

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-90534
(P2018-90534A)

(43) 公開日 平成30年6月14日(2018.6.14)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|------------------------------|-------------|-------------|
| C07K 16/28 (2006.01) | C07K 16/28 | ZNA 4C085 |
| A61K 39/395 (2006.01) | A61K 39/395 | D 4H045 |
| A61P 37/06 (2006.01) | A61K 39/395 | U |
| A61P 1/16 (2006.01) | A61P 37/06 | |
| A61P 29/00 (2006.01) | A61P 1/16 | |

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-235262 (P2016-235262)
(22) 出願日 平成28年12月2日 (2016.12.2)

特許法第30条第2項適用申請有り 平成28年11月14日に日本免疫学会総会・学術集会記録 第45巻プログラムを発行

(71) 出願人 504137912
国立大学法人 東京大学
東京都文京区本郷七丁目3番1号
(74) 代理人 100079108
弁理士 稲葉 良幸
(74) 代理人 100109346
弁理士 大貫 敏史
(74) 代理人 100117189
弁理士 江口 昭彦
(74) 代理人 100134120
弁理士 内藤 和彦
(72) 発明者 三宅 健介
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗TLR9抗体、医薬組成物及びキット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 TLR9を標的とする新規な抗体の提供。

【解決手段】 TLR9のN末端を認識する抗体で、TLR9のN末端が、特定のアミノ酸配列、1又は複数のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列；及び特定のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、N末端認識抗体は、複数の特定の配列で表されるアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列；及び特定の配列のいずれかで表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する抗体。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T L R 9 の N 末端を認識する、抗体。

【請求項 2】

T L R 9 の N 末端における 1 位 ~ 3 5 6 位の領域を認識する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

T L R 9 の N 末端における 2 4 3 位 ~ 3 5 6 位の領域を認識する、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

T L R 9 の N 末端が、以下の少なくとも 1 つのアミノ酸配列である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体： 10

(a) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列において、1 又は複数のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列；及び

(c) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列。

【請求項 5】

以下の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体：

(a) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列； 20

(b) 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列；

(c) 配列番号：6 で表されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号：8 で表されるアミノ酸配列；

(e) 配列番号：1 0 で表されるアミノ酸配列；

(f) 配列番号：1 2 で表されるアミノ酸配列；

(g) 配列番号：2、4、6、8、及び 1 0 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 又は複数のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列；及び

(h) 配列番号：2、4、6、8、及び 1 0 のいずれかで表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列。

【請求項 6】 30

T L R 9 の N 末端が、マウス T L R 9 の N 末端である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体を含む、T L R 9 に関連する疾患の治療又は予防に用いられる医薬組成物。

【請求項 8】

T L R 9 に関連する疾患が、全身性エリテマトーデス、乾癬、又は非アルコール性脂肪性肝炎である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体を含む、T L R 9 に関連する疾患の診断に用いられるキット。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、抗 T L R 9 抗体、医薬組成物及びキットに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

T o l l 様受容体 (Toll-like receptor ; T L R) は病原体センサーの一つのファミリーを形成しており、病原体成分に应答して活性化シグナルを誘導し、感染防御反応を誘導する。T L R は感染防御に重要であるばかりでなく、自己免疫疾患などの病態における炎 50

症誘導にも関わっている。

【0003】

約10種類のTLRのうちTLR3、TLR7、TLR8、及びTLR9は、細胞内小器官である小胞体に分布し、細菌やウイルス由来の核酸を認識する。TLR7及びTLR8は1本鎖RNAを認識し、TLR9はCpGモチーフを含む非メチル化1本鎖DNA(CpG-DNA)を認識する。しかし、ウイルス特有の2本鎖RNAとは異なり、一本鎖RNAやDNAは宿主由来の核酸と大きな違いはなく、TLRによるリガンド認識機構が厳密に制御されなければ、自己に対する反応を惹起し、自己免疫疾患に陥ってしまう。

【0004】

この点、TLR9による自己免疫反応は、核酸を認識する場所をエンドリソソームに限定することによって調節されている(非特許文献1)。定常時、細胞外にある自己の核酸は急速に分解されるため、細胞内のエンドリソソームには到達せず、TLR9には認識されない。一方、微生物の核酸は、細菌の細胞壁やウイルス粒子に保護されているのでエンドリソソームに到達し、そこで初めて放出され、TLR9に認識される。

10

【0005】

これに対し、抗微生物ペプチドや自己抗体との相互作用によって自己の核酸が分解に耐性を有するようになり、エンドリソソームに到達できるようになると、TLR9依存性自己免疫反応が引き起こされる。実際、TLR9については、乾癬や全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)との関連が示唆されている(非特許文献2)。

20

【0006】

したがって、TLR9は、乾癬やSLE等のTLR9依存性自己免疫疾患の治療標的と考えられ、これまでにTLR9の発現や機能を抑制する様々な方法が提案されている。具体的には、TLR9に対して拮抗作用を持つオリゴDNAや、TLR9の発現を抑制するマイクロRNA等を用いた方法が試みられている。しかしながら、一般に核酸医薬の安全性は未知数であり、また、TLR9の機能を完全に抑制すると、感染症等の危険性を招く可能性も否定できない。

【0007】

安全性及び特異性の面では抗体医薬が望ましいが、上述のとおり、TLR9は、自己免疫反応を制限するためにエンドリソソームに局在し、細胞表面からは隔絶されており、細胞表面にのみ作用する抗体は使用できないと考えられており、TLR9に対する抗体医薬を使用する試みはこれまでほとんどなされていない。

30

【0008】

また、TLR9の機能を発現するためには、TLR9の細胞外ドメインがエンドリソソーム内でカテプシン等により切断されることが必要であることが報告されている(非特許文献3)。すなわち、TLR9の機能を発現するために、主としてTLR9のC末端側が重要であると考えられていた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

40

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

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

【非特許文献3】Ewald, S. E. et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. Nature 456, 658-662 (2008)..

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、TLR9を標的とする新規な抗体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

50

本発明者らは、上記課題を解決するために研究を重ねた結果、驚くべきことに、TLR 9 から切断される、細胞外領域であるN末端を認識する抗体がTLR 9 応答抑制効果を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

即ち、本願は以下の発明を包含する。

〔1〕 TLR 9 のN末端を認識する、抗体。

〔2〕 TLR 9 のN末端における1位～356位の領域を認識する、〔1〕に記載の抗体。

〔3〕 TLR 9 のN末端における243位～356位の領域を認識する、〔1〕又は〔2〕に記載の抗体。

〔4〕 TLR 9 のN末端が、以下の少なくとも1つのアミノ酸配列である、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の抗体：

(a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列；及び

(c) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列。

〔5〕 以下の少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の抗体：

(a) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列；

(c) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列；

(e) 配列番号：10で表されるアミノ酸配列；

(f) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列；

(g) 配列番号：2、4、6、8、及び10のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列；及び

(h) 配列番号：2、4、6、8、及び10のいずれかで表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列。

〔6〕 TLR 9 のN末端が、マウスTLR 9 のN末端である、〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の抗体。

〔7〕 〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の抗体を含む、TLR 9 に関連する疾患の治療又は予防に用いられる医薬組成物。

〔8〕 TLR 9 に関連する疾患が、全身性エリテマトーデス、乾癬、又は非アルコール性脂肪性肝炎である、〔7〕に記載の医薬組成物。

〔9〕 〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の抗体を含む、TLR 9 に関連する疾患の診断に用いられるキット。

【発明の効果】

【0013】

TLR 9 のN末端側を認識する抗体は、*in vitro*の骨髓由来マクロファージ (BM-MCs) において、TLR 9 アゴニストであるCpG-Bとともに投与した場合でもTLR 9 応答を阻害し、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor; TNF) - の産生を抑制した。

【0014】

また、かかる抗体のTLR 9 応答抑制効果は*in vivo*でも同様に確認された。具体的には、TLR 9 アゴニスト (CpG-B及びD-ガラクトサミン) を投与されたマウスは、肝細胞由来マクロファージから産生されるTNF によって誘導される肝細胞アポトーシスにより個体死に至るが、かかる抗体を投与することで、血清中のTNF やIL-12p40などのサイトカインの産生が有意に抑制され、結果としてマウスの個体死が回避されることが明らかとなった。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

これらの結果は、本発明の抗体は T L R 9 が異常に活性化される病態を制御し得ることを示唆している。例えば、S L E の誘導は、D N A 分解酵素遺伝子の欠損による D N A 蓄積が D N A センサーを刺激し、これにより I 型 I F N が産生されることが一因として考えられるが、本発明の抗体は D N A センサーである T L R 9 を制御することができるため、S L E の治療又は予防等に使用可能であると考えられる。

【 0 0 1 6 】

このように、本発明に係る抗体によれば、細胞表面に存在する T L R 9 の機能を阻害して、T L R 9 に関連する疾患を予防又は治療することが可能である。また、本発明に係る抗体は、T L R 9 に対する特異性が高いため、安全性に優れる。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 7 】

【 図 1 】 抗体の特異性を検証するためにマウス脾臓の cDC を用いて、TLR9 の発現を明らかにした実験結果である。

【 図 2 】 脾臓 cDC を用いて、TLR9 の免疫沈降実験を行った結果である。

【 図 3 】 TLR9 抗体 (B33A4、J15A7) を用いた、染色阻害実験を行った結果である。

【 図 4 】 NaR9 の TLR9 応答抑制効果を検証するために、野生型マウスより BM-MCs を誘導した実験結果である。

【 図 5 】 NaR9 による *in vivo* での TLR9 応答抑制効果を検証するために、CpGB と D-(+)-Galactosamine をマウスに投与する実験を行った結果である。

20

【 図 6 】 リガンド刺激後、1、3、6 時間後の血中の TNF- α を測定した結果である。

【 図 7 】 マウス TLR9 と ヒト TLR9 のキメラ TLR9 を作製したキメラ TLR9 である。

【 図 8 】 キメラ TLR9 に対する NaR9 抗体の結合を調べることによって NaR9 抗体のエピトープを解析した結果である。

【 図 9 】 N a R 9 抗体の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 4) である。

【 図 1 0 】 N a R 9 抗体の重鎖の塩基配列 (配列番号 1 5) である。

【 図 1 1 】 N a R 9 抗体の軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 6) である。

【 図 1 2 】 N a R 9 抗体の軽鎖の塩基配列 (配列番号 1 7) である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 8 】

30

〔 抗体 〕

T L R 9 の機能を発現するために、主として T L R 9 の C 末端側が重要であると考えられていたところ、本発明に係る抗体は、T L R 9 の N 末端、特にエンドリソソーム内で切断される細胞外メイン及びその周辺を認識し得る。以下、本発明に係る抗体は、「N 末端認識抗体」又は「抗 T L R 9 抗体」ともいう。

【 0 0 1 9 】

本明細書において、「T L R 9 の N 末端」とは、T L R 9 のタンパク質において、アミノ基が結合しておらず、かつカルボキシル基が結合しているアミノ酸単位側の構造、特に、エンドリソソーム内で切断される細胞外ドメインのうち、T L R 9 の N 末端における 4 4 0 位又は 4 5 4 位の領域より前半を意味する。なお、細胞外ドメインとは、T L R 9 の N 末端から 1 位 ~ 8 1 8 位の領域を意味する。また、「T L R 9 の C 末端」とは、T L R 9 のタンパク質において、カルボキシル基が結合しておらず、かつアミノ基が結合しているアミノ酸単位側の構造、特に、T L R 9 から細胞外ドメインを除いた構造を意味する。

40

【 0 0 2 0 】

T L R 9 のタンパク質において、アミノ基が結合しておらず、かつカルボキシル基が結合しているアミノ酸単位を 1 位として、T L R 9 の N 末端から T L R 9 の C 末端へ向けて、2 位、3 位という。

【 0 0 2 1 】

N 末端認識抗体は、例えば、T L R 9 の N 末端における 1 位 ~ 1 6 6 位、1 位 ~ 2 4 2 位、1 位 ~ 3 0 6 位、1 位 ~ 3 5 6 位、1 位 ~ 4 4 0 位の領域を認識し、好ましくは 1 位

50

～ 3 5 6 位の領域を認識し、より好ましくは 1 6 7 位～ 3 5 6 位の領域を認識し、さらに好ましくは 2 4 3 位～ 3 5 6 位の領域を認識する。

【 0 0 2 2 】

N 末端認識抗体は、具体的に、以下の少なくとも 1 つのアミノ酸配列である T L R 9 の N 末端を認識する。

(a) 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列

(b) 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列において、 1 又は複数のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列

(c) 配列番号： 1 で表されるアミノ酸配列と 8 0 % 以上、好ましくは 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列

10

【 0 0 2 3 】

T L R は、マウスで 1 2 種類、ヒトで 1 0 種類のファミリーが知られている。 T L R 1、 T L R 2、 T L R 4、 T L R 5、及び T L R 6 は細胞表面に分布し、細菌膜成分であるリポタンパク質、 L P S 等の糖脂質、フラジェリン等のタンパク質を認識する。 T L R 3、 T L R 7、 T L R 8、及び T L R 9 は細胞内小器官である小胞体に分布し、細菌やウイルス由来の核酸を認識する。また、 T L R は I 型の膜タンパク質で細胞外に Leucine rich repeat (L R R) を有する。

【 0 0 2 4 】

N 末端認識抗体は、マウス T L R 9 やヒト T L R 9、マウス/ヒトのキメラ T L R 9 の N 末端を認識するが、 T L R 9 の N 末端であれば特に限定されない。例えば、 N 末端認識抗体が認識する T L R 9 の N 末端は、図 7 に示すマウス/ヒトのキメラ T L R 9 の N 末端である。

20

【 0 0 2 5 】

N 末端認識抗体は、 T L R 9 の N 末端を認識するものであれば特に限定されないが、例えば、以下の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む。

(a) 配列番号： 2 で表されるアミノ酸配列

(b) 配列番号： 4 で表されるアミノ酸配列

(c) 配列番号： 6 で表されるアミノ酸配列

(d) 配列番号： 8 で表されるアミノ酸配列

(e) 配列番号： 1 0 で表されるアミノ酸配列

(f) 配列番号： 1 2 で表されるアミノ酸配列

(g) 配列番号： 2、 4、 6、 8、 1 0、及び 1 2 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、 1 又は複数のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列

30

(h) 配列番号： 2、 4、 6、 8、 1 0、及び 1 2 のいずれかで表されるアミノ酸配列と 8 0 % 以上、好ましくは 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列

【 0 0 2 6 】

N 末端認識抗体は、重鎖 C D R 1 ~ 3 及び軽鎖 C D R 1 ~ 3 の少なくとも 1 つ、好ましくは重鎖 C D R 1 ~ 3 の少なくとも 1 つ、より好ましくは重鎖 C D R 3 に、上記 (a) ~ (c) のアミノ酸配列を含むものであってもよい。

【 0 0 2 7 】

40

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

50

で置換されるアミノ酸（システイン酸等）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0028】

本明細書において、「1又は複数のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有する」という場合、欠失、置換等されるアミノ酸の個数は、結果として得られるCDRのセットが抗原認識機能を保持する限り特に限定されない。また、ここでの「複数」は、2以上の整数を意味し、好ましくは、数個例えば2～5個、より好ましくは2個、3個、4個である。各CDRにおける欠失、置換又は付加の位置は、結果として得られるCDRのセットが抗原認識機能を保持する限り、N末端でも、C末端でも、その中間であってもよい。

【0029】

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

10

【0030】

N末端認識抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。また、N末端認識抗体は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEのいずれのアイソタイプであってもよい。

【0031】

N末端認識抗体は、細胞表面のTLR9にそれぞれ結合してその機能を阻害する限り、マウス抗体、ヒト型CDR移植抗体、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体、又は完全ヒト抗体であってもよく、低分子抗体であってもよいが、これらに限定されない。

20

【0032】

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

【0033】

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

30

【0034】

〔抗体の作製方法〕

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

40

【0035】

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

【0036】

50

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

【0037】

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

10

【0038】

エピトープの配列を決定することができれば、これに特異的に結合する抗体 Y は、公知の方法にしたがって当業者が作製することができる。例えば、エピトープ配列を含むペプチドを固相担体に固定し、当該ペプチドと種々の抗体の結合を検出することにより、同一エピトープに特異的に結合する抗体を得ることができる。

【0039】

ここで、「種々の抗体」としては、動物を抗原タンパク質又はその部分ペプチドで免疫することによって得たものを用いてもよいし、ファージディスプレイ法によって作製した抗体ライブラリ又は抗体フラグメントライブラリを用いてもよい。ファージディスプレイ法によるライブラリを用いる場合、エピトープ配列を含むペプチドを固相担体に固定しパニングを繰り返すことによって、同一エピトープに特異的に結合する抗体 Y を得ることもできる。

20

【0040】

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

【0041】

例えば、ヒト型キメラ抗体の場合、マウス抗体を産生するハイブリドーマの m R N A から逆転写酵素により c D N A を合成し、重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (L H) を P C R でクローニングして配列を解析する。次に、一致率の高い抗体塩基配列から、リーダー配列を含む 5 ' プライマーを作製し、5 ' プライマーと可変部 3 ' プライマーによって上記 c D N A から、シグナル配列から可変領域の 3 ' 末端までを P C R でクローニングする。一方で、ヒト I g G 1 の重鎖及び軽鎖の定常領域をクローニングし、重鎖と軽鎖それぞれについて、マウス抗体由来可変領域と、ヒト抗体由来定常領域とを P C R による Overlapping Hanging法で連結し、増幅する。得られた D N A を適当なベクターに挿入し、これを形質転換して、ヒト型キメラ抗体を得ることができる。

30

【0042】

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

40

【0043】

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

【0044】

50

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

【0045】

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

10

【0046】

N末端認識抗体が低分子抗体である場合、該低分子抗体をコードするDNAを用いて上記方法で発現させてもよいし、また、全長の抗体をパブリン、ペプシン等の酵素で処理して作製してもよい。

【0047】

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

20

【0048】

〔医薬組成物〕

本発明に係る医薬組成物は、N末端認識抗体を含み、TLR9に関連する疾患の治療又は予防に用いられる。

【0049】

TLR9に関連する疾患の治療又は予防に用いられるか否かは、当業者が適宜決定することができる。例えば、実施例に示される方法にしたがって、(i)得られた抗体が細胞表面のTLR9に結合するか否か；(ii)免疫細胞をTLR9のリガンドによって刺激しつつ、得られた抗体と接触させたときに、免疫細胞から分泌される炎症性サイトカイン量が抑制されるか否か；(iii)B細胞をTLR9のリガンドによって刺激しつつ、得られた抗体と接触させたときに、B細胞の増殖が抑制されるか否か；及び、(iv)炎症性疾患モデル動物に得られた抗体を投与することによって、病態が改善されるか否か、の少なくとも1つを確認することにより、TLR9に関連する疾患の治療又は予防に用いられるかを決定できる。

30

【0050】

TLR9に関連する疾患としては、各種の自己免疫疾患（関節リウマチ（RA）、全身性エリテマトーデス（SLE）、強皮症、多発性筋炎、シェーグレン症候群（SS）、ANCA関連性血管炎、ベーチェット病、川崎病、混合性クリオグロブリン血症、多発性硬化症（MS）、ギランバレー症候群、筋無力症、1型糖尿病、バセドウ病、橋本病、アジソン病、IPEX、APS type - II、自己免疫性心筋炎、間質性肺炎、気管支喘息、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、アトピー性皮膚炎、溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、特発性若年性関節炎の多関節炎型等）や、移植片拒絶、移植片対宿主病（GVHD）が挙げられる。

40

【0051】

この中でも、その発症の機序に特にTLR9が関与する、SLEや乾癬、NASHへの

50

用途が有望である。例えば、理論に拘束されることを意図するものではないが、N末端認識抗体は、細胞表面のTLR9を認識し、当該細胞のTLR9応答を阻害することにより、免疫の異常な活性化を抑制してTLR9に関連する乾癬の治療又は予防に寄与すると考えられる。

【0052】

例えば、SLEやその関連疾患である全身性強皮症に対しては、従来からプレドニゾン等のステロイド剤が用いられている。また、生物学的製剤としてB細胞の活性化に関わるBリンパ球刺激因子(Bly s)に対する抗体のベリムマブも用いられている。しかし、いずれも抵抗性の症例がある。したがって、このような疾患に対して、新たな分子を標的とする治療薬が求められている。

10

【0053】

ここで、SLEではI型インターフェロン(Interferon; IFN)を過剰に産生している。I型IFNを産生している細胞は、pDCs(plasmacytoid dendritic cells)であり、その産生はDNAによる刺激で誘導されている。N末端認識抗体は、pDCsに発現しているDNAセンサーとしてのTLR9を治療標的とすることができるため、SLEの治療又は予防に有用である。

【0054】

本発明に係る医薬組成物は、N末端認識抗体を有効成分として含み、薬学的に許容できる担体や添加物をさらに含む。

【0055】

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

20

【0056】

本発明に係る医薬組成物は、様々な形態、例えば、液剤(例えば注射剤)、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤等とすることができる。好ましい態様は、注射剤であり、それを非経口(例えば、静脈内、経皮、腹腔内、筋内)で投与することが好ましい。

30

【0057】

本明細書において、「治療又は予防」とは、疾患の治療や寛解に加え、発症の防止又は遅延、疾患の進行の防止又は遅延、及び疾患に関連する少なくとも1つの症状の緩和のうち、少なくとも1つを生じさせることを意味する。

【0058】

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

40

【0059】

(キット)

本発明に係るキットは、N末端認識抗体を含む。用途は特に限定されず、TLR9の検出や、TLR9に関連する疾患の診断に用いられる。

【0060】

50

キットは、その用途に応じて試薬や、医薬組成物と同様に担体や添加物を含んでいてもよく、更には緩衝液、容器、使用説明書等を含んでいてもよい。

【0061】

(方法)

本発明に係る方法は、N末端認識抗体を、対象に投与する工程を含む。

【0062】

本発明に係る方法においては、N末端認識抗体を本発明に係る医薬組成物として投与することができる。

【0063】

本発明に係る方法によれば、対象であるヒト又はその他の哺乳類等において、TLR9に関連する疾患を治療又は予防することができる。あるいは、本発明の方法を他の用途、例えば診断に用いてもよい。

10

【0064】

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

【実施例】

【0065】

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

20

【0066】

抗TLR9抗体の樹立、一次免疫細胞におけるTLR9の検出、及び抗TLR9抗体によるTLR9応答阻害実験

〔材料と方法〕

抗TLR9モノクローナル抗体、NaR9の作製

抗マウスTLR9モノクローナル抗体を樹立するために、BALB/cバックグラウンドのTlr9^{-/-}マウスにマウスTLR9を強制発現したBa/F3細胞 (TLR9-Ba/F3) を腹腔内投与して免疫を行った。初回の免疫で、免疫賦活剤としてComplete Freund's adjuvant (CFA)を用いた。2回目、3回目の免疫で、免疫賦活剤としてIncomplete Freund's adjuvant (IFA)を用いた。4回目の免疫で、1(PBS (リン酸緩衝生理食塩水)で懸濁したTLR9-Ba/F3を腹腔内投与した。最後の免疫から5日後、マウスの脾臓細胞とマウス骨髄腫由来細胞株SP2/Oを細胞融合した。細胞融合には石原産業株式会社より購入したセンダイウイルス由来エンベロープ蛋白 (GenomeONE-CF)を用いた。TLR9抗体を産生するハイブリドーマを選択するために、TLR9-Ba/F3を用いて細胞膜透過染色を行いフローサイトメトリーにより解析した。BIO-RADより購入したMouse antibody Isotype kitを用いてNaR9のサブクラスをIgG2a/ と決定した。

30

【0067】

マウス

野生型C57BL/6マウスは日本SLCより購入した。

C57BL/6バックグラウンドTLR9欠損マウス (Tlr9^{-/-}) は本研究室で樹立した。BALB/cバックグラウンドTlr9^{-/-}マウスは日本SLCより購入した野生型BALB/cマウスと7回交配して樹立した。マウスはSPF環境にて飼育し、すべての動物実験は東京大学医科学研究所の動物実験委員会の承認を受け倫理規定に基づいて実験を行った。

40

【0068】

試薬と抗体

CpGA 1585 (5'-G*G*GGTCAACGTTGAG*G*G*G*G*G-3', アスタリスクはホスホロチオエート化残基を示す) (配列番号19), PolyU (5'-UUUUUUUUUUUUUUUUUU-3', すべてホスホロチオエート化残基) (配列番号20)そして CpGB 1688 (5'-TCCATGACGTTCTGATGCT-3', すべてホスホロチオエート化残基) (配列番号18) はファスマックにより合成された。Loxoribine (7-allyl-7,8-dihydro8-oxo-guanosine) はEnzo Life Scienceから購入し

50

た。 Saponin と D-(+)-GalactosamineはSigma-Aldrichより購入した。 FuGene6 と DOTA P はRoche Applied Scienceより購入した。 抗マウスTLR9モノクローナル抗体であるNaR9、J15A7またはB33A4は、オリエンタル酵母株式会社より購入したヌードマウスにハイブリドーマを接種後、腹水から精製された。 Streptavidin-PE、 anti-mouse IgG1-PE、 anti-mouse IgG2a-PE、 isotype control antibodies (mouse IgG1, mouse IgG2a)、 anti-mouse CD16/32、 anti-mouse CD19-APC-Cy7、 anti-mouse CD11b-APC、 anti-mouse CD11c-APC、 anti-mouse CD11c-PE-Cy7、 anti-mouse Siglec-H-FITC、 そして anti-mouse Ly-6G-PerCP-Cy5.5 はBioLegendより購入した。 Anti-mouse B220-APC はTONBO biosciencesより購入した。 J15A7-PE、 anti-mouse CD49b-BV421とanti-mouse CD11b-BV510はBD Biosciencesより購入した。

10

【 0 0 6 9 】

細胞培養

Ba/F3 細胞はRoswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (IL-3, 10% FBS, PS/Gln そして50 μ M 2-ME添加) で培養された。 Bone marrow-derived macrophage (BM-MCs), conventional DC (cDC) またはplasmacytoid DC (pDC) は野生型 C57BL/6 マウスまたはTlr9^{-/-}マウスより誘導された。 マクロファージを誘導するために、 1×10^7 個の骨髄細胞は10cm cell culture dishes で6日間、 recombinant M-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) 100 ng/mlを加えた10% FCS-RPMI1640で培養された。 cDCまたはpDCを誘導するために 1×10^7 個の骨髄細胞は10cm cell culture dishes で7日間、 10 ng/mlの recombinant GM-CSFまたは100ng/mlのFlt3-L (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)を加えた10% FCS-RPMI1640で培養された。

20

【 0 0 7 0 】

プラスミドの構築とレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入

マウス及びヒトTLR9の配列はPCR法によって増幅され、東京大学の北村俊雄博士より分与していただいた pMXまたは pMXs レトロウイルスベクターにクローニングされた。 マウスとヒトTLR9キメラ変異体は以下のものを構築した。 TLR9₁₆₆ (マウスTLR9が1-166、ヒトTLR9が167-1016アミノ酸)、 TLR9₂₄₂ (マウスTLR9が1-242、ヒトTLR9が243-1016アミノ酸)、 TLR9₃₅₆ (マウスTLR9が1-356、ヒトTLR9が357-1016アミノ酸)、 TLR9₄₄₀ (マウスTLR9が1-440、ヒトTLR9が441-1016アミノ酸)そしてTLR9₅₄₄ (マウスTLR9が1-544、ヒトTLR9が545-1016アミノ酸)はTLR9変異体のC末端側にGFPが付加するように pMX-GFPベクターにクローニングされた。

30

プラスミドは、polyethylenimine (Polysciences, Inc.)と共にPlat-Eパッケージング細胞 1×10^5 /wellに遺伝子導入された。 二日後、ウイルスを含む培養上清をDOTAPと共にBa/F3細胞に加え、2000rpmで60分間の遠心を行った。

【 0 0 7 1 】

脾臓免疫細胞の染色とフローサイトメトリー解析

C57BL/6N系統の野生型マウスおよびTLR9ノックアウトマウスから脾臓を採取し、スライドグラスを用いて細胞を単離した。 単離した細胞を赤血球溶解バッファー (BioLegend) によって処理し、赤血球を除去した後にpurified anti-CD16/32 (BioLegend, clone 93)を用いて細胞表面のFc受容体をブロックした。

40

【 0 0 7 2 】

Fc受容体をブロックした後、Fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse SiglecH (BioLegend, 551)および Phycoerythrin (PE)-Cy7-conjugated anti-mouse CD11c (BioLegend, N418)によって染色し、CD11c陽性/SiglecH陽性の画分をpDCとした。 また、CD11c高発現/SiglecH陰性の画分をcDCとした。

【 0 0 7 3 】

細胞表面のSiglecHとCD11cを染色した後、細胞表面および細胞内部のTLR9を染色した。 細胞表面のTLR9を染める際には、非固定条件下でpurified anti-TLR9を反応させ、PE conjugated rat anti-mouse IgG2a (BioLegend, clone RMG2a-62)を2次抗体として用いた。 細胞内部のTLR9については、BD Cytotfix/Cytoperm fixatation/permeabilization soluti

50

on kitを用いて染色した。これらの細胞は染色用バッファーに置換し、LSR Fortessa X-20 (BD)によって解析を行った。

【0074】

免疫沈降およびウエスタンブロット

TLR9のタンパク質発現をウエスタンブロットにより解析した。BM-cDCは1×PBSにより2回洗浄し、回収した。回収した細胞を氷冷した溶解用緩衝液(1% Triton X 100, 20mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10% Glycerol, 1mM DTT 及び Complete protease Inhibitor Cocktail (Roche))により30分間、溶解し、高速遠心後、細胞溶解液の上清を回収した。

10

【0075】

回収した細胞溶解液を抗TLR9モノクローナル抗体(NaR9)と結合させたN-hydroxy succinimide-activated Sepharose 4FFビーズに加え、2時間、4で撹拌した。この工程により、TLR9を免疫沈降した。撹拌後、ビーズを氷冷した洗浄用緩衝液(0.1% TritonX100、20mM Tris/HCl (pH 7.4)、150mM NaCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1% Glycerol、1mM DTT)で3回洗浄した。洗浄したビーズにSDSサンプル緩衝液(125mM Tris/HCl [pH 6.8], 20% glycerol, 4% SDS, 10% 2-ME, 0.005% bromophenol blue)を加え、96で5分間加熱してタンパク質を変性処理した。これら調製したサンプルはポリアクリルアミド電気泳動して、タンパク質をPVDF膜に転写し、ウエスタンブロットした。

20

【0076】

ウエスタンブロットに使用した抗体は、マウスTLR9のTIRドメインをウサギに免疫し、回収した血清より精製した自家製のポリクローナル抗体を用いた。

【0077】

統計処理

抗体によるマウス投与実験において、抗TLR9モノクローナル抗体投与群とコントロール抗体投与群の間におけるデータの有為差検定はStudent t検定により算定した。T検定における危険率が0.01未満の場合、比較群間の差が優位であると判定した。

30

【0078】

抗TLR9モノクローナル抗体によるTLR9応答阻害実験

(試験管内試験)

細胞はBM-MCs、BM-cDCs、BM-pDCsを用いた。96well平底プレートにBM-MCs、BM-cDCs、BM-pDCsを5(10⁴)播種し、抗TLR9抗体を各々の濃度で添加した。抗体を添加してから4時間後、TLRリガンドを播種した培養細胞に加えた。TLRリガンド添加した24時間後、培養上清液を回収した。回収した培養上清液はリガンド刺激によって、産生されたサイトカインを測定するためにELISA法により検出した。

40

(生体試験)

野生型マウスにCpGBリガンドとD-(+)-Galactosamineを同時に腹腔内投与すると10時間以内に死亡することが報告されている。(Sparwasser, T. et al. Eur J Immunol 27, 1671-1679, doi:10.1002/eji.1830270712 (1997))野生型C57BL/6マウスに抗体またはPBS(リン酸緩衝溶液)を腹腔内投与し、15時間後、さらにCpGB 10nmolとD-(+)-Galactosamine 20mgを腹腔内投与した。リガンド投与前と投与後、1、3、6時間後の血液を各マウスから採取し、その血清を用いてTNF- またはIL-12p40をELISAにて測定した。

【0079】

抗体及びCDRのアミノ酸配列及び塩基配列解析

50

TLR9モノクローナル抗体NaR9のアミノ酸配列は、ジーンスクリプト社によって解析された。Ambion社製TRIzol（登録商標）Reagentを用いてハイブリドーマよりトータルRNAを回収し、TAKARA社製PrimeScript（登録商標）1st Strand cDNA Synthesis Kitを用いて、cDNAへ逆転写反応を行った。このcDNAからV_HとV_L断片を増幅し、各断片は一般的なクローニング用ベクターにクローニングされた。大腸菌に形質転換後、コロニーPCRを行い、サイズの正しいバンドの最低5クローンからプラスミドを回収し、シーケンス解析を行った。シーケンス解析から、最もコンセンサスな配列を抗体の配列として決定した。決定した抗体の配列として、図9はNaR9抗体の重鎖のアミノ酸配列（配列番号14）であり、図10はNaR9抗体の重鎖の塩基配列（配列番号15）であり、図11はNaR9抗体の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号16）であり、図12はNaR9抗体の軽鎖の塩基配列（配列番号17）である。

10

【0080】

〔結果〕

抗TLR9モノクローナル抗体の樹立とTLR9の検出

一次免疫細胞（primary immune cell）の内因性TLR9の細胞内発現を調べるため、マウスTLR9に対するモノクローナル抗体NaR9抗体を樹立した。抗体の特異性を検証するためにマウス脾臓のcDCを用いて、TLR9の発現を明らかにした。染色の特異性は、TLR9ノックアウトマウスの脾臓cDCが染色されないことによって確認した（図1）。さらに、BM-cDCを用いて、TLR9の免疫沈降実験を行った。以前樹立された、TLR9抗体（J15A7）と比較して、NaR9はより強くTLR9を免疫沈降することが示された（図2）。NaR9の認識部位を明らかにするために、まず、以前樹立されたTLR9抗体（B33A4、J15A7）を用いた、染色阻害実験を行った（B33A4及びJ15A7については、国際公開第2014/174704号公報を参照する。）。NaR9のTLR9染色は、J15A7の細胞前処理によって阻害された（図3）。同様に、J15A7のTLR9染色は、NaR9の細胞前処理によって阻害された（図3）。以上の結果より、新規に樹立されたNaR9は一次免疫細胞のTLR9を認識し、細胞染色や免疫沈降に利用できること、J15A7と抗原認識部位が近いことが判明した。

20

【0081】

抗TLR9モノクローナル抗体によるTLR9応答阻害実験（1）

NaR9のTLR9応答抑制効果を検証するために、野生型マウスよりBM-MCsを誘導し実験に用いた。NaR9を前投与した群では、BM-MCsでCpGBまたはCpGA応答によるTNF- α 及びIL-12 p40産生を抗体濃度依存的に抑制した（図4）。BM-cDCについても同様の結果が得られた（結果は示さず）。一方、TLR7リガンドのLoxoribine応答に影響はしなかった。一方、BM-pDCについてはNaR9によるTLR9応答抑制効果は見られなかった（結果は示さず）。

30

【0082】

抗TLR9モノクローナル抗体によるTLR9応答阻害実験（2）

続いて、NaR9によるin vivoでのTLR9応答抑制効果を検証するために、CpGBとD-(+)-Galactosamineをマウスに投与する実験を行った。PBSまたはIgG2aコントロール抗体を前投与した群で、リガンド刺激後10時間内に、90%前後のマウスが死亡したのと比較して、NaR9を前投与した群は、20%まで死亡率を抑制した（図5）。さらに、リガンド刺激後、1、3、6時間後の血中のTNF- α を測定した結果、IgG2aコントロール抗体投与群と比較して、NaR9抗体投与群では、有意にサイトカイン産生を抑制していた（図6）。

40

【0083】

NaR9、可変領域のアミノ酸配列解析

ハイブリドーマ株NaR9から得られるモノクローナル抗体の重鎖アミノ酸配列を配列番号：14に、軽鎖アミノ酸配列を配列番号：16に示す。また、これらのアミノ酸配列に対応する塩基配列を配列番号15、17に示す。

また、同抗体の重鎖CDR1～3のアミノ酸配列を配列番号：2、4、6に、軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を配列番号：8、10、12に示す。また、これらのアミノ酸配列に対応する塩基配列を配列番号3、5、7、9、11、13に示す。

【0084】

50

NaR9の抗原認識部位解析

NaR9の抗原認識部位を決定するために、マウスTLR9とヒトTLR9のキメラTLR9を発現する細胞株を作製した。マウスTLR9は配列番号：1に示すTLR9のアミノ酸1位から544位（TLR9₅₄₄）、1位から454位（TLR9₄₅₄）、1位から356位（TLR9₃₅₆）、及び1位から242位（TLR9₂₄₂）までとし、C末端側をヒトTLR9の配列でそれぞれ作製し（図7）、細胞株に発現させ、各キメラTLR9とNaR9との結合をフローサイトメトリーで測定した。

結果を図8に示す。TLR9₂₄₂にはNaR9が結合しなかったが、TLR9₃₅₆には結合したことから、NaR9は、TLR9のアミノ酸配列の243位から356位の領域付近にエピトープを有すると考えられた。

【配列表フリーテキスト】

10

【0085】

配列番号：1は、マウスTLR9のアミノ酸配列を表す。

配列番号：2は、NaR9抗体の重鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

配列番号：3は、NaR9抗体の重鎖CDR1の塩基配列を表す。

配列番号：4は、NaR9抗体の重鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

配列番号：5は、NaR9抗体の重鎖CDR2の塩基配列を表す。

配列番号：6は、NaR9抗体の重鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：7は、NaR9抗体の重鎖CDR3の塩基配列を表す。

配列番号：8は、NaR9抗体の軽鎖CDR1のアミノ酸配列を表す。

配列番号：9は、NaR9抗体の軽鎖CDR1の塩基配列を表す。

20

配列番号：10は、NaR9抗体の軽鎖CDR2のアミノ酸配列を表す。

配列番号：11は、NaR9抗体の軽鎖CDR2の塩基配列を表す。

配列番号：12は、NaR9抗体の軽鎖CDR3のアミノ酸配列を表す。

配列番号：13は、NaR9抗体の軽鎖CDR3の塩基配列を表す。

配列番号：14は、NaR9抗体の重鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号：15は、NaR9抗体の重鎖の塩基配列を表す。

配列番号：16は、NaR9抗体の軽鎖のアミノ酸配列を表す。

配列番号：17は、NaR9抗体の軽鎖の塩基配列を表す。

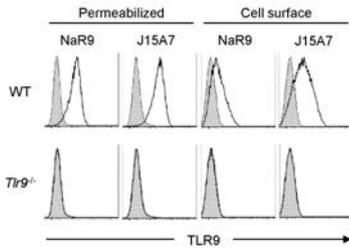
配列番号：18は、CpGBのDNA配列を表す。

配列番号：19は、CpGAのDNA配列を表す。

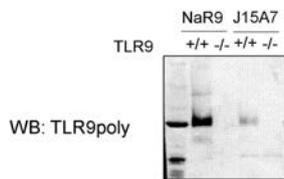
30

配列番号：20は、PolyUのRNA配列を表す。

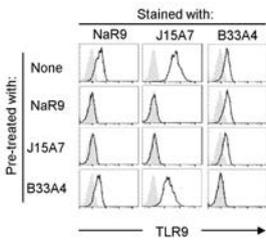
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

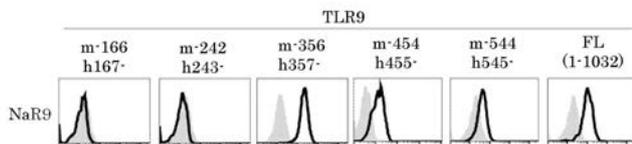


【 図 7 】

Mouse TLR9/Human TLR9 chimera staining with NaR9

| mTLR9 | Mouse LRR | Human LRR | TM | TIR |
|-------------------------|-------------------------------------|-----------|----|-----|
| mTLR9 ₁₋₃₁₆ | Mouse LRR 1 - 4 ⁹⁹ /167 | human | TM | TIR |
| mTLR9 ₁₋₂₄₂ | Mouse LRR 1 - 7 ¹⁴⁵ /243 | human | TM | TIR |
| mTLR9 ₁₋₃₅₆ | LRR 1 - 11 | 356 357 | TM | TIR |
| mTLR9 ₁₋₄₅₄ | LRR 1 - 14 | 454 455 | TM | TIR |
| mTLR9 ₁₋₅₄₄ | LRR 1 - 17 | 544 545 | TM | TIR |
| mTLR9 ₁₋₁₀₃₂ | | mouse | TM | TIR |

【 図 8 】



【 図 9 】

Heavy chain: Amino acids sequence (135 aa)

Leader sequence-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MRWSWIFLFLLSITAGVHCQVHLQSGPDLVKPGASVQMSCKTSDYTFNYYLHWVRQPGQGLEWIGWIYPGDGSKTKYNDQFRGRFTTLTADKSSSTAYMFLSSLTSEDSAIYFCAKSWDYFDYWGQGTTLTVSS

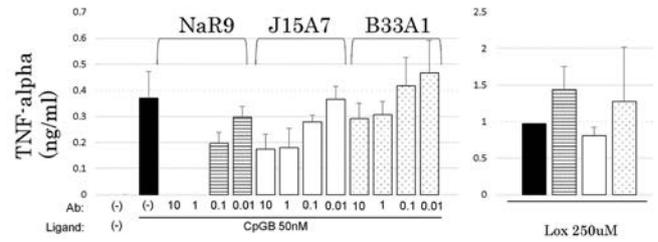
【 図 1 0 】

Heavy chain: DNA sequence (405 bp)

Leader sequence-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

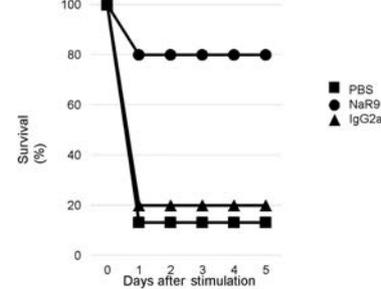
ATGCGATGGAGCTGGATCTTTCTCTCTCTCTGCAATAACTGCAGGTGCCATTGCCAGGTCCATCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGCAGATGTCCTGCAAGACTTCTGACTACACCTTCACAACTACTATTTACACTGGGTGAGGCAGAGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAGATGGTAGCACTAAGTACAATGACCAGTTCAGGGGCAGGACCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGTTCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGATCTATTTCTGTGCGAAGAGCTGGGACTATTTTGACTACTGGGGCCAAGCACCCTCTCACAGTCTCC

【 図 4 】

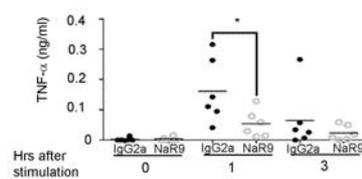


【 図 5 】

CpGB+D-(+)-galactosamine



【 図 6 】



【 図 1 1 】

Light chain: Amino acids sequence (126 aa)

Leader sequence-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MRPSIQFLGLLLFWLHGAQCDIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDIDNYIAWYQHKPGKGRLLIHYASTLQPGIPSRFSGSGSRDYSLSISNLEPEDIATYYCLQYDLDLYTFGGGKLEIK

【 図 1 2 】

Light chain: DNA sequence (378 bp)

Leader sequence-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGAGACCGTCTATTTCAGTTCCTGGGGCTCTTGTGTCTGGCTTCATGGTCTCAGTGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTCTGGGAGGCAAGTCACCATCACTTGCAGGC AAGCCAAGACATTGACAATATATAGCTTGGTACCAGCACAAAGCTGGAAAAGGTCCTAGGCTACTC ATACATTACGCATCTACATTACAGCCGGCATCCCATCAAGGTTTCAGTGGAGTGGGCTGGGAGAG ATTTATCCCTCAGCATCAGCAACCTGGAACTGAAGATATTGCAACTTATTATTGCTACAGTATGATGATCTATATACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA

【配列表】

2018090534000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード(参考) |
|-------------|-------|-----------|---------|------------|
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | A 6 1 P | 29/00 |
| | | | C 1 2 N | 15/00 |
| | | | | A |

(72)発明者 村上 祐輔

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 福井 竜太郎

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 DD62 EE01 GG01

4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA20 FA74