一実施形態では、モノクローナル抗体は、28F11のF a bまたはF（a b'）2部分を含む。また、28F11の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体が提供される。一実施形態によると、モノクローナル抗体は、28F11の重鎖可変領域の3つのC D Rを含む。また、28F11の可変の軽鎖可変領域または28F11の軽鎖可変領域の1つ、2つ、もしくは3つのC D Rをさらに含むモノクローナル抗体が提供される。場合により、任意の1つ以上の前記軽鎖または重鎖C D Rは、1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのアミノ酸修飾（例えば、置換、挿入または欠失）を含みうる。場合により、抗体28F11の抗原結合領域の一部もしくは全部を含む軽鎖および／または重鎖可変領域のいずれかが、I g Gタイプの免疫グロブリン定常領域、場合によってヒト定常領域、場合によってヒトI g G 1もしくはI g G 4アイソタイプに融合される場合の抗体が提供される。別の好ましい実施形態では、抗体は、28F11である。

【0176】

別の態様では、本発明は、抗体をコードする精製ポリペプチドを提供し、ここで抗体は、配列番号20で示されるアミノ酸配列を含むV H C D R 1領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号21で示されるアミノ酸配列を含むV H C D R 2領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号22で示されるアミノ酸配列を含むV H C D R 3領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号23で示されるアミノ酸配列を含むV L C D R 1領域（ここで

これらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; 配列番号24で示されるアミノ酸配列を含むV L C D R 2領域(ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; 配列番号25で示されるアミノ酸配列を含むV L C D R 3領域(ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい)を含む。

【0177】

さらに別の態様では、本発明は、重鎖および／または軽鎖(それぞれ少なくとも3つのC D Rを有する)を含む抗体を提供し、ここで少なくとも3つのC D Rのうちの1つ、2つ、もしくは3つは、重鎖および軽鎖の各々に対する配列番号20～22および23～25の配列を有し、またここで抗体は酸性条件下でT L R 3に特異的に結合する。

10

【0178】

別の態様では、本発明は、

a 配列番号18の重鎖可変領域(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; または

b 配列番号19の軽鎖可変領域(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; または

c 配列番号18の重鎖可変領域(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; および配列番号19の軽鎖可変領域(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; または

20

d 配列番号20および21で示される重鎖C D R 1および2(H C D R 1、H C D R 2、)アミノ酸配列(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; 場合により、ここで重鎖は、配列番号20、21および22で示されるC D R 1、2および3(H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3)アミノ酸配列(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; または

e 配列番号23、24および25で示される軽鎖C D R 1、2および3(L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3)アミノ酸配列(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; または

f 配列番号20、21および22で示される重鎖C D R 1、2および3(H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3)アミノ酸配列(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; および配列番号23、24および25で示される軽鎖C D R 1、2および3(L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3)アミノ酸配列(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; または

30

g 配列番号18のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である重鎖可変領域(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい) ; または

h 配列番号19のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である軽鎖可変領域(ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい)

40

を含むヒトT L R 3に結合する抗体を提供する。

【0179】

本明細書中の実施形態のいずれかの別の態様では、重鎖および軽鎖のC D R 1、2および3のいずれかは、特定のC D RまたはC D Rセット(対応する配列番号で列挙される)と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有するものとして特徴づけられうる。

【0180】

50

別の態様では、本発明は、T L R 3との結合において、上記の（a）～（h）のモノクローナル抗体と競合する抗体を提供する。

【0181】

抗体34A3

抗体34A3は、配列決定されている。重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号34として挙げられ、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号35として挙げられる。重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸配列は、それぞれ配列番号59および60で挙げられる。特定の実施形態では、本発明は、モノクローナル抗体34A3と本質的に同じエピトープまたは決定基に結合する抗体を提供し、場合により、本抗体は、抗体34A3の抗原結合領域を含む。本明細書中の実施形態のいずれかにおいては、抗体34A3は、それをコードするそのアミノ酸配列および／または核酸配列によって特徴づけられうる。好ましい一実施形態では、モノクローナル抗体は、34A3のFabまたはF(ab')₂部分を含む。また、34A3の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体が提供される。一実施形態によると、モノクローナル抗体は、34A3の重鎖可変領域の3つのCDRを含む。また、34A3の可変の軽鎖可変領域または34A3の軽鎖可変領域の1つ、2つ、もしくは3つのCDRをさらに含むモノクローナル抗体が提供される。場合により、任意の1つ以上の前記軽鎖または重鎖CDRは、1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのアミノ酸修飾（例えば、置換、挿入または欠失）を含みうる。場合により、抗体34A3の抗原結合領域の一部もしくは全部を含む軽鎖および／または重鎖可変領域のいずれかが、IgGタイプの免疫グロブリン定常領域、場合によってヒト定常領域、場合によってヒトIgG1もしくはIgG4アイソタイプに融合される場合の抗体が提供される。別の好ましい実施形態では、抗体は、34A3である。

【0182】

別の態様では、本発明は、抗体をコードする精製ポリペプチドを提供し、ここで抗体は、配列番号36で示されるアミノ酸配列を含むVHCDR1領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号37で示されるアミノ酸配列を含むVHCDR2領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号38で示されるアミノ酸配列を含むVHCDR3領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号39で示されるアミノ酸配列を含むVLCDR1領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号40で示されるアミノ酸配列を含むVLCDR2領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；配列番号41で示されるアミノ酸配列を含むVLCDR3領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）を含む。

【0183】

さらに別の態様では、本発明は、重鎖および／または軽鎖（それぞれ少なくとも3つのCDRを有する）を含む抗体を提供し、ここで少なくとも3つのCDRのうちの1つ、2つ、もしくは3つは、重鎖および軽鎖の各々に対する配列番号36～38および29～41の配列を有し、またここで抗体は酸性条件下でT L R 3に特異的に結合する。

【0184】

別の態様では、本発明は、

a 配列番号34の重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

b 配列番号35の軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

c 配列番号34の重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；および配列番号35の軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

d 配列番号36、37および38で示される重鎖CDR1、2および3（HC DR1、HC DR2、HC DR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

e 配列番号39、40および41で示される軽鎖CDR1、2および3（LC DR1、LC DR2、LC DR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ以上は異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

f 配列番号36、37および38で示される重鎖CDR1、2および3（HC DR1、HC DR2、HC DR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；および配列番号39、40および41で示される軽鎖CDR1、2および3（LC DR1、LC DR2、LC DR3）アミノ酸配列（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

g 配列番号34のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である重鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）；または

h 配列番号35のアミノ酸配列を有する可変領域に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%同一である軽鎖可変領域（ここでこれらのアミノ酸の1つ、2つ、3つもしくはそれより多くは、異なるアミノ酸によって置換されていてもよい）

を含むヒトTLR3に結合する抗体を提供する。

【0185】

本明細書中の実施形態のいずれかの別の態様では、重鎖および軽鎖のCDR1、2および3のいずれかは、特定のCDRまたはCDRセット（対応する配列番号で列挙される）と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有するものとして特徴づけられうる。

【0186】

別の態様では、本発明は、TLR3との結合において、上記の（a）～（h）のモノクローナル抗体と競合する抗体を提供する。

【0187】

本発明の抗体、例えば、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3のいずれかにおいては、特定の可変領域およびCDR配列は、保存的配列修飾を含みうる。保存的配列修飾は、アミノ酸配列を有する抗体の結合特性に対して有意に作用または改変しないアミノ酸修飾を示す。かかる保存的修飾は、アミノ酸置換、付加および欠失を含む。修飾は、当該技術分野で既知の標準的技術、例えば部位特異的突然変異誘発およびPCR介在性突然変異誘発により、本発明の抗体に導入されうる。保存的アミノ酸置換は、典型的には、あるアミノ酸残基が、類似した物理化学的特性を伴う側鎖を有するアミノ酸残基と置換される場合である。特定の可変領域およびCDR配列は、1つ、2つ、3つ、4つもしくはそれより多いアミノ酸挿入、欠失または置換を含みうる。置換がなされる場合、好ましい置換は、保存的修飾となる。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、荷電していない極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、β分岐側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族性側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。したがって、本発明の抗体のCDR領域内の1つ以上のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリー由来の他のアミノ酸残基と置換可能であり、また改変抗体は、保持された機能（すなわち本明細書中に示される特性）について、本明細書中に記載のアッセイを用いて試験可能である

。

【0188】

用語「同一性」または「同一である」は、2つ以上のポリペプチドの配列間において使用される場合、2つ以上のアミノ酸残基の文字列間でのマッチの数によって判定された、ポリペプチド間の配列の関連性の程度を示す。「同一性」は、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち「アルゴリズム」）によって対処されるギャップアラインメント（存在する場合）を伴う2つ以上の配列の小さい方の中での同一のマッチのパーセントの尺度である。関連するポリペプチドの同一性は、既知の方法によって容易に計算される。かかる方法は、限定はされないが、「Computational Molecular Biology」、Lesk A. M. 編、Oxford University Press、New York、1988年；「Biocomputing: Informatics and Genome Projects」、Smith D. W. 編、Academic Press、New York、1993年；「Computer Analysis of Sequence Data, Part 1」、Griffin A. M.、およびGriffin H. G. 編、Humana Press、New Jersey、1994年；「Sequence Analysis in Molecular Biology」、Von Heinje G.、Academic Press、1987年；「Sequence Analysis Primer」、Gribskov M. およびDevereux J. 編、M. Stockton Press、New York、1991年；およびCarilloら、SIAM J. Applied Math. 48、1073頁（1988年）において記載のものを含む。

10

20

【0189】

同一性を判定するための好ましい方法は、試験される配列間で最大マッチを与えるように設計される。同一性を判定するための方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記述されている。2つの配列間の同一性を判定するための好ましいコンピュータプログラムの方法は、GAPを含むGCGプログラムパッケージを含む（Devereuxら、Nucl. Acid. Res. 12、387頁（1984年）；Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.）、BLASTP、BLASTNおよびFASTA（Altschulら、J. Mol. Biol. 215、403-410頁（1990年））。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他のソース（「BLAST Manual」、Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894；Altschulら、上記）から公的に利用可能である。また、周知のSmith Watermanアルゴリズムを使用し、同一性を判定してもよい。

30

【0190】

AbM (Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアの定義)、KabataおよびChothiaの定義システムによる、本発明に従う抗体のCDRの配列は、下の表A中にまとめられている。本明細書中に記載のアミノ酸配列は、Abm、KabataおよびChothiaの番号付けシステムに従って番号付けされる。任意の好適な番号付けシステムが、任意の他の表示の不在で、指定されたCDR領域に対して使用可能である一方、本明細書中で使用される番号付けはAbmである。かかる番号付けは、次の表示、すなわち、CDR-L1：開始：約24の残基、前の残基：通常はCys、後の残基：通常はTrp（典型的には、Trp-Tyr-Glnだけでなく、Trp-Leu-Gln、Trp-Phe-Gln、Trp-Tyr-Leu）、長さ：10~17の残基；CDR-L2：開始：L1の末端の後に通常は16の残基、前の残基：一般にIle-Tyr（それだけでなく、Val-Tyr、Ile-Lys、Ile-Phe）、長さ：通常は7つの残基；CDR-L3、開始：L2の末端の後に通常は33の残基、前の残基：通常はCys、後の残基：通常はPhe-Gly-Xaa-Gly、長

40

50

さ：7～11の残基；CDR-H1、開始：約26の残基（Cysの後に通常は4つ）（Chothia／AbM定義、Kabat定義では5つ後の残基から開始する）、前の残基：通常はCys-Xaa-Xaa-Xaa、後の残基：通常はTrp（典型的には、Trp-、Valだけでなく、Trp-Ile、Trp-Ala）、長さ：10～12の残基（AbM定義、Chothia定義では最後4つの残基が除外される）；CDR-H2、開始：CDR-H1のKabat／AbM定義の末端の後に通常は15の残基、前の残基：典型的にはLeu-Glu-Trp-Ile-Gly（しかし、多数の変化、Lys／Arg-Leu／Ile／Val／Phe／Thr／Ala-Thr／Ser／Ile／Ala後の残基）、長さ：Kabat定義では16～19の残基；AbM（およびChothia）定義では、7つ前の残基で終了する；CDR-H3、開始：CDR-H2の末端の後に通常は33の残基（Cysの後に通常は2つ）、前の残基：通常はCys-Xaa-Xaa（典型的にはCys-Ala-Arg）、後の残基：通常はTrp-Gly-Xaa-Gly、長さ：3～25残基、を用いて確立されている。

10

【0191】

本発明に従う抗体の可変鎖の配列は下の表B中に列挙され、シグナルペプチド配列はイタリック体で表され、またCDRは太字で提供される。用語x／xは、2つの表示されるアミノ酸のいずれかが特定のアミノ酸残基に存在しうることを示し、例えば用語F／Sは、所与の位置でのアミノ酸がフェニルアラニンまたはセリンのいずれかでありうることを意味する。本明細書中の任意の実施形態では、VLまたは、VH配列は、シグナルペプチドまたはその任意の部分の有するかまたは有しないことに対し、特定化または番号付けされうる。

20

【0192】

一実施形態では、本発明の抗体は、ヒトまたはマウスIgG1アイソタイプである。別の実施形態では、本発明の抗体は、ヒトIgG4アイソタイプである。一実施形態では、本発明の抗体は、その結合および／または機能特性を保持する抗体断片である。

【0193】

【表 1】

表 A

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
23C8	Abm	28	GYSFTGYFMH	29	RINPYNGATS	30	DDGGNYFPDY
	Chotia		GYSFTG		RINPYNGATS		DDGGNYFPDY
	Kabat		GYFMH		RINPYNGATSYNQNF KD		DDGGNYFPDY
29H3	Abm	12	GYSITSGYSW H	13	YIHYSGITN	14	DGYYGMDY
	Chotia		GYSITSG		YIHYSGITN		DGYYGMDY
	Kabat		SGYSWH		YIHYSGITNYPNPSLRS		DGYYGMDY
28F11	Abm	20	GYSFTGYYYIH	21	RINPYYGAT	22	STKLGYLDY
	Chotia		GYSFTG		RINPYYGAT		STKLGYLDY
	Kabat		GYYYIH		RINPYYGATSNQNF D		STKLGYLDY
31C3	Abm	4	GYSFTAYYMH	5	RINPYNGATS	6	SGGNTYFDY
	Chotia		GYSFTA		RINPYNGATS		SGGNTYFDY
	Kabat		AYYMH		RINPYNGATSYNRNF KD		SGGNTYFDY
34A3	Abm	36	GYVFTTYSIY	37	YIDPYNGDTS	38	EGNYYGYFDY
	Chotia		GYVFTT		YIDPYNGDTS		EGNYYGYFDY
	Kabat		TYSIY		YIDPYNGDTSYNQKF KG		EGNYYGYFDY

10

20

30

【 0 1 9 4 】

【表 2】

表 B

抗体部分	配列 番号					
23C8 VL	27	MSVPTQVLGL SYLAWYQQKQ EDFGSYQCQH	LLLWLTGARC GKSPQLLVYY HYGTPYTFGG	DIQMTQSPAS AKTLAEGVPS GTKLEIK	LSASVGETVT RFGSGTGTQ	ITCRASENIY FSLKINSLQP
23C8 VH	26	MGWSWIFLFL YFMHWVKQSH ELHSLTSEDS	LSGTAGVLSE VKSLEWIGRI AVYYCVRDDG	VQLQQSGPEL NPYNGATSYN GNYPFDYWGQ	VKPGASVKIS QNFKDKASLT GTTTLTVS	CKASGYSTFG VDKSSSTSYM
28F11 VL	19	MSVPTQVLGL SNLAWYQQKQ EDFGSYQCQH	LLLWLTGARC GKSPQLLIYN HYGTPFTFGG	DIQMTQSPAS AKTLAEGVPS GTKLEIK	LSASVGETVT RFGSGSGTQ	ITCRASENIY YFLKINSLQP
28F11 VH	18	MGWSWIFLFL YYIHWVKQSH LHSLTSDDSA	LSGTAGVLSE VKSLEWIGRI VYYCARSTKL	VQLQQSGPEL NPYYGATSNQ GYLDYWGQGT	VKPGASVKIS NFKDKANLTV TLTVS	CKASGYSTFG DKSSSTAYME
29H3 VL	11	MDFQTQVFVF TSVAWYQQKP EDLADYFCLQ	VLLWLSGVDG GQSPKALIYL HWNYPYTFGG	DIVMTQSQKF ASNRHTGVDP GTKLEIK	MSTSVGDRVS RFTGSGSGTD	ITCKASQNVN FTLTVSNIQS
29H3 VH	10	MRVLILLCLF YSWHWIRQFL LNSVTEDTA	TAFPGILSDV GNKLEWMGYI TYYCARGYY	QLQESGPDV HYSGITNYP GMDYWGQGT	KPSQSLSLTC SLRSRISFTR VTVS	TVTGYSTSG DTSKNQFFLQ
31C3 VL	3	MSVPTQVLGL SSLAWYQQKQ F/SSLKINSLQP	LLLWLTGARC GKSPQLLVYN EDFGTYQCQH	DIQMTQSPAS AKTLAEGVPS HYGTPPTFGG	LSASVGETVT RFGSGSGTQ GTKLEIK	ITCRASENIY
31C3 VH	2	MGWSWIFLFL YYMHVVKQSH ELHSLTSEDS	LSGTAGVLSE VKSLEWIGRI AVYYCARSGG	VQLQQSGPEL NPYNGATSYN NTYFDYWGQ	VKPGASVKIS RNFKDKASLT TTLTVS	CKPSGYSTFA VDKSSSTAYM
34A3 VL	35	MDFQVQIFSF SYMFYQQKP EDAATYYCQQ	LLMSASVIMS RSSPKPWIYL WTGNPPTFGG	RQIVLTQSP TSNLAGVPA GTKLEIK	ALMSASPGEK RFGSGSGSTS	VTMTCASSSV YSLTISSMEA
34A3 VH	34	MEWRWIFLFL YSIYWVKQSH HLNSLTSEDS	LSGTTGVHSE GKSLEWIGYI TVYYCAREGN	IQLQQSGPEL DPYNGDTSYN YYGYFDYWGQ	VKPGASVKVS QKFKGKATLT GTTTLTVS	CKASGYVFTT VDKSSSTAYM

【0195】

下の表Cにまとめられるように、本発明に従う抗TLR3抗体の軽鎖および重鎖の配列決定により、かかる抗体の産生に關与する遺伝子再配列の同定が得られた（示される遺伝子配列は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi>で検索可能である）。図18Aおよび18Bは、軽鎖および重鎖の（PhylipのDrawtreeによって生成される）系統樹を示し、それは抗体28F11、31C3および23C8の間で相同性の程度が高いことを示す。

【0196】

10

20

30

40

【表 3】

表 C

	軽鎖		重鎖	
	V 遺伝子	J 遺伝子	V 遺伝子	J 遺伝子
29H3	VK 19-14	JK2	VH3 VH36-60.a1.85	JH4
	配列番号 42	配列番号 45	配列番号 46	配列番号 50
34A3	VK aq4 (VK)	JK2	VH1 VH J558.1	JH2
	配列番号 43	配列番号 45	配列番号 47	配列番号 49
23C8	VK 12-41 または 12-44	JK2	VH1 VH J558.2	JH2
	配列番号 44	配列番号 45	配列番号 48	配列番号 49
31C3	VK 12-41 または 12-44	JK2	VH1 VH J558.2	JH2
	配列番号 44	配列番号 45	配列番号 48	配列番号 49
28F11	VK 12-41 または 12-44	JK2	VH1 VH J558.2	JH2
	配列番号 44	配列番号 45	配列番号 48	配列番号 49

10

20

【0197】

下の表 D は、アミノ酸での、各抗体における異なる C D R 間での配列同一性の百分率を提供する。

【0198】

【表 4】

表 D

30

CDR VL

	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100.00	33.33	88.89	92.59	37.04
29H3		100.00	33.33	29.63	29.63
23C8			100.00	88.89	33.33
28F11				100.00	33.33
34A3					100.00

40

【0199】

【表 5】

CDR1 VL

	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100.00	45.45	90.91	90.91	27.27
29H3		100.00	45.45	27.27	27.27
23C8			100.00	90.91	27.27
28F11				100.00	36.36
34A3					100.00

10

CDR2 VL

	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100.00	14.29	85.71	100.00	28.57
29H3		100.00	14.29	14.29	42.86
23C8			100.00	85.71	28.57
28F11				100.00	28.57
34A3					100.00

20

CDR3 VL

	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100.00	33.33	88.89	85.71	33.33
29H3		100.00	44.44	27.27	22.22
23C8			100.00	88.89	44.44
28F11				100.00	44.44
34A3					100.00

30

CDR VH

	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100.00	39.47	78.38	70.27	50.00
29H3		100.00	44.74	39.47	39.47
23C8			100.00	70.27	52.63
28F11				100.00	47.37
34A3					100.00

40

【 0 2 0 0 】

【表 6】

CDR1 VH

	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100.00	54.55	80.00	80.00	45.45
29H3		100.00	63.64	63.64	45.45
23C8			100.00	80.00	45.45
28F11				100.00	54.55
34A3					100.00

10

CDR2 VH

	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100.00	35.29	94.12	82.35	64.71
29H3		100.00	35.29	29.41	35.29
23C8			100.00	88.24	70.59
28F11				100.00	58.82
34A3					100.00

20

CDR3 VH

	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100.00	40.00	50.00	44.44	40.00
29H3		100.00	40.00	30.00	40.00
23C8			100.00	30.00	30.00
28F11				100.00	20.00
34A3					100.00

30

【0201】

表Eは、L A L I G Nソフトウェアを使用し、各抗体についての異なるV Lおよび、V H（イタリック）ヌクレオチド配列間で計算されている同一性の百分率を提供する。

【0202】

【表 7】

表 E

VH VL	23C8	28F11	29H3	31C3	34A3
23C8	100	93.5	60.6	94.9	87.3
28F11	97.6	100	60.4	94.4	87.8
29H3	65.8	65.2	100	61.0	60.6
31C3	96.1	95.5	63.9	100	89.1
34A3	64.6	65.3	67.2	64.0	100

10

【0203】

表 F は、L A L I G N ソフトウェアを使用し、異なる V L および、V H (イタリック) アミノ酸配列間で計算されている同一性の百分率を提供する。

【0204】

【表 8】

表 F

VH VL	23C8	28F11	29H3	31C3	34A3
23C8	100	89.8	48.9	92.7	79.1
28F11	94.5	100	47.0	91.2	79.6
29H3	54.3	54.3	100	47.8	48.1
31C3	96.1	95.3	55.1	100	79.6
34A3	52.7	53.5	55.4	54.3	100

20

30

【0205】

本モノクローナル抗体の断片および誘導体

(他に指定されないかまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、本願中で使用される用語「抗体 (antibody)」または「抗体 (antibodies)」によって包含される) 本発明の抗体の断片および誘導体、好ましくは 31C3、29H3、23C8、28F11 もしくは 34A3 様抗体は、当該技術分野で既知の技術によって産生されうる。

「断片」は、無傷抗体の一部、一般に抗原結合部位または可変領域を含む。抗体断片の例として、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、および Fv 断片；二重特異性抗体；限定はされないが、(1) 一本鎖 Fv 分子、(2) 1つの軽鎖可変ドメインのみを有する一本鎖ポリペプチド、または軽鎖可変ドメインの3つのCDRを有するその断片(関連する重鎖部分を有しない)、および(3) 1つの重鎖可変領域のみを有する一本鎖ポリペプチド、または重鎖可変ドメインの3つのCDRを有するその断片(関連する軽鎖部分を有しない)を含む、隣接アミノ酸残基の1つの連続配列からなる一次構造を有するポリペプチドである任意の抗体断片(本明細書中で「一本鎖抗体断片」または「一本鎖ポリペプチド」と称される)；ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

40

【0206】

本抗体の断片は、標準的方法を用いて得ることができる。例えば、Fab または F(a

50

b') 2断片は、従来の技術に従い、単離抗体のプロテアーゼ消化によって産生されうる。免疫反応性断片を既知の方法を用いて修飾することで、例えば、インビボでクリアランスを遅延させ、断片がポリエチレングリコール(PEG)で修飾可能であるというより望ましい薬物動態学的特性を得ることが可能であることは理解されるであろう。PEGをFab'断片にカップリングし、部位特異的にコンジュゲートするための方法は、例えば、Leongら、16(3):106-119頁(2001年)およびDelgadoら、Br. J. Cancer 73(2):175-182頁(1996年)(それらの開示内容は参照により本明細書中に援用される)において記載されている。

【0207】

あるいは、本発明の抗体、好ましくは、31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3様抗体を産生するハイブリドーマのDNAは、本発明の断片をコードするように修飾されうる。次いで、修飾DNAは、発現ベクターに挿入され、適切な細胞を形質転換または形質移入するように使用され、次いで所望される断片を発現する。

【0208】

特定の実施形態では、本発明の抗体、好ましくは31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3様抗体を産生するハイブリドーマのDNAは、発現ベクターへの挿入前に、例えばヒト重鎖および軽鎖定常ドメインにおけるコード配列をそれに相異なる非ヒト配列の代わりに置換するか(例えば、Morrisonら、PNAS、6851頁(1984年))、または免疫グロブリンコード配列に、非免疫グロブリンポリペプチドにおけるコード配列の全部もしくは一部を共有結合させることにより、修飾されうる。そのようにして、「キメラ」または「ハイブリッド」抗体は、元の抗体の結合特異性を有するように調製される。典型的には、かかる非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインと置換される。

【0209】

したがって、別の実施形態によると、本発明の抗体、好ましくは31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3様抗体は、ヒト化される。本発明に従う抗体の「ヒト化」形態は、特異的なキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片(Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合部分配列など)であり、それはマウス免疫グロブリンに由来する最小配列を有する。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)由来の残基が元の抗体(ドナー抗体)のCDR由来の残基によって置換される一方、元の抗体の所望される特異性、親和性、および能力を維持する、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。

【0210】

いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されうる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体または輸入されたCDRもしくはフレームワーク配列のいずれにおいても見出されない残基を含みうる。これらの修飾は、抗体性能をさらに改良し、最適化するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、また典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含むことになり、ここでCDR領域の全部もしくは実質的に全部は、元の抗体のそれらに対応し、かつFR領域の全部もしくは実質的に全部は、ヒト免疫グロブリン共通配列のそれらに相当する。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを含むことになる。さらなる詳細については、Jonesら、Nature、321、522頁(1986年); Reichmannら、Nature、332、323頁(1988年); Presta、Curr. Op. Struct. Biol.、2、593頁(1992年); Verhoeyen et Science、239、1534頁; および米国特許第4,816,567号明細書(これらの全開示内容は、参照により本明細書中に援用される)を参照のこと。本発明の抗体をヒト化するための方法は、当該技術分野で周知である。

【0211】

ヒト化抗体の作製に使用されるべきヒト可変ドメイン(軽鎖および重鎖の双方)の選択

は、抗原性を低下させるために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット (best-fit)」法によると、本発明の抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングされる。次いで、マウスの場合に最も近いヒト配列は、ヒト化抗体のヒトフレームワーク (FR) として認められる (Simsら、J. Immunol. 151、2296頁 (1993年) ; ChothiaおよびLesk、J. Mol. 196、901頁)。別の方法では、軽鎖または重鎖の特定の亜群のすべてのヒト抗体の共通配列に由来する特定のフレームワークが使用される。同じフレームワークは、いくつかの異なるヒト化抗体に対して使用可能である (Carterら、PNAS 89、4285頁 (1992年) ; Prestaら J. Immunol.、51頁 (1993年))。

10

【0212】

抗体がTLR3受容体に対する高親和性および他の好ましい生物学的特性の保持によってヒト化されることはさらに重要である。この目標を達成するため、好ましい方法に従い、親およびヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列および様々な概念的ヒト化産物の分析プロセスにより、ヒト化抗体が調製される。三次元の免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり、当業者には周知である。選択される候補免疫グロブリン配列の考えられる三次元構造を図示し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の精査により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の推定される役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンのその抗原に対する結合能に影響を与える残基の分析が可能になる。このようにして、所望される抗体の特性、例えば標的抗原に対する親和性の増大が得られるように、FR残基が、共通および輸入配列から選択され、組み合わされうる。一般に、CDR残基は、抗原結合に影響を与えることに対し、直接かつ最も実質的に関与する。

20

【0213】

「ヒト化」モノクローナル抗体を作製する別の方法は、免疫用に使用されるマウスとしてXenomouse (Abgenix (Fremont, CA) を使用することである。Xenomouseは、その免疫グロブリン遺伝子が機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子によって置換されている、本発明に従うマウス宿主である。したがって、このマウスにより、またはこのマウスのB細胞から作製されたハイブリドーマにおいて産生される抗体は、既にヒト化されている。Xenomouseについては、米国特許第6, 162, 963号明細書 (その全体が参照により本明細書中に援用される) 中に記載されている。

30

【0214】

ヒト抗体はまた、様々な他の技術により、例えば免疫を目的として、ヒト抗体レパートリーを発現するように改変されている他のトランスジェニック動物を使用することにより (Jakobovitz et Nature 362 (1993年) 255)、またはファージディスプレイ法を用いた抗体レパートリーの選択により、産生されうる。かかる技術は、当業者に既知であり、本願中に開示されるモノクローナル抗体から開始して実施されうる。

【0215】

本発明の抗体、好ましくは31C3、29H3、23C8、28F11もしくは34A3様抗体はまた、重鎖／軽鎖の一部が元の抗体中の対応する配列に同一または相同である一方、鎖の残りが、別種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列に同一または相同である場合の「キメラ」抗体 (免疫グロブリン)、ならびにかかる抗体の断片に、それらが所望される生物学的活性および結合特異性を示す限り、誘導体化されうる (Cabillyら、上記; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、6851頁 (1984年))。

40

【0216】

本抗体がTLR3に対する結合能を有し、また場合により、さらにTLR3シグナル伝達を阻害する一方、それらはまた、TLR3ポリペプチドを発現する細胞、例えばメラノーマなどの特定の腫瘍細胞または乳房、肺、食道、胃、喉頭、腎臓、もしくは頸部のそれ

50

ら、または炎症に関与する、潜在的にウイルス感染された細胞の殺滅を標的とする場合に有用な毒素へのコンジュゲーション (conjugation) などの他の目的のために使用されうる。かかる実施形態では、典型的には、得られた試料 (例えば腫瘍を対象とした生検) を最初に、細胞 (例えば、腫瘍細胞、感染細胞、炎症に関与する細胞など) が T L R 3 を発現するか否かを、例えば本明細書中に記載の検出方法を用いて評価することになる。T L R 3 が確かに腫瘍細胞の表面上で検出される場合、細胞毒性抗体が投与されうる。次いで、細胞毒性抗体が細胞によって内在化され、毒素が細胞内部で放出され、それによってその細胞は選択的に殺滅される。したがって、かかる抗体は、限定はされないが、胆道癌；脳癌；乳癌；子宮頸癌；絨毛癌；大腸癌；子宮内膜癌；食道癌；胃癌；上皮内新生物；白血病；リンパ腫；肝癌；肺癌 (例えば、小細胞および非小細胞)；メラノーマ；神経芽細胞腫；口腔癌；卵巣癌；膀胱癌；前立腺癌；直腸癌；腎臓癌；肉腫；皮膚癌；精巣癌；甲状腺癌；ならびに他の癌および肉腫を含む、癌および腫瘍の処置 (t r e a t m i n g) 方法で使用されることになる。癌は、原発性または転移性でありうる。

10

【0217】

抗体の抗腫瘍効力を増強するための1つの有効なアプローチは、細胞毒性薬または毒素を標的細胞による内在化能があるmAbに結合させることを含む。これらの作用剤は、それぞれ抗体-薬剤コンジュゲート (conjugate) (ADC) および免疫毒素と称される。患者への投与時、ADCおよび免疫毒素は、その抗体部分を介して標的細胞に結合し、内在化されるようになり、薬剤または毒素がその効果を発揮することが可能になる。例えば、米国特許公開第2005/0180972A1号明細書、米国特許公開第2005/0123536A1号明細書を参照のこと。また、例えば、Hamblettら、Clin Canc Res、10:7063-7070頁、1999年10月15日、Lawら、Clin Canc Res、10:7842-7851頁、2004年12月1日、Franciscoら、Neoplasia、102(4):1458-1465頁、2003年8月15日、Russellら、Clin Canc Res、11:843-852頁、2005年1月15日、Doroninaら、Nat Biotech、21(7):778-784頁、2003年7月 (これらのすべては、ここでそれら全体が参照により本明細書中に援用される) を参照のこと。

20

【0218】

細胞毒性抗体は、記載の技術を用いて調製されうる (Carterら、Cancer Journal、第14巻、第3号、2008年5月/6月、またはRaviら、「Accounts of Chemical Research」、98-107頁、2008年1月、第41巻、第1号)。

30

【0219】

好ましい毒性または細胞毒性ペプチドまたは小分子は、細胞の増殖を減速させ、停止させ、または食い止めるか、それらの活性を任意の検出可能な方法で低下させるか、あるいはそれらを直接的もしくは間接的に殺滅することが可能な任意の化合物を含む。好ましくは、毒性または細胞毒性化合物は、細胞を直接的に殺滅するか、ADCを引き起こすかまたはそれ以外により、作用する。毒性ペプチドは、本明細書で使用される場合、任意のペプチド、ポリペプチド、またはそれらの誘導体、例えば非天然アミノ酸または修飾された結合を伴うペプチドもしくはポリペプチド誘導体を含んでもよい。毒性小分子は、好ましくは10kD未満、5kD、1kD、750D、600D、500D、400D、300D、もしくはそれより小さいサイズを有する任意の毒性化合物または因子を含んでもよい。

40

【0220】

検出可能な部分へのコンジュゲーションは、特に本発明の抗体が診断目的で使用される場合、有用である。かかる目的は、限定はされないが、生物学的試料、例えば、血液試料または組織生検をT L R 3 発現細胞の存在についてアッセイすること、および個体におけるT L R 3 発現細胞の存在、レベルまたは活性を検出することを含む。かかるアッセイおよび検出方法は、例えば、患者の細胞内でT L R 3 の発現を検出することと、患者の細胞

50

が T L R 3 を発現するように判定される場合、それに続き、本発明の T L R 3 調節抗体を投与することを含む、本発明の診断／治療方法において使用することができる。

【0221】

特定の実施形態では、本抗体は、T L R 3 発現細胞を生物学的試料から精製するように使用される。生物学的試料は、例えば診断または生体外治療目的で患者から、あるいは研究目的でかかる細胞源を得るための個体または非ヒト霊長類から、得ることができる。

【0222】

かかる一実施形態では、本発明の標識抗体は、F A C S ソーティングにおいて使用し、T L R 3 発現細胞を生物学的試料から精製または単離することが可能である。あるいは、いくつかの実施形態では、本発明の抗体の固体支持体へのコンジュゲーションは、生物学的試料、例えば血液試料に由来する、細胞表面上に T L R 3 受容体を担持する細胞、または個体からの組織生検に由来する細胞、の親和性精製におけるツールとして有用でありうる。この精製方法は、得られた精製細胞集団の場合の、本発明の別の代替的な実施形態である。

【0223】

T L R 3 発現細胞を単離または精製するために用いられる方法とは無関係に、そのように実施する能力は、極めて多くの目的のため、例えば、T L R 3 関連疾患を、例えば本明細書中に記載の抗 T L R 3 抗体の投与前に、T L R 3 発現細胞の数または活性を評価することによって診断するため、有用である。さらに、精製 T L R 3 発現細胞は、例えば、細胞とその様々な特性および挙動をよりよく特徴づけるとともに、その挙動、活性、生存、または増殖を調節するために使用可能な化合物または方法を同定するため、研究との関連で有用である。

【0224】

治療、診断および予後における組成物および使用

本明細書中で示されるように、本発明の抗体は、ポリペプチドを含む T L R 3 発現細胞の活性、ひいては、ポリペプチドを発現する細胞、例えば T L R 3 発現免疫細胞、D C、脊髄 D C などの活性または挙動を調節する場合、特に有効である。特定の実施形態では、本抗体は、例えば、T L R 3 シグナル伝達を、場合によって抗原またはリガンド (d s R N A など) と受容体との相互作用を遮断することなく遮断し、それによって細胞の増殖または活性化を阻害することにより、T L R 3 を阻害する。組成物は、薬学的に許容できる担体をさらに含む。かかる組成物は、本発明の「抗体組成物」とも称される。一実施形態では、本発明の抗体組成物は、上記の抗体の実施形態中で開示される抗体を含む。抗体 3 1 C 3、2 9 H 3、2 3 C 8、2 8 F 1 1 もしくは 3 4 A 3 は、本発明の抗体組成物中に存在しうる抗体の範囲内に含まれる。

【0225】

本発明は、T L R 3 発現細胞活性をそれを必要とする患者において調節する方法であって、前記患者に本発明に従う組成物を投与するステップを含む方法をさらに提供する。一実施形態では、T L R 3 発現細胞活性は阻害され、ここで患者は疾患または障害を有し、ここでかかる阻害は、治療効果を促進し、増強し、および／または誘発しうる（あるいは、例えば治験によって測定されうる、少なくとも実質的割合の疾患または障害を有する患者におけるかかる効果および患者と実質的に類似した特性を促進し、増強し、および／または誘発する）。

【0226】

他の実施形態では、本方法は、患者が患うかまたは影響を受けやすい疾患の処置または予防において有用な、適切な追加的な治療剤を前記患者に投与する追加的なステップを含んでもよく、かかる作用剤の例として、免疫調節剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド、免疫系抑制剤、コルチコステロイド、抗生物質、抗ウイルスまたは補助化合物が挙げられる。かかる追加的な作用剤は、前記抗体と併せた単一剤形として、または別々の剤形として、患者に投与されうる。抗体の用量（または抗体および追加的な治療剤の総用量）は、患者における治療的応答を検出可能に誘発し、促進し、および／または増強するのに十

分なものである。抗体、断片、または誘導体および追加的な治療剤は、別々に投与される場合、望ましくは、患者に対する検出可能な組み合わせられた治療効果をもたらす（例えば、タイミング、投与の回数などに関する）条件下で投与される。

【0227】

これらの組成物中で使用可能な薬学的に許容できる担体は、限定はされないが、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、リン酸塩などの緩衝液物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースに基づく物質、
10 ポリエチレングリコール、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ポリアクリル酸塩、ワックス、ポリエチレンーポリオキシプロピレンーブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂を含む。本発明の抗体は、患者におけるTLR3発現細胞の活性を調節する、例えば阻害する方法において使用してもよい。この方法は、前記組成物を前記患者と接触させるステップを含む。かかる方法は、予防および治療目的の双方において有用となる。

【0228】

患者への投与での使用においては、本組成物は、患者への投与を意図して調合されることになる。本発明の組成物は、経口的に、非経口的に、吸入スプレーにより、局所的に、
20 直腸内に、鼻内に、口腔的に、経膈的に、または移植された容器を介して投与されうる。本明細書で使用されるものとして、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑膜内、胸骨内、髄腔内、肝内、病変内および頭蓋内注射または注入技術が含まれる。

【0229】

本発明の組成物の無菌の注射可能な形態は、水性または油性懸濁液でありうる。これらの懸濁液は、好適な分散剤または浸潤剤および懸濁化剤を使用する当該技術分野で既知の技術に従って調合されうる。無菌の注射可能な調製物はまた、非経口的に許容できる非毒性の希釈剤または溶媒中の、無菌の注射可能な溶液または懸濁液（例えば1，3-ブタンジオールでの溶液として）であってもよい。使用可能な許容できる媒体および溶媒の中に、
30 水、リンガー液および等張性塩化ナトリウム溶液が含まれる。さらに、無菌固定油は、従来から溶媒または懸濁培地として使用される。この目的のため、合成モノもしくはジグリセリドを含む任意の無菌固定油を使用してもよい。脂肪酸、例えばオレイン酸およびそのグリセリド誘導体は、薬学的に許容できる天然油、例えばオリーブ油またはヒマシ油（特にそれらのポリオキシエチル化バージョンで）の場合と同様、注射物質の調製において有用である。これらの油性溶液または懸濁液はまた、エマルジョンおよび懸濁液を含む薬学的に許容できる剤形の調合において一般に使用される、長鎖アルコール希釈剤または分散剤、例えばカルボキシメチルセルロースまたは類似の分散剤を含有しうる。他の一般に使用される界面活性剤、例えばTweens、Spansおよび他の乳化剤またはパイオ
40 アベイラビリティエンハンサー（薬学的に許容できる固体、液体、または他の剤形の作製において一般に使用される）も、製剤を目的として使用されうる。

【0230】

本発明の組成物は、限定はされないが、カプセル、タブレット、水性懸濁液または溶液を含む、任意の経口的に許容できる剤形で経口投与してもよい。経口使用におけるタブレットの場合、一般に使用される担体は、ラクトースおよびトウモロコシデンプンを含む。典型的には、潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムもまた添加される。カプセル形態での経口投与においては、有用な希釈剤として、例えばラクトースが挙げられる。経口使用として水性懸濁液が必要な場合、活性成分は、乳化剤および懸濁化剤と結合される。必要に応じて、特定の甘味剤、香味剤または着色剤もまた添加してもよい。

【0231】

あるいは、本発明の組成物は、直腸投与において坐剤の形態で投与してもよい。これらは、同作用剤を、室温で固体であるが、直腸温度で液体であり、それ故、直腸内で溶解し
50

、薬剤を放出することになる、好適な非刺激性賦形剤と混合することによって調製されうる。かかる材料は、ココアバター、蜜ろうおよびポリエチレングリコールを含む。

【0232】

本発明の組成物はまた、処置の標的が、特に、眼、皮膚、または下部腸管の疾患を含む、局所適用によって容易に接近可能である領域または器官を含む場合、局所的に投与してもよい。好適な局所製剤は、これらの領域または器官の各々に対して容易に調製される。局所適用においては、組成物は、1つ以上の担体中に懸濁または溶解された活性成分を含有する好適な軟膏中で調合されうる。本発明の化合物の局所投与のための担体は、限定はされないが、鉱油、流動ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化ろうおよび水を含む。あるいは、本組成物は、1つ以上の薬学的に許容できる担体中に懸濁または溶解された活性成分を含有する好適なローションまたはクリーム中で調合されうる。好適な担体は、限定はされないが、鉱油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水を含む。

10

【0233】

下部腸管に対する局所適用は、直腸坐剤製剤（上記参照）または好適な浣腸製剤中であってもよい。パッチもまた、使用してもよい。

【0234】

本発明の組成物はまた、経鼻エアロゾルまたは吸入によって投与してもよい。かかる組成物は、医薬製剤に関する当該技術分野で周知の技術に従って調製され、ベンジルアルコールまたは他の好適な保護剤、バイオアベイラビリティを高めるための吸収プロモーター、フルオロカーボン、および／あるいは他の従来の可溶化剤または分散剤を使用する、生理食塩水中の溶液として調製されうる。

20

【0235】

いくつかのモノクローナル抗体、例えばRituxan Herceptin（トラスツズマブ）またはXolair（オマリズマブ）は、臨床症状において有効であることが示されており、また同様の投与レジメン（すなわち、製剤および／または用量および／または投与プロトコル）を、本発明の抗体の場合に使用してもよい。本発明の医薬組成物中の抗体の投与におけるスケジュールおよび用量は、これらの生成物における既知の方法に従い、例えば製造業者の使用説明書を使用し、決定してもよい。例えば、本発明の医薬組成物中に存在する抗体は、100mg（10mL）もしくは500mg（50mL）のいずれかの使い捨てバイアル内に10mg/mLの濃度で供給してもよい。生成物は、9.0mg/mLの塩化ナトリウム、7.35mg/mLのクエン酸ナトリウム二水和物、0.7mg/mLのポリソルベート80、および注射用滅菌水の中で、IV投与のために調合される。pHは、6.5に調整される。本発明の医薬組成物中の抗体における例示的な適切な用量範囲は、約1mg/m²～500mg/m²の間であってもよい。しかし、これらのスケジュールが例示的であり、かつ最適なスケジュールおよびレジメンが、治験において判定されなければならない、医薬組成物中の特定の抗体の親和性および耐性を考慮することで適合可能であることは理解されるであろう。

30

【0236】

別の実施形態によると、本発明の抗体組成物は、通常、抗体が投与されている場合の特定の治療目的のために使用される作用剤を含む、別の治療剤をさらに含んでもよい。追加的な治療剤は通常、処置中の特定の疾患または症状に対する単剤療法において、同作用剤に対して典型的に使用される量で、組成物中に存在することになる。かかる治療剤は、限定はされないが、抗炎症剤、ステロイド、免疫系抑制剤、抗生物質、抗ウイルス剤、ならびに他の抗体およびその断片を含む。

40

【0237】

別の実施形態では、異なる交差反応性を有する本発明の2つ以上の抗体、例えばTLR3ポリペプチドの範囲内の異なるエピトープに特異的に結合する抗体は、単一組成物中で組み合わせられることで、できるだけ多くの異なるTLR3遺伝子産物が標的化され、例え

50

ば個体内または異なる患者内でのポリペプチドにおける多様性が明らかになり、またできるだけ有効に標的化される。さらに、本発明の抗体組成物は、単一の T L R 3 エピトープを認識する複数の抗体を含んでもよい。かかる組み合わせであれば、治療的セッティング上の有用性の拡大がさらに提供されることになる。

【0238】

本発明はまた、T L R 3 発現細胞活性を、それを必要とする患者において調節する方法であって、本発明に従う組成物を前記患者に投与するステップを含む方法を提供する。本方法は、より詳細には、T L R 3 細胞活性の低下が有益であり、あるいは過剰な T L R 3 細胞活性によって引き起こされるかまたは特徴づけられる疾患（例えば、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染性疾患、ウイルス感染）を有する患者における T L R 3 細胞活性を低下

10

【0239】

本方法を使用可能な疾患および症状は、例えば、T L R 3 シグナル伝達または前記 T L R 3 シグナル伝達時のサイトカイン産生により、部分的または全体的に媒介されるかまたは悪化される疾患を含む、T L R 3 の調節が有益でありうる場合のすべての疾患を含む。特に、T L R 3 シグナル伝達を阻害する抗体が使用される場合、かかる障害は、T L R 3 シグナル伝達または前記 T L R 3 シグナル伝達時のサイトカイン産生により、部分的または全体的に媒介されるかまたは悪化される任意の障害、例えば特に炎症性疾患および自己免疫疾患などの免疫障害を含む。より詳細には、本発明の方法は、種々の免疫障害および他の疾患、例えば、限定はされないが、自己免疫、炎症、アレルギー、喘息、感染（例えば、慢性感染、ウイルス感染）および敗血の処置のために用いられる。T L R 3 シグナル伝達を阻害する抗体で処置可能な疾患の例として、限定はされないが、関節炎、全身性エリテマトーデス、敗血、喘息、骨粗鬆症、中枢神経系抗原に対する自己免疫、自己免疫性糖尿病、炎症性腸疾患、自己免疫性心筋炎（autoimmune carditis）、自己免疫性肝炎が挙げられる。

20

【0240】

本発明に従う、T L R 3 シグナル伝達を阻害する抗体を使用して処置可能な他の免疫障害は、特に自己免疫疾患および炎症性疾患、例えば、限定はされないが、クローン病、セリアック病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）、アゾソン病、抗リン脂質抗体症候群（APS）、再生不良性貧血、自己免疫肝炎、糖尿病、グッドパスツール病、グレーブス病、ギラン・バレー症候群（GBS）、橋本病、エリテマトーデス、脱髄性症状、多発性硬化症、重症筋無力症、オプソクロノス・ミオクロノス症候群（OMS）、視神経炎、オルド（Ord's）甲状腺炎、天疱瘡、肝硬変、乾癬、関節リウマチ、ライター症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎、温式自己免疫性溶血性貧血、ウェゲナー肉芽腫症、虫垂炎、動脈炎、関節炎、眼瞼炎、細気管支炎、気管支炎、滑液包炎、子宮頸管炎、胆管炎、胆嚢炎、絨毛羊膜炎、大腸炎、結膜炎、膀胱炎、涙腺炎、皮膚炎、皮膚筋炎、脳炎、心内膜炎、子宮内膜炎、腸炎、全腸炎、上顎炎、精巣上体炎、筋膜炎、結合組織炎、胃炎、胃腸炎、歯肉炎、肝炎、汗腺膿瘍、回腸炎、虹彩炎、喉頭炎、乳腺炎、髄膜炎、脊髄炎、心筋炎、筋炎、腎炎、脾炎、卵巣炎、精巣炎、骨炎、耳炎、腭炎、耳下腺炎、心膜炎、腹膜炎、咽頭炎、胸膜炎、静脈炎、肺炎、直腸炎、前立腺炎、腎盂腎炎、鼻炎、卵管炎、副鼻腔炎、口内炎、滑膜炎、腱炎、へんとう炎、ブドウ膜炎、膣炎、脈管炎、および外陰炎を含む。

30

40

【0241】

本抗体は、キット中に含まれうる。キットは、場合により、任意の数の抗体および／または他の化合物、例えば、1、2、3、4、もしくは任意の他の数の治療抗体および／または化合物をさらに有しうる。キットの内容物についての本説明が決して限定されるものではなく、例えば、本キットは、他のタイプの治療化合物を有しうることは理解されるであろう。好ましくは、本キットはまた、例えば本明細書中に記載の方法を詳述する、本抗体を使用するための使用説明書を含む。

【0242】

50

本発明のさらなる態様および利点は、以下の実験セクションにおいて開示されることになり、それは、例示的なものであり、本願の範囲を限定しないものとして見なされるべきである。

【実施例】

【0243】

材料および方法

インターフェロン- α (IntronA (商標)) は、Schering Plough Corp. から購入した。腫瘍細胞系：A375悪性メラノーマ腫瘍細胞系 (CRL-1619) は、ATCCから購入する。抗体 (抗原、サプライヤ、参照)：抗TLR3抗体 pAb、R&D Systems、ref. AF1487。機器：FACSCalibur (商標) フローサイトメーター (BD Biosciences)。

10

【0244】

レンチウイルスshRNAでの阻害

対照ヒトTLR3を標的化する短いヘアピンRNA (shRNA) をコードするレンチウイルスコンストラクトを、Vectalys (Toulouse, France) によって作成し、産生した。腫瘍細胞に、レンチウイルス調製物を感染させ、さらにピューロマイシンを用いてそれを選択し、安定なshTLR3 A375腫瘍細胞を得た。

【0245】

表面プラズモン共鳴 (SPR)

(a) 一般的なBiacore T100による方法。SPR測定を、25°C、Biacore T100装置 (Biacore GE Healthcare) 上で行った。すべてのBiacore実験において、HBS-EP+緩衝液 (Biacore GE Healthcare) または10mM酢酸ナトリウムpH5.6、150mM NaCl、0.05% P20を、ランニング緩衝液の代わりに使用し、Biacore Evaluation 4.1およびBiacore T100 Evaluationソフトウェアを使用してセンサーグラムを分析した。組換えヒトTLR3を、R&D Systemsから購入した。

20

【0246】

(b) タンパク質固定化。組換えTLR3タンパク質を、Biacore Series 5 Sensor Chip CM5 (チップ) のデキストラン層内のカルボキシル基に共有結合的に固定化した。チップ表面を、EDC/NHS (0.2M N-エチル-N'- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩、0.05M N-ヒドロキシスクシンイミド (Biacore GE Healthcare)) で活性化させた。タンパク質を、カップリング緩衝液 (10mM酢酸ナトリウム、pH5.6) で10 μ g/mlに希釈し、適切な固定化レベル (すなわち、結合実験において約2000RUおよび親和性実験において600RU) に達するまで注入した。残りの活性化基の不活性化を、pH8の100mMエタノールアミン (Biacore GE Healthcare) を用いて行った。

30

【0247】

(c) 抗体結合分析を、HBS-EP+ (中性pH) を用いて実行した。10 μ g/mlの濃度での抗体を、固定化タンパク質上で10 μ l/分の一定流速で2分間注入し、10mM NaOH、500mM NaCl再生緩衝液の10秒間注入による再生前の3分間、解離させておいた。ブランク補正 (blank correction) を、可溶性抗体を参照デキストラン流動細胞上に同時注入することにより、オンラインで行った。

40

【0248】

(d) 酸性緩衝液 (pH5.6) 中での競合アッセイ。流速を10 μ l/分に設定し、rhTLR3表面を飽和させるため、50 μ g/mlの濃度での一次抗体 (または100 μ g/mlでのポリAU) を、2分間、3回連続で注入した。次いで、二次抗体を、50 μ g/mlで再び2分間注入し、10mM NaOH、500mM NaCl再生緩衝液の15秒間注入による再生前の3分間、解離させておいた。ブランク補正を、再びオンラ

50

インで行い、飽和抗体（または核酸（*nucleic acid*））を用いる曲線から、緩衝液の注入を差し引き、第1の複合体の解離に起因するシグナルを除去した。得られたシグナルを、二次抗体の *rhTLR3* 表面上への直接的注入によって得られるものと比較した。

【0249】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

プロモーターとして *ISRE*（*IFN* 刺激応答配列）ならびにレポーター遺伝子およびタンパク質としてルシフェラーゼを用いるレポーター遺伝子アッセイをセットアップした。293T細胞系（ATCC、#CRL-1573）に、*pISRE-luc* プラスミド（#219089-*Stratagene*）を安定的に形質移入し、それを *IFN-α* 刺激に対して最適な応答を誘発するものとしてさらに選択し、対照293T-*ISRE*と称した。この細胞系に、異なるプラスミド *pUNO-hTLR3* プラスミド（#*puno-htlr3-InVivoGen*）をさらに安定的に形質移入し、それを293T-*TLR3-ISRE*と称した。0日目、細胞を、96ウェル培養プレート（100μl/ウェル）内の完全培地中に、 4×10^5 個の細胞/mLで播種した。細胞を、まず37℃で20時間インキュベートし、次いで50μLの培地を廃棄し、細胞を、様々な濃度の抗TLR3抗体とともに最終的に100μL/ウェルの漸増量のポリAUで活性化する。新しい培地とともにインキュベートした細胞は、バックグラウンドのルシフェラーゼ活性として使用することになる。細胞を、37℃で6時間インキュベートする。100μLの新たに解凍した *Steady Glo*（*Promega*）を各ウェルに添加し、プレートを、暗所、室温で10分間インキュベートし、各ウェル内で放射された光を、ガンマカウンタ（*TopCount*）装置上で *Count Per Second*（CPS）として定量する。

【0250】

実施例1-TLR3特異的モノクローナル抗体の産生

免疫#1

一次スクリーニング。

抗TLR3抗体を得るため、*Balb/c*マウスを、組換えヒトHis標識TLR3細胞外ドメイン組換えタンパク質（*R&D systems*、#1487-*TR-050*）で免疫した。マウスは、50μgのTLR3タンパク質および完全フロイントアジュバントのエマルジョンでの1回の一次免疫（*prim-immunisation*）を腹腔内に、50μgのTLR3タンパク質および不完全フロイントアジュバントのエマルジョンでの二次免疫を腹腔内に、また10μgのTLR3タンパク質での3回の追加免疫を静脈内に受けた。免疫脾細胞をX63.Ag8.653不死化B細胞と融合し、放射線を照射した脾細胞の存在下で培養した。40の培養プレートを得て、TLR3への結合の検出のために開発したELISAを使用し、TLR3への結合について、一次スクリーニングで評価した。要するに、His標識組換えTLR3タンパク質（*R&D systems*、#1487-*TR-050*）を、*Ni-NTA* 96ウェルプレート（*Qiagen*）上でコーティングした。ハイブリドーマ培養プレートからの上清（SN）を、TLR3プレート内でインキュベートし、TLR3に結合するIgの存在が、ヤギ抗マウスF(ab) IgG-HRPの場合に明らかになった。陽性の上清を選択し、TLR4への結合の欠如について試験した。要するに、His標識rec TLR4タンパク質（*R&D systems*、#3146-*TR-050*）を、*Ni-NTA* 96ウェルプレート（*Qiagen*）上でコーティングした。ハイブリドーマ培養プレートからのSNを、TLR4プレート内でインキュベートし、TLR4に結合するIgの存在が、ヤギ抗マウスF(ab) IgG-HRPの場合に明らかになった。TLR3特異的抗体由来の抗His特異的抗体を使用する場合、TLR4を、一次スクリーニングにおいて選択したウェルの中で区別するため、二次スクリーニングとして選択した。第二に、TLR3とTLRファミリーの他のメンバとの間の相同性を仮定すると、初期評価は、少なくとも1つの市販のモノクローナル抗体（mAb）が、そのパッケージ上で、TLR3タンパク質に特異的なも

のであることを表示するにもかかわらず、TLR4を安定的に形質移入したパラフィン包埋293T細胞を認識することを示した。

【0251】

二次スクリーニング；目的のハイブリドーマの選択。

168の上清を、保持し、rec TLR3チップを使用するBiacoreアッセイの後、ヒトTLR3発現293T細胞への結合に基づく様々なアッセイフォーマットにおけるさらなるスクリーニングにおいて試験した。pISRE-lucプラスミド（#219089-Stratagene）を安定的に形質移入した293T細胞系（ATCC、#CRL-1573）を、IFN- α 刺激に対して最適な応答を誘発するものとしてさらに選択し、対照293T細胞と称した。この細胞系に、pUNO-hTLR3プラスミド（#puno-h t l r 3-InVivogen）またはpUNO-hTLR4プラスミド（#puno-t l r 4-InVivogen）をさらに安定的に形質移入し、それらをそれぞれ293T-TLR3および293T-TLR4と称した。上清を、FACSに基づくスクリーニングで、293T対照細胞に結合することなく、293T-TLR3細胞に結合することについて、またそれと同時に、IHCスクリーニングで、293T-TLR4細胞に結合することなく、凍結細胞ペレットとして293T-TLR3細胞に結合することについて、スクリーニングした。凍結細胞ペレットとして293T-TLR3細胞に結合することについて、IHCスクリーニングで選択したウェルについても、パラフィン包埋細胞ペレットとして293T-TLR3細胞に結合することについて、IHCスクリーニングでさらに試験した。要するに、FACSスクリーニングにおいては、上清中での反応抗体の存在が、ビオチンで標識したヤギ抗マウスポリクローナル（polyclonal）抗体（pAb）、PEで標識したストレプトアビジンによって明らかになった。IHCスクリーニングにおいては、上清中での反応抗体（Ab）の存在が、ビオチンで標識したロバ抗マウスpAb（#715-065-150、Jackson Immunoresearch Laboratories）、ペルオキシダーゼ（peroxydase）で標識したストレプトアビジン（#E2886, Sigma）によって明らかになり、またDAB（#SK-4105, Vector Laboratories）によって明らかになった。

【0252】

潜在的に興味深いハイブリドーマのクローニング。

一次スクリーニングから選択した42の潜在的に興味深いハイブリドーマを、96ウェルプレート内で限界希釈技術によってクローン化し、304のサブクローンを、以下の一連のスクリーニングで試験した。304のサブクローンを、TLR3への結合の検出用に開発した同じELISAを用いるTLR3への結合についてのスクリーニングで、最初に評価し、陽性上清を選択し、ELISAアッセイでTLR4への結合の欠如について試験し、TLR3に対して選択的である228のクローンを得た。TLR4 ELISAで得られるDOに対するTLR3 ELISAで得られるDOについて10を超える比が得られたすべての上清を、TLR3に対して特異的なものとして選択した。それらの中には、プレート31のウェルC3（31C3）、プレート29のウェルH3（29H3）、プレート23のウェルE7（23E7）、プレート23のウェルC8（23C8）およびプレート28のウェルF11（28F11）からの上清が含まれた。31C3、29H3、23C8、および28F11は、IgG1アイソタイプであった。

【0253】

304のクローンの中で、凍結IHCにおいて陽性である、試験されたプレクローン（prec clone）から生じるものとして選択した63のクローンについても、293T-TLR4細胞に結合することなく、凍結細胞ペレットとして293T-TLR3細胞に結合することについて、凍結IHCスクリーニングで試験し、凍結IHCにおいて31の陽性クローンを得た。

【0254】

FACS染色における71のクローン陽性および凍結IHCにおける31のクローン陽

性の中で、41のクローンを、304の初期クローンからの凍結保存について選択した。

【0255】

免疫#2

一次スクリーニング。

異なる抗体を産生するため、さらなる一連の免疫を行った。一連の一次免疫の場合と同様の実験セットアップを使用し、Balb/cマウスを免疫し、免疫脾細胞を、融合し、放射線を照射した脾細胞の存在下で培養した。培養プレートを得て、TLR3への結合の検出のために開発したELISAを使用し、一次スクリーニングでTLR3への結合について評価した。2840から263のクローンを、二次スクリーニング用を選択した。

【0256】

二次スクリーニング；興味深いハイブリドーマの選択。

263の上清を、保持し、293T-TLR3細胞に対する阻害試験におけるさらなるスクリーニングで試験した。95%を超える阻害効果を有するクローンを選択した。それらの中には、プレート34のウェルA3(34A3)からの上清が含まれた。

【0257】

実施例2-TLR3調節

脊髄DC(MdDC)を、PBMCを正常な健常ヒトドナーから単離することにより、PBMCから得た。単球を、一般的な使用説明書に従い、ヒトCD14マイクロビーズ(Miltenyi Biotech)での陽性選択を用い、PBMCから精製した。単球を、ヒトGM-CSF(Leucamax, SP)およびヒトIL-4(R&D systems)(それぞれ200ng/mlおよび20ng/ml)における5~6日のインキュベーションにより、DC(MdDC)にさらに誘導した。

【0258】

次いで、得られたMdDCを、平底96ウェルプレート内、 10^6 個の細胞/mlで2通りに播種した。細胞を、指定濃度での抗TLR3抗体とともに、200 μ lの最終容量で20時間活性化した。漸増量のポリAU(30、100、300および900 μ g/ml)をウェルに添加し、投与効果の出力を得た。

【0259】

上清を、刺激の20時間後に回収し、-20℃で凍結し、さらにIL-6およびIP-10について酵素結合免疫吸着アッセイを用いてアッセイした。次いで、細胞を採取し、活性化マーカーCD86(a.huCD86マウスの場合、IgG1、FITC、BD Biosciences, ref 555657)に対して染色するとともに、FACS Canto(商標)フローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して検出した。

【0260】

図1および2は、CD86細胞活性化およびIL-6、IP-10分泌の観点での、抗体31C3および29H3(双方ともIgG1アイソタイプ)の阻害特性について図示する。抗TLR3抗体31C3.1および29H3.7は、TLR3介在性脊髄DCの活性化にインビトロで拮抗し、さらに、これらの抗体は、TLR3介在性CD83/CD86発現を有効に下方制御し、かつTLR3介在性サイトカイン/ケモカイン分泌(特にIP-10およびIL-6)を排除した。

【0261】

F(ab)'₂断片を、パパイン切断およびMono Q 5/50GL上でのイオン交換クロマトグラフィーによる精製により、抗体31C3.1および29H3.7から産生し、SDS-PAGEによって分析し、CD86細胞活性化およびサイトカイン分泌の観点で阻害について試験した。抗体31C3.1および29H3.7の双方のF(ab)'₂断片は、完全長抗体と同様の範囲まで、TLR3介在性CD83/CD86発現を有効に下方制御し、かつTLR3介在性サイトカイン/ケモカイン分泌を排除した。図3は、抗体31C3のF(ab)'₂断片および全31C3 IgGが、同様の範囲まで、TLR3介在性CD86発現およびIP-10分泌を排除する場合での、抗体31C3にお

10

20

30

40

50

る結果を示し、図4は、抗体29H3のF(ab)'₂断片について同じことを示す。

【0262】

同様の実験において、28F11および23C8抗体のTLR3シグナル伝達に対する阻害能について評価し、抗体31C3の場合と比較した。抗体を、漸増用量のポリA Uの存在下、50 μg/mlの濃度で試験した。結果を、図14Aおよび14Bに示し、本発明に従う抗体の阻害特性について明示する。

【0263】

抗体34A3はまた、同様の設定で試験している。この回では、細胞(MdDC)を固定用量のポリA U(300 μg/ml)で刺激し、漸増用量の抗体を培地に添加する。図19Aおよび19Bは、IL-6およびIP-10分泌の観点で31C3と比較した、抗体34A3における結果を図示する。

【0264】

実施例3—二価親和性

抗体29H3.7、23E7.3、31C3.1ならびに市販の抗体TLR3.7(e Biosciences)および40C1285(Abcam)の結合特性を、SPR、アイテムc)に記載の方法を用いて比較した。図5は、TLR3に対する結合親和性が、市販の抗体の場合よりも、29H3.7および31C3.1の場合に有意に改善されることを示す。

【0265】

TLR3への結合について、中性(pH7.2)および酸性(pH5.6)条件で判定し、K_D(D)値を計算した。結果(2つもしくは3つの実験の平均)を表1に示す。中性pHで、23E7、29H3.7および31C3.1のすべてが、組換えヒトTLR3に対し、100ピコモルより改善された(約50ピコモル)、強力かつ類似した二価親和性(K_D)を示した。比較において、抗体TLR3.7(e Biosciences)は、有意により低い結合親和性を示した。しかし、酸性pHで、23E7は、結合親和性が著しく低下し、そのK_Dは約4ナノモルであった。31C3、23C8、28F11および34A3の親和性を、別々のアッセイにおいて同じ条件下で測定し、結果を表1および図15に示す。これらの結果は、本発明に従う抗体が特に酸性pHで高親和性を有することを示す。

【0266】

【表9】

表1

抗体	pH 7.2での平均 K _D (M)	pH 5.6での平均 K _D (M)
23E7.3	3.51 * 10 ⁻¹¹	4.32 * 10 ⁻⁹
29H3.7	4.74 * 10 ⁻¹¹	1.10 * 10 ⁻¹¹
31C3.1	5.05 * 10 ⁻¹¹	6.14 * 10 ⁻¹¹
TLR3.7	4.5 * 10 ⁻⁸	9 * 10 ⁻⁹
23C8	1.38 * 10 ⁻¹⁰	1.03 * 10 ⁻¹¹
28F11	6.50 * 10 ⁻¹⁰	3.35 * 10 ⁻¹⁰
34A3	3.01 * 10 ⁻¹²	5.17 * 10 ⁻¹¹

【0267】

実施例4—エピトープマッピング

酸性pHでのエピトープマッピング。

競合アッセイを、SPR、アイテムd)に記載の方法に従い、pH 5.6で実施した。図6は、抗体29H3.7および31C3.1が、ポリAUと競合することなくTLR3に結合できたことを図示し、同様に、図16Aおよび16Bは、抗体28F11、34A3および23C8が、ポリAUと競合することなくTLR3に結合できたことを図示する。したがって、29H3.7、31C3.1、28F11、34A3および23C8は、TLR3上のdsRNAのエピトープに対して競合することなく、dsRNAシグナル伝達を阻害することができる。図7は、抗体29H3.7および31C3.1の間での競合を図示する。1つの抗体によるTLR3への結合がその他のTLR3への結合を低下させることから（その他の1つの抗体によって約90%が阻害）、これら2つの抗体がTLR3上の類似のエピトープに対して競合すると結論づけることができる。同様に、図15Aおよび15Bは、抗体31C3と抗体TLR307、23C3、28F11および29H3との間の競合を図示する。図15Aは、任意の競合抗体の不在下での結合を図示する一方、図15Bは、31C3でのhTLR3チップの飽和後の結合レベルを図示する。結合レベルの低下は、31C3抗体によって引き起こされる障害を示し、試験抗体間での結合における競合を明示する。31C3競合による影響を受けていないTLR3.7結合レベルは、抗体が異なるエピトープに対して競合することを明示する一方、他の抗体のすべてにおける結合レベルの低下は、それら全部が類似のエピトープに対して31C3と競合することを明示する。

【0268】

中性pHでのエピトープマッピング。

競合アッセイを、SPRに記載の方法に従い、pH 7.2で実施した。1つの抗体による結合がその他のTLR3への結合を低下させたことから、抗体29H3.7および31C3.1は、TLR3への結合に対して互いに競合する。また、エピトープマッピングを市販の抗体TLR3.7および抗体23E7.3の場合に検討した。これらの抗体のいずれも、TLR3への結合において、抗体29H3.7および31C3のいずれとも競合しなかった。しかし、抗体TLR3.7は、TLR3への結合において、抗体23E7.3と確かに競合し、それは、それらが重なり（overlapping）結合部位を有することを示す。

【0269】

34A3抗体結合親和性を、rhTLR3チップ上に単独、またはrhTLR3チップが34A3の添加前に31C3抗体で飽和される条件下のいずれかで測定した。結果は、図17に示され、2つの抗体がhTLR3への結合において競合することから、それらの重なり結合部位を考慮すると、共通のエピトープ決定基を共有するという証拠を提供する。

【0270】

図8は、European Bioinformatics Institute (Hinxton U.K.)のProtein Data Bank (PDB)プロジェクトからのResource for Studying Biological Macromoleculesデータベースから得られるデータファイル1ZIWとして公的に利用可能なデータに基づき、SwissPdb、Viewer 4.0を用いるコンピュータモデリング (Guex and Peitsch (2007年) Electrophoresis 18:2714-2723頁)によって生成された、ヒトTLR3タンパク質の細胞外ドメインの分子表面マップを示す。この図面では、C末端は左側に、またN末端は右側に存在し、それは、実質的にグリコシル化を含んでいないTLR3の表面と、他の表面が炭水化物によって幅広くマスクされていることを示す（例えば、Choeら、(2005年) Science 309:581-585頁を参照）。図8中の右側の表面マップは、分子表面にマッピングされた、中性pHでのヒトTLR3ポリペプチドの静電ポテンシャルを示す。正の静電ポテンシャルの主な領域は、矢印で示し、それはC末端側のグリコシル化を含まない表面上に正および中性のポテンシャルの一般的領域を形成する。グリコシル化を含まない表面は、リガンドアクセサリ (accessory

分子またはTLR3単量体または他のオリゴマーアセンブリとの相互作用において接近可能であると考えられ、C末端側の正の静電ポテンシャルの領域（最暗色の影、矢印によって示される主な正の領域）は、dsRNA結合領域に対応すると考えられる。これらの領域は、Choeら、（2005年）の図5中にも示される。左側のマップは、dsRNA結合に参与することが突然変異試験によって判定されたアミノ酸残基を示し、ここで残基dsRNA結合は、残基H539、N541、N466、R489、N517もしくはN540の突然変異によって阻害され（>80%）、またここでdsRNA結合は、残基K117、K137およびK139の突然変異によって阻害された（>80%）。Choeら、（2005年）において提起されたモデルでは、TLR3が二量体化界面がグリコシル化を含まない表面上のC末端領域の近位にある場合のホモ二量体を形成し、かつ、dsRNAがTLR3のグリコシル化を含まない表面のみに結合し、その場合、2つのTLR3単量体は、2つのTLR3単量体および1つのdsRNA鎖の複合体中で、dsRNAをサンドイッチ化しうる。より長いdsRNA鎖に結合するTLR3の複数の二量体によって形成されるTLR3のオリゴマー複合体を含むモデルも提起されている（例えば、Bellら、（2006年）PNAS USA 103（23）：8792-8797頁）。Ranjith-Kumarら、（2007年）J. Biol. Chem. 282（10）：7668-7677頁は、TLR3がリガンドの不在下でオリゴマー化段階で存在しうることで、dsRNAの結合が、二量体における再配列（単量体の互いに向けての側面のスライドをもたらし、dsRNAに適合するように調節される）を引き起こしうることで、またこの場合、得られる高次構造変化は、TIRドメインの相互作用を刺激し、シグナル伝達を誘発しうることで提起されている。したがって、1つの説明として、抗TLR3抗体31C3、29H3、23C8、28F11および34A3が、例えばグリコシル化を含まない表面上の、またおそらくは中性pHで負電荷を有するエピトープ（したがって、dsRNAのTLR3への結合の領域内ではない）中のTLR3に結合することが考えうる。したがって、抗体は、場合により、dsRNAとTLR3との相互作用を阻止しないことになるが、例えば、dsRNAに結合しているTLR3の二量体またはオリゴマーが、再配置するか、またはTIRドメインの相互作用をもたらすために必要とされる立体配置をとることを阻止することにより、あるいはTLR3二量体および／または結果として生じるTLR3-dsRNA三重複合体の適切な形成に干渉することにより、シグナル伝達を阻害しうる。

【0271】

実施例5-レポーターアッセイ

抗体を、ルシフェラーゼに基づくレポーター遺伝子活性（293T-TLR3-ISRE）における、TLR3シグナル伝達の阻害について試験した。ポリ（I：C）などのTLR3アゴニストを使用するTLR3受容体の関与が、プロモーターISREを含むIFN型経路（the type-I IFN pathway）を活性化することが報告されている（Wietekら、J. Biol. Chem.、278（51）、50923頁、2003年）。要するに、レポーターアッセイにおいて、dsRNA TLR3アゴニストを使用し、抗TLR3抗体31C3の存在下でTLR3シグナル伝達が誘発され、TLR3シグナル伝達を評価した。図9中に示される結果は、抗TLR3抗体31C3が、TLR3シグナル伝達に対する効果を全く有しないことが予め判定された対照抗TLR3抗体に対し、TLR3シグナル伝達を用量依存性に強力に阻害したことを示す。

【0272】

さらなる実験セットにおいては、293-huTLR3細胞を、異なる濃度の抗TLR3 mAbとともに24時間インキュベートした後（図10Aを参照；mAb濃度は、対数目盛りで $\mu\text{g}/\text{ml}$ で軸表示される）、TLR3アゴニストの培地にポリAUを300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加した。ルシフェラーゼ発現を、24時間後をベースに測定した。結果を図10Aに示し、IC50を表2中に示し、それは本発明に従う抗体が優れた阻害特性を有することを示す。

【0273】

【表 10】

表 2

	IC50 (μg/ml)
31C3	2.25
23C8	1.83
28F11	5.56

10

【0274】

別の実験セットにおいては、同じ阻害試験を、 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ のポリAUならびに試験抗体31C3、23E8および34A3を用いて実施した。IC50値を計算し、抗体の全部が、 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 未満のIC50を有した。さらに、34A3は、低濃度で増強された阻害効果を示した(図10B)。図10Aおよび10Bは、漸増用量の本発明に従う抗体の阻害特性を示し、TLR3シグナル伝達の阻害は、用量依存性である。このアッセイでは、本発明に従う抗体の優れた阻害特性が確認される。

【0275】

さらなる試験においては、本発明に従う抗体の阻害特性を、炎症状態下、ここではIFN α の存在下で評価した。要するに、3つの異なる条件について試験した。条件1(図11A)では、IP-10分泌を、前処理を全く伴わない場合に評価し、条件2(図11B)では、IP-10分泌を、24時間のIFN α (1000 UI/ml)での前処理後に評価し、条件3(図11C)では、IP-10分泌を、24時間のポリAU($300\text{ }\mu\text{g/ml}$)での前処理後に評価し、次いで、ある用量範囲のdsRNA(図11Aおよび11BにおけるポリIC、図11CにおけるポリAU)および抗TLR3抗体(31C3または23C8のいずれか)を $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し、IP-10分泌を、ELISAを用い、24時間後、($\mu\text{g/ml}$ で)定量した。

20

【0276】

図11に示される結果は、本発明に従う抗体が、刺激分子(dsRNAまたは炎症性サイトカインのいずれか)の存在下であっても、TLR3の優れた阻害剤のままであることを明示する。かかる状態は、予め確定された炎症性疾患に類似した症状を呈する。

30

【0277】

実施例6—FACS染色

要するに、293Tまたは293T-ISRE/TLR3細胞系を回収し、培地を洗浄し、細胞を固定し、Beckman Coulter製のIntraPrep(商標)透過性試薬を使用し、製造業者の使用説明書に従って透過処理した。次いで、透過性細胞を、 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ の31C3抗体とともに室温で20分間インキュベートし、FITCで標識したヤギ抗マウス抗体によってさらに明らかにした。グラフを図13に示す。図13Aは、HEK293T細胞系に対する陰性対照を示す。図13Bは、HEK293T-TLR3細胞上で得られる染色を示す。31C3抗TLR3抗体の代わりに対照アイソタイプ抗体とともにインキュベートした細胞は未染色であった。

40

【0278】

透過性細胞内の抗体31C3を使用して得られた染色は、本抗体が、細胞内の細胞内ヒトTLR3を特異的に認識し、かつそれに結合することを示す。

【0279】

実施例7—動力学的試験

別の一連のアッセイを実施し、本発明に従う抗体の阻害の動力学を判定した。要するに、MdDCを、抗TLR3抗体(31C3もしくは23C8、 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度で)およびある用量範囲のポリAUとともに、様々な時間設定でインキュベートした。次いで、培地を24時間インキュベートし、IP-10分泌をELISAによって測定した。図

50

12Aは、31C3抗体における ng/ml （ポリAU用量に依存する）でのIP-10分泌を示し、図12Bは、23C8抗体における結果を示す。

【0280】

予備刺激：抗TLR3抗体を、dsRNAの添加前に1時間30分間インキュベートした。

【0281】

同時刺激：抗TLR3抗体およびdsRNAを同時に添加した。

【0282】

刺激後：dsRNAを、抗TLR3抗体の添加前に1時間30分間インキュベートした。

【0283】

これらの結果は、本発明に従う抗体が、dsRNAのTLR3タンパク質への結合状態と無関係に、TLR3阻害にとって効率的であることを明示する。本抗体は、dsRNAの結合部位と競合することがないばかりか、dsRNAがTLR3タンパク質に既に結合されている場合であっても、TLR3シグナル伝達を阻害することができる。

【0284】

実施例8-TLR3内在化アッセイ

要するに、抗体なしまたは $50\mu\text{g/ml}$ の抗TLR3抗体31C3のいずれかを、生存293T-ISR/TLR3細胞系とともに、 37°C で2時間または24時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、固定し、Beckman Coulter製のIntraPrep透過性試薬を使用して透過処理した。TLR3に結合された抗TLR3 31C3抗体の存在を、APCで標識したヤギ抗マウス抗体を用いて明らかにする。あるいは、透過性細胞を、対照アイソタイプ、または、TLR3への結合において31C3抗体と競合しない、FACSにおいて有効なTLR3に特異的なmAb（双方ともビオチンで標識）のいずれかとともにインキュベートし、蛍光ストレプトアビジン誘導体との細胞のインキュベーションを通じてさらに明らかにした。グラフを図12に示す。図12Aは陰性対照を示し、それは、TLR3タンパク質に結合する抗体の不在下での293T-ISR/TLR3細胞の蛍光強度を示す。図12CおよびDは、24時間または2時間のインキュベーション後の、内在化された31C3抗体のTLR3タンパク質への結合によって誘発される蛍光をそれぞれ示す。図12Bは、31C3抗体との予備インキュベーションを伴わない場合での、293T-ISR/TLR3細胞系におけるTLR3発現の安定状態レベルを示す。図12Bの場合より類似した蛍光を示す図12Dおよび12Fでは、抗体31C3によるTLR3への結合が、293T-ISR/TLR3細胞系におけるTLR3の発現を下方調節しないことが確認される。

【0285】

それらの結果は、本発明に従う抗体が迅速かつ効率的に内在化されるとともに、さらに一切のhTLR3の下方調節を伴わないことを示す。これらの結果は、本発明に従う抗体の結合の効率を明示する。さらに、この迅速な内在化は、抗体が治療にとっての有望な候補であるという証拠を提供する。かかる抗体はまた、毒性剤とのカップリングにとっての有望な候補であり、それにより、TLR3発現細胞の特異的標的化を可能にする。

【0286】

すべての見出しおよび小見出しは、あくまで便宜的に本明細書で使用され、決して本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。上記要素のそのすべての考えられる変形における任意の組み合わせは、本明細書中で他に指定されないかまたは他に文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明によって包含される。本明細書中の値の範囲の記載は、本明細書中で他に指定されない限り、あくまで同範囲内に含まれる独立した各値を個別に参照する略記方法として役立つことを意図しており、独立した各値は、あたかもそれが本明細書中で個別に記述されるように、本明細書中に援用される。特に指定のない限り、本明細書中に提供されるすべての正確な値は、対応する近似値を代表する（例えば、特定の要素または測定値に関連して提供されるすべての正確な典型的値は、必要に応じて「約」によって修飾された、対応する近似測定値もまた提供するものと考えられうる）。

10

20

30

40

50

【0287】

本明細書中に記載のすべての方法は、本明細書中で他に指定されないかまたは他に文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施してもよい。

【0288】

本明細書中に提供される任意およびすべての例または典型的な言葉（例えば「など」）の使用は、あくまで本発明をよりよく明示することを意図したものであり、他に指定されない限り、本発明の範囲に対して限界を設けるものではない。本明細書中の言葉の中で、任意の要素が本発明の実行に対して必須であることを示すものとして、そのように明示されない限り、解釈されるべきものではない。

【0289】

本明細書中の特許文書の引用および援用は、あくまで便宜上行われ、かかる特許文書の有効性、特許性および／または権利行使可能性に関する任意の見解を反映するものではない。1つ以上の要素に対する参照などの用語を用いる、本発明の任意の態様または実施形態での本明細書中の説明は、他に指定されないかまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、その特定の1つ以上の要素に対して「からなる」、「本質的に～からなる」または「実質的に含む」といった本発明の類似の態様または実施形態へのサポートを提供することを意図している（例えば、特定の要素を含むものとしての本明細書中に記載の組成物であれば、他に指定されないかまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、その要素からなる組成物もまた説明するものとして理解されるべきである）。

【0290】

本発明は、適用可能な法律によって認可される最大の範囲までの、本明細書中に示される態様または特許請求の範囲の中に記載される、対象物のすべての修飾物および均等物を含む。

【0291】

本願中に引用されるすべての特許および特許出願は、各個別の公報または特許出願が、あたかも参照により援用されることが具体的かつ個別に示されるように、それら全体が参照により本明細書中に援用される。

【0292】

上記の発明は、理解を明確にすることを目的として、図面および例として、多少詳しく述べられているが、当業者にとっては、本発明の教示内容を踏まえて、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく特定の変化および修飾がそれに対してなされうることが容易に理解されるであろう。

10

20

30

【図 1 A】

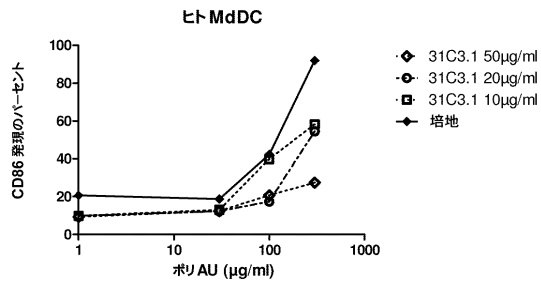


図 1A

【図 1 C】

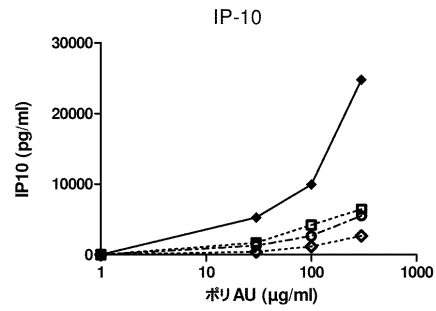


図 1C

【図 1 B】

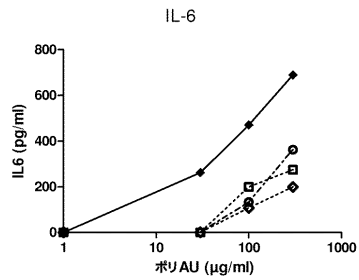


図 1B

【図 2】

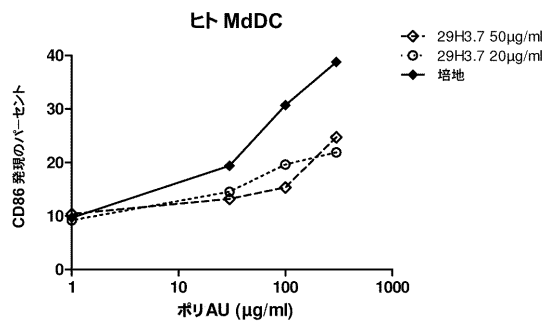


図 2A

【図 3】

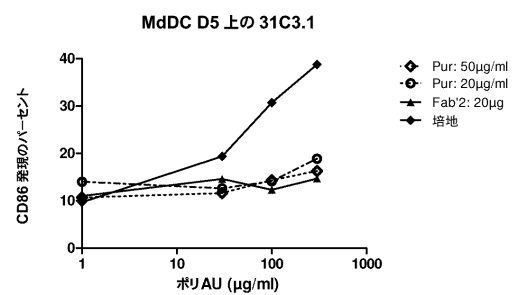


図 3A

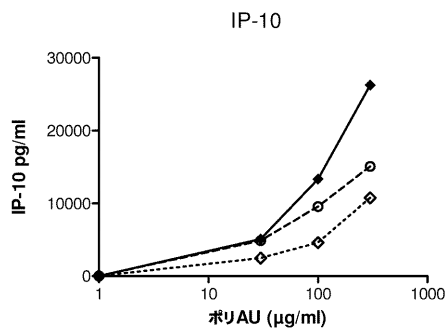


図 2B

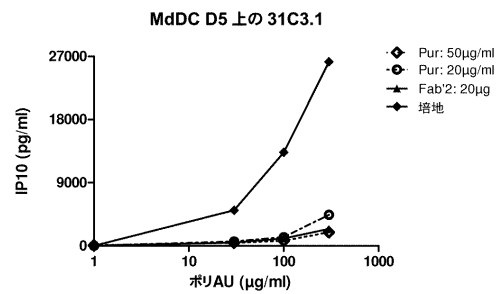


図 3B

【図 4】

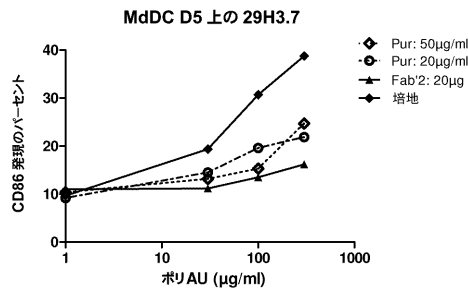


図 4A

【図 5】

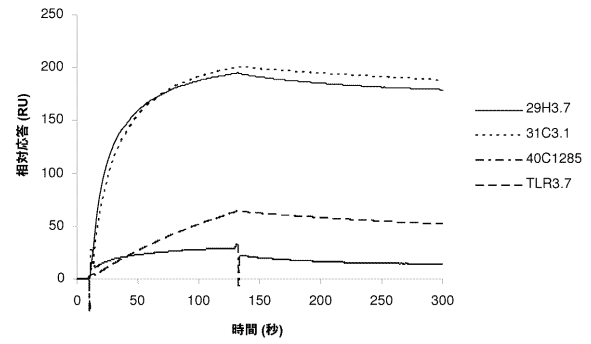


図 5

【図 6】

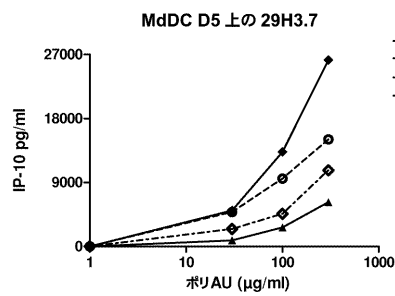


図 4B

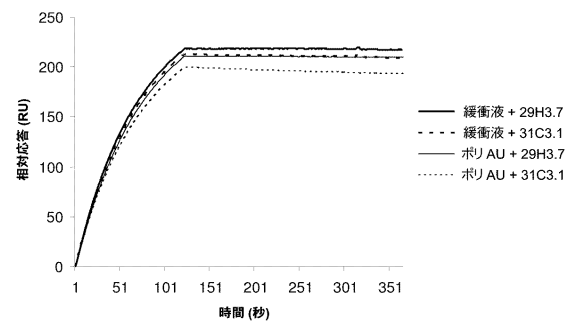


図 6

【図 7】

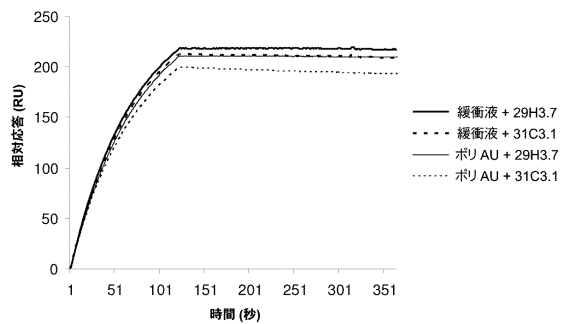


図 7

【図 8】

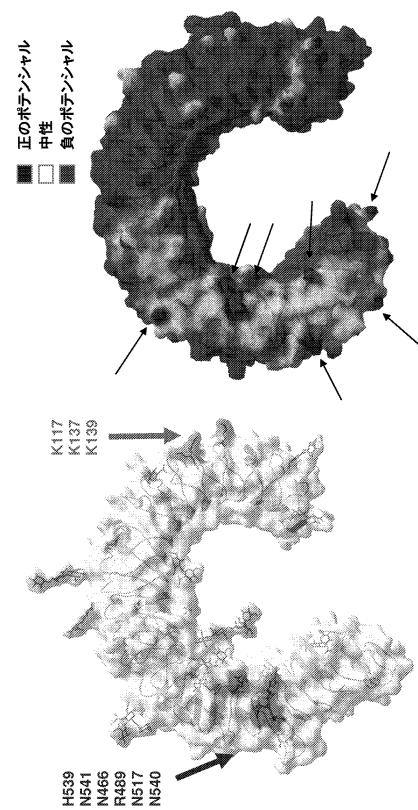


図 8

【図 9】

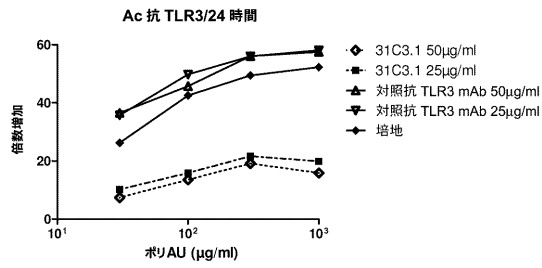


図 9

【図 10】

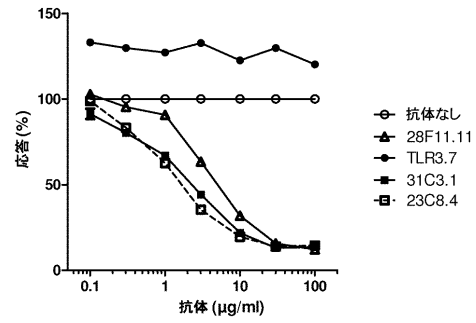


図 10A

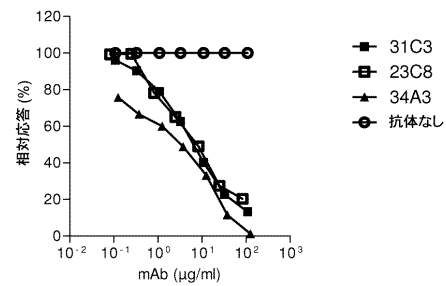


図 10B

【図 11】

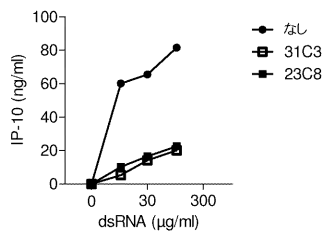


図 11 A

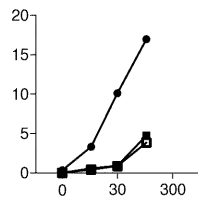


図 11 B

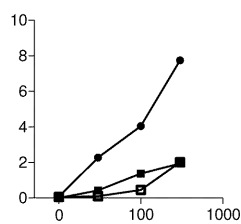


図 11 C

【図 12】

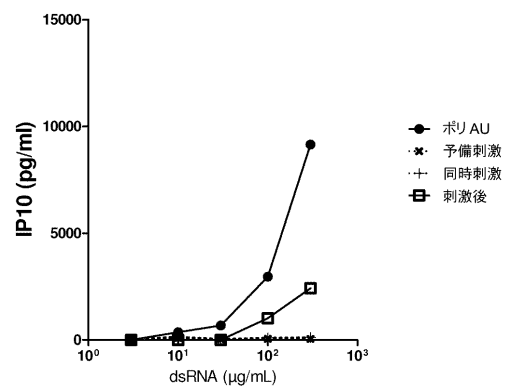


図 12A

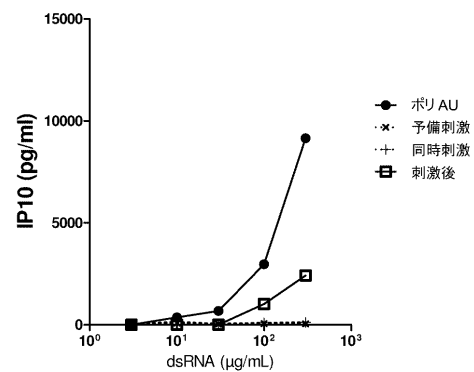


図 12B

【図 13】

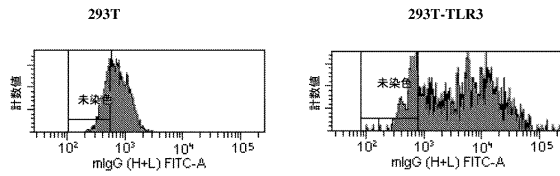


図 13A

図 13B

【図 14】

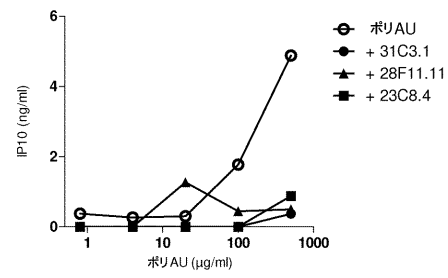


図 14A

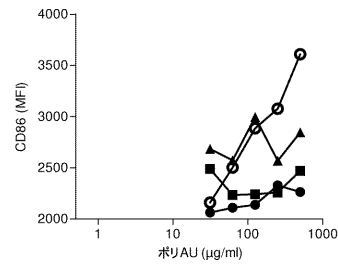


図 14B

【図 15】

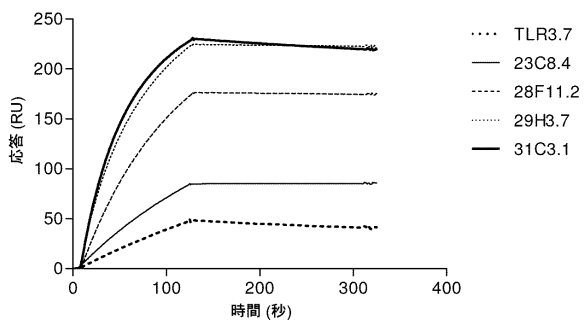


図 15A

【図 16】

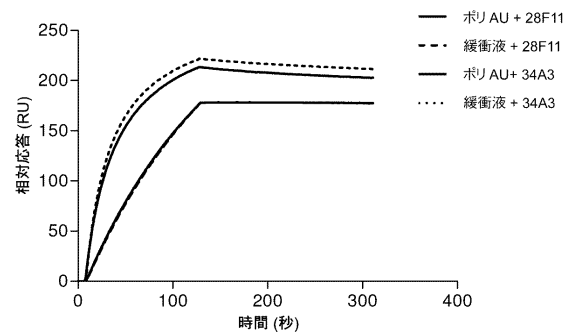


図 16A

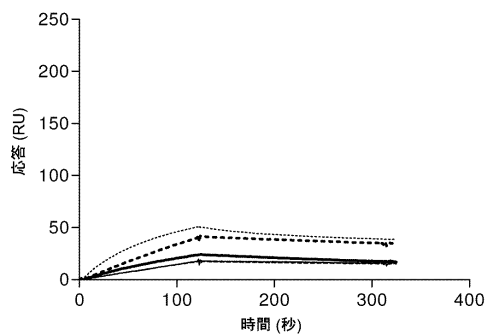


図 15B

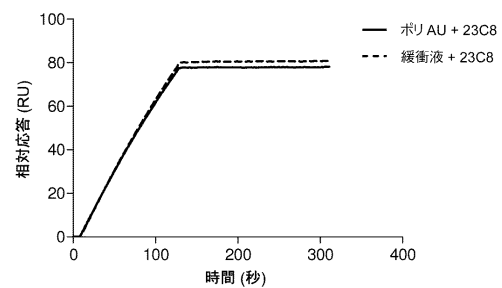


図 16B

【図 17】

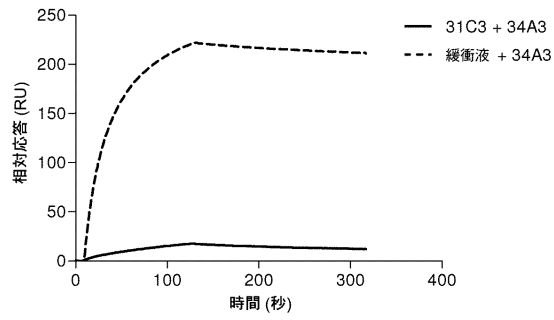


図 17

【図 18 A】

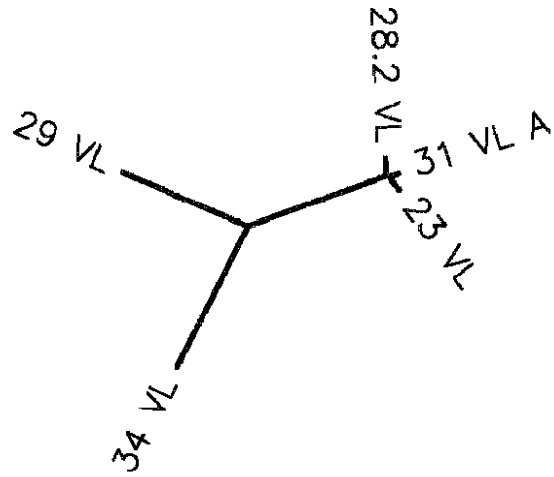


FIG. 18A

【図 18 B】

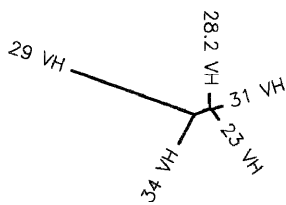


FIG. 18B

【図 19 B】

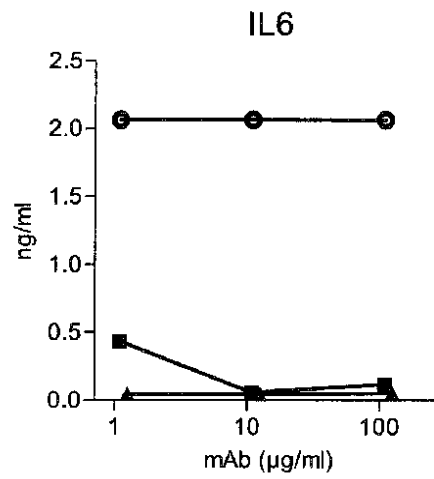


FIG. 19B

【図 19 A】

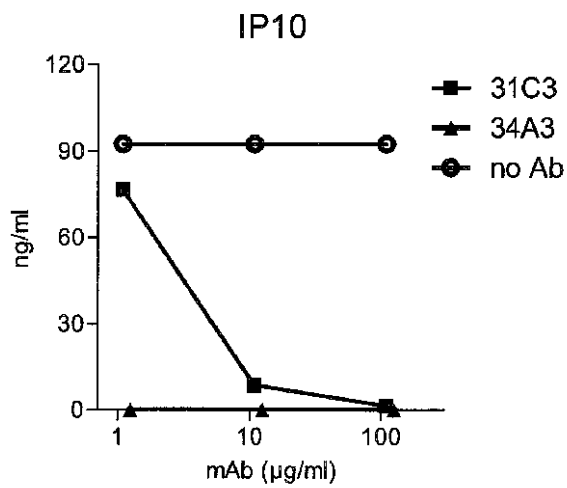


FIG. 19A

【図 20-1】

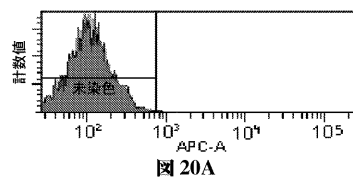


図 20A

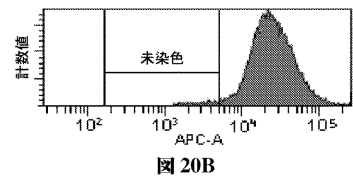


図 20B

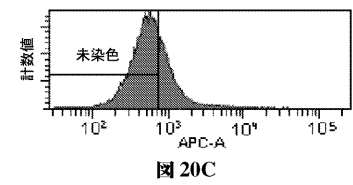


図 20C

【図 20-2】

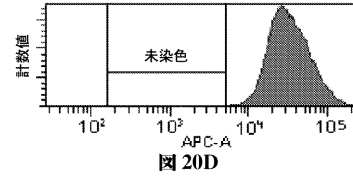


図 20D

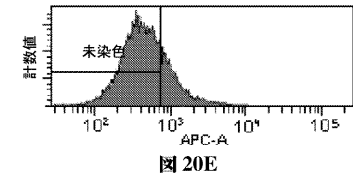


図 20E

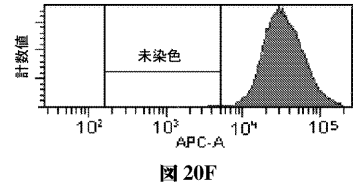


図 20F

【配列表】

0005800809000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
			C 1 2 P	21/08	

- (72)発明者 ローラン・ゴーティエ
フランス、エフー１３００８マルセイユ、ラ・サレットーバー５、アヴニユ・ドゥ・アンブール１
３９番
- (72)発明者 カトリーヌ・マッサクリエ
フランス、エフー６９１６０タサン・ラ・ドゥミ・ルヌ、リュ・フランソワ・メルメ１７ウ番
- (72)発明者 ヤニ・モレル
フランス、エフー１３００６マルセイユ、ブルヴァル・ノートル・ダム６８番
- (72)発明者 カリーヌ・パトゥレル
フランス、エフー６９２８０マルシー・ルトワール、アレー・デュ・ボワ４１１番

審査官 吉岡 沙織

- (56)参考文献 特表２００８－５２１４４０（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５２５４２５（ＪＰ，Ａ）
Cellular Immunology, ２００７年, Vol.248, P.103-114
Molecular Immunology, ２００７年, Vol.44, P.3633-3640

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K
A 6 1 K ３ 9 /
UniProt/GeneSeq
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)