

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533217  
(P2004-533217A)

(43) 公表日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**C12N 15/09**  
**A61K 39/395**  
**A61P 3/10**  
**A61P 5/14**  
**A61P 5/50**

F 1

C 12 N 15/00  
A 61 K 39/395  
A 61 P 3/10  
A 61 P 5/14  
A 61 P 5/50

Z N A A  
U  
A 61 P 3/10  
A 61 P 5/14  
A 61 P 5/50

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4  
4 B 0 6 4  
4 B 0 6 5  
4 C 0 8 5  
4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 173 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-566354 (P2002-566354)  
(86) (22) 出願日 平成14年1月29日 (2002.1.29)  
(85) 翻訳文提出日 平成15年8月22日 (2003.8.22)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2002/002709  
(87) 國際公開番号 WO2002/066649  
(87) 國際公開日 平成14年8月29日 (2002.8.29)  
(31) 優先権主張番号 60/270,775  
(32) 優先日 平成13年2月22日 (2001.2.22)  
(33) 優先権主張國 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 10/044,896  
(32) 優先日 平成14年1月9日 (2002.1.9)  
(33) 優先権主張國 米国(US)

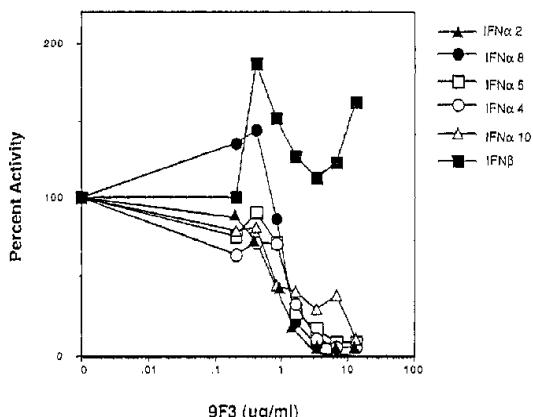
(71) 出願人 596168317  
ジェネンテック・インコーポレーテッド  
GENENTECH, INC.  
アメリカ合衆国カリフォルニア・9408  
0-4990・サウス・サン・フランシス  
コ・ディーエヌエー・ウェイ・1  
(74) 代理人 100109726  
弁理士 園田 吉隆  
(74) 代理人 100101199  
弁理士 小林 義教  
(72) 発明者 チュンサラパイ, アナン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 940  
15, コルマ, エリス ドライブ 8  
26

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗インターフェロン $\alpha$ 抗体

## (57) 【要約】

本発明は、概して、種々のIFN- $\alpha$ サブタイプに対して幅広い反応性を有する中和化抗IFN- $\alpha$ モノクローナル抗体の作製及び特徴付けに関する。本発明は、さらに、IFN- $\alpha$ の増大した発現に関連している疾患、特に、インシュリン依存性糖尿病(IDDM)及び全身性エリテマトーデス(SLE)のような自己免疫疾患の診断及び治療における、そのような抗IFN- $\alpha$ 抗体の用途に関する。

Neutralization of IFN- $\alpha$  activities by mAb 9F3

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

少なくとも IFN サブタイプ、 IFN 1、 IFN 2、 IFN 4、 IFN 5、 IFN 8、 IFN 10、 及び IFN 21 と結合し、生物学的な活性を中和する抗 IFN モノクローナル抗体。

**【請求項 2】**

マウス抗体である請求項 1 の抗体。

**【請求項 3】**

ヒト化抗体である請求項 1 の抗体。

**【請求項 4】**

ヒト抗体である請求項 1 の抗体。

10

**【請求項 5】**

前記生物学的活性が抗ウイルス活性である、請求項 1 の抗体。

**【請求項 6】**

前記抗体が前記 IFN サブタイプの抗ウイルス活性の少なくとも 70 % を中和することができる、請求項 5 の抗体。

**【請求項 7】**

前記抗体が前記 IFN サブタイプの抗ウイルス活性の少なくとも 80 % を中和することができる、請求項 5 の抗体。

20

**【請求項 8】**

前記抗体が前記 IFN サブタイプの抗ウイルス活性の少なくとも 90 % を中和することができる、請求項 5 の抗体。

**【請求項 9】**

前記抗体が前記 IFN サブタイプの抗ウイルス活性の少なくとも 99 % を中和することができる、請求項 5 の抗体。

**【請求項 10】**

マウス抗ヒト IFN モノクローナル抗体 9F3 又はそのヒト化又はキメラ型と基本的に同じ IFN エピトープと結合する、請求項 1 の抗体。

30

**【請求項 11】**

マウス抗ヒト IFN モノクローナル抗体 9F3 又はそのヒト化又はキメラ型である、請求項 1 の抗体。

**【請求項 12】**

ヒト化抗ヒト IFN モノクローナル抗体 9F3 13型 (V13) である、請求項 11 の抗体。

**【請求項 13】**

寄託番号 PTA-2917 を有し、 ATCC へ 2001 年 1 月 18 日に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産せられた抗 IFN 抗体と基本的に同じ IFN のエピトープと結合する、請求項 1 の抗体。

**【請求項 14】**

IgG クラスの請求項 1 の抗体。

**【請求項 15】**

IgG<sub>1</sub>、 IgG<sub>2</sub>、 IgG<sub>3</sub>、 又は IgG<sub>4</sub> アイソトープを有する請求項 14 の抗体。

40

**【請求項 16】**

抗体断片である請求項 1 の抗体。

**【請求項 17】**

Fab 断片である請求項 16 の抗体。

**【請求項 18】**

F(ab')<sub>2</sub> 断片である請求項 16 の抗体。

**【請求項 19】**

Fab' 断片である、請求項 16 の抗体。

**【請求項 20】**

以下の CDR :

50

( a ) 式 RASQSVSTSSYSYMH ( 配列番号 : 7 ) の L1 ;  
 ( b ) 式 YASNLES ( 配列番号 : 8 ) の L2 ; 及び  
 ( c ) 式 QHSGWGIPRTF ( 配列 : 9 ) の L3

を含んでなる、抗 IFN 抗体軽鎖又はその断片。

【請求項 2 1】

軽鎖可変ドメインである請求項 2 0 の抗 IFN 抗体軽鎖断片。

【請求項 2 2】

以下の CDR :

( a ) 式 GYTFTEYIIH ( 配列番号 : 10 ) の H1 ;  
 ( b ) 式 SINPDYDITNYNQRFKG ( 配列番号 : 11 ) の H2 ; 及び  
 ( c ) 式 WISDFFDY ( 配列番号 : 12 ) の H3

を含んでなる、抗 IFN 抗体重鎖又はその断片。

【請求項 2 3】

重鎖可変ドメインである請求項 2 2 の抗 IFN 抗体重鎖断片。

【請求項 2 4】

( A ) 以下の CDR :  
 ( a ) 式 RASQSVSTSSYSYMH ( 配列番号 : 7 ) の L1 ;  
 ( b ) 式 YASNLES ( 配列番号 : 8 ) の L2 ; 及び  
 ( c ) 式 QHSGWGIPRTF ( 配列 : 9 ) の L3

を含んでなる、少なくとも 1 つの軽鎖又はその断片 ; 及び

( B ) 以下の CDR :

( a ) 式 GYTFTEYIIH ( 配列番号 : 10 ) の H1 ;  
 ( b ) 式 SINPDYDITNYNQRFKG ( 配列番号 : 11 ) の H2 ; 及び  
 ( c ) 式 WISDFFDY ( 配列番号 : 12 ) の H3

を含んでなる、少なくとも 1 つの重鎖又はその断片を含んでなる抗 IFN 抗体。

【請求項 2 5】

2 つのジスルフィド結合抗体重鎖-軽鎖対で構成されるホモ四量体構造を有する、請求項 2 4 の抗体。

【請求項 2 6】

直鎖抗体である請求項 2 4 の抗体。

【請求項 2 7】

マウス抗体である請求項 2 4 の抗体。

【請求項 2 8】

キメラ抗体である請求項 2 4 の抗体。

【請求項 2 9】

ヒト化抗体である請求項 2 4 の抗体。

【請求項 3 0】

ヒト抗体である請求項 2 4 の抗体。

【請求項 3 1】

請求項 1 の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 3 2】

請求項 1 1 の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 3 3】

請求項 1 2 の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 3 4】

請求項 2 4 の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 3 5】

請求項 2 0 の抗体軽鎖又は軽鎖断片をコードする単離された核酸分子。

【請求項 3 6】

請求項 2 2 の抗体重鎖又は重鎖断片をコードする単離された核酸分子。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 7】**

寄託番号PTA-2882を有し、ATCCへ2001年1月19日に寄託されたベクターの軽鎖ポリペプチドコード化核酸配列を含んでなる、単離された核酸分子。

**【請求項 3 8】**

寄託番号PTA-2881を有し、ATCCへ2001年1月19日に寄託されたベクターの重鎖ポリペプチドコード化核酸配列を含んでなる、単離された核酸分子。

**【請求項 3 9】**

請求項31から38のいずれか1項に記載の核酸分子を含んでなるベクター。

**【請求項 4 0】**

請求項31から38のいずれか1項に記載の核酸分子によって形質転換した宿主細胞。

10

**【請求項 4 1】**

核酸配列が発現して抗体を産する条件下で、抗体をコードする核酸配列を含んでなる宿主細胞を培養することを含んでなる、請求項1、11、12及び24のいずれか1項の抗体を産する方法。

**【請求項 4 2】**

請求項31から38のいずれか1項に記載の核酸分子を含んでなる、ハイブリドーマ細胞株。

**【請求項 4 3】**

寄託番号PTA-2917を有し、ATCCへ2001年1月19日に寄託されたハイブリドーマ細胞株。

**【請求項 4 4】**

請求項42のハイブリドーマ細胞株によって産せられた抗体。

20

**【請求項 4 5】**

薬学的に許容可能な担体との混合物中に請求項1の抗体の有効量を含んでなる薬学的組成物。

**【請求項 4 6】**

薬学的に許容可能な担体との混合物中に請求項11の抗体の有効量を含んでなる薬学的組成物。

**【請求項 4 7】**

薬学的に許容可能な担体との混合物中に請求項12の抗体の有効量を含んでなる薬学的組成物。

30

**【請求項 4 8】**

薬学的に許容可能な担体との混合した請求項24の抗体の有効量を含んでなる薬学的組成物。

**【請求項 4 9】**

IFN を発現している細胞を請求項1の抗IFN 抗体と接触させ、IFN の存在を検出することを含んでなる、前記細胞におけるIFN の発現と関連している症状を診断する方法。

**【請求項 5 0】**

IFN を発現している患者へ請求項1の抗IFN 抗体の有効量を投与することを含んでなる、前記患者におけるIFN の発現に関連している疾患又は症状の治療に関する方法。

**【請求項 5 1】**

前記患者が哺乳動物の患者である、請求項50の方法。

40

**【請求項 5 2】**

前記患者がヒトである、請求項51の方法。

**【請求項 5 3】**

前記疾患が自己免疫疾患である、請求項52の方法。

**【請求項 5 4】**

前記疾患がインシュリン依存性糖尿病（IDDM）；全身性エリテマトーデス（SLE）；及び自己免疫甲状腺炎で構成される群から選択される、請求項53の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

50

## 【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、概して、種々のIFN- $\alpha$ サブタイプに対して幅広い活性を有する中和抗IFN- $\alpha$ モノクローナル抗体の生成及び特徴付けに関する。本発明は、さらに、IFN- $\alpha$ の増大した発現に関連した疾病、特にインシュリン依存性糖尿病(IDDM)及び全身性エリテマトーデス(SLE)等の自己免疫疾患の診断及び治療に関する。

## 【0002】

(関連する分野の説明)

(インターフェロン(IFN- $\alpha$ ))

インターフェロンは、当初、その抗ウイルス活性に関して発見されたが、その後の研究によって、その強力なサイトカインに関連する多くの制御活性が明らかにされてきた。I型インターフェロンは、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\delta$ 及びIFN- $\epsilon$ を含むサイトカインの古くからのファミリーを形成する(Robertsら, *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 805-816 [1998])。それらは、イントロンのない遺伝子によってコードされ、脊椎動物の中で広く分布している。IFN- $\alpha$ は霊長類及びげっ歯類の単一遺伝子によってコードされている一方で、10にとどまらず15の異なるサブタイプのIFN- $\alpha$ が、それぞれマウス及びヒトで見出されてきた。他のI型インターフェロンは、例えば、ブタのIFN- $\alpha$ 、ウシ及び羊のIFN- $\beta$ 、及びウシ及びヒトのIFN- $\gamma$ のように、さらに限定されている。従って、ヒトI型インターフェロンは、IFN- $\alpha$ ファミリーの複数メンバー、及びIFN- $\beta$ 及びIFN- $\gamma$ ファミリーの単一メンバーを含む。すべてのI型IFNsは、少なくとも2つの膜スパンニングプロテイン(spanning protein)で構成される単一レセプターと結合すると思われる。II型インターフェロンは、その一方で、単一メンバー、IFN- $\epsilon$ によって代表され、異なるレセプターと結合する。

## 【0003】

IFN- $\alpha$ を含むすべてのI型IFNsは、抗ウイルス及び抗増殖活性を示し、それによってウイルス感染及び腫瘍のコントロールを補助するが(Lefeuvreら, *Biochimie* 80: 779-788 [1998]; Hortonら, *Cancer Res.* 59: 4064-4068 [1999]; Alexenkoら, *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 769-779 [1997]; Gresser, *J. Leukoc. Biol.* 61: 567-574 [1997])、IFNの増大した発現に関連する幾つかの自己疾患、最も顕著なのがインシュリン依存性糖尿病(IDDM)及び全身性エリテマトーデス(SLE)もある。

## 【0004】

自己免疫糖尿病又はインシュリン依存性糖尿病(IDDM)として知られているI型糖尿病は、自己反応性Tリンパ球による膵臓細胞の選択的破壊によって特徴付けられる自己免疫疾患である(Bach, *Endocrinol. Rev.* 15: 516-542 [1994]; Castano及びEisenbarth, *Annu. Rev. Immunol.* 8: 647-679 [1990]; Shehadeh及びLafferty, *Diabetes Rev.* 1: 141-151 [1993])。IDDMの病理学は、非常に複雑で、後成的事象(恐らくはウイルス感染)、膵臓細胞、及び遺伝的に敏感な宿主の免疫系の間の相互作用に関わっている。IFN- $\alpha$ 及びIFN- $\beta$ を含む多くのサイトカインが、ヒトの病因及び疾病の動物モデルに関わってきた(Campbellら, *J. Clin. Invest.* 87: 739-742 [1991]; Huangら, *Diabetes* 44: 658-664 [1995]; Rhodes及びTaylor, *Diabetologia* 27: 601-603 [1984])。例えば、膵臓Ifn- $\alpha$ mRNA発現IDDMの患者の細胞における免疫反応性IFN- $\alpha$ の存在が、報告されている(Foulisら, *Lancet* 2: 1423-1427 [1987]; Huangら, [1995]上掲; Somozaら, *J. Immunol.* 153: 1360-1377 [1994])。IFN- $\alpha$ 発現は、ヒト島の主要組織適合性抗原(MHC)クラスI抗原の過剰発現に関わっていた(Foulisら, [1987]上掲; Somozaら, [1994]上掲)。糖尿病性DP-BBラット及びストレプトゾトシン処理マウスである、自己免疫糖尿病の2つのげっ歯類モデルでは、島でのIfn- $\alpha$ mRNA発現が膵島炎と糖尿病を先行した(Huangら, *Immunity* 1: 469-478 [1994])。さらには、ハイブリッドヒトインシュリンプロモーター-Ifn- $\alpha$ コンストラクトを有するトランスジェニックマウスは、膵島炎と付随して起こる低インシュリン糖尿病を発症する(Stewartら, *Science* 260: 1942-1946 [1993])。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 5 】

ウイルスなどの潜在的な糖尿病誘発刺激物へ応答する臍臓島細胞によるIFN- $\alpha$ の局所的発現が、糖尿病的プロセスを引き起こす可能性がある。開始剤としてのその役割と呼応して、IFN- $\alpha$ が、ヒト島から内皮細胞上で細胞間接着分子-1(ICAM-1)及びHLAクラスI $\alpha$ を誘導し、臍島炎の間に白血球浸潤に助長する(Chakrabartiら, J. Immunol. 157: 522-528 [1996])。さらに、IFN- $\alpha$ は、島の抗原表示細胞上における同時刺激分子ICAM-1及びB7.2の誘導によって、T細胞刺激を促進する(Chakrabartiら, Diabetes 45: 1336-1343 [1996])。これらの研究は、集約的に、細胞による早期のIFN- $\alpha$ 発現は、自己免疫糖尿病の惹起において重要な事象であり得ることを示している。ゲッ歯類でのIDDMの発症にIFN- $\alpha$ を関連させる多くの報告があるが、このサイトカインの発現とヒトIDDMの間の相関は弱い。従って、IFN- $\alpha$ を発現している細胞は、島への顕著なリンパ球の浸潤のために選択されたヒト患者の島の一部に見出すことができる。この基準によって選択されなかつた患者のグループでは、IFN- $\alpha$ 発現とヒトIDDMの間には明かな関連性が無かった。

## 【 0 0 0 6 】

全身性エリテマトーデス(SLE)の患者における増大したIFN- $\alpha$ 発現のレベルに基づいて、IFN- $\alpha$ は、また、SLEの病因に関連させられている(Ytterberg及びSchnitzer, Arthritis Rheum. 25: 401-406 [1982]; Shiら, Br. J. Dermatol. 117: 155-159 [1987])。興味深いことには、IFN- $\alpha$ はB型肝炎又はC型肝炎ウイルス感染による慢性肝炎等のウイルス感染だけでなく、現在は癌の治療に用いられている。自己免疫性を誘発する増大したIFN- $\alpha$ のレベルの観察と呼応し、IDDM、SLE及び自己免疫甲状腺炎等の自己免疫疾患の出現の顕著な増加が、IFN- $\alpha$ 療法を受けている患者で報告してきた。例えば、抗ウイルス療法としてのIFN- $\alpha$ の長期の使用によって、IDDM(Waguriら, Diabetes Res. Clin. Pract. 23: 33-36 [1994]; Fabrisら, J. Hepatol. 28: 514-517 [1998])又はSLE(Garcia-Pourruら, Clin. Exp. Rheumatol. 16: 107-108 [1998])が誘導されることが示されている。IFN- $\alpha$ 療法によるコクサッキー・ウイルスB(CBV)感染の治療は、やはりIDDMの誘導に関連している(Chehadehら, J. Infect. Dis. 181: 1929-1939 [2000])。同じように、IFN- $\alpha$ で治療した癌患者でのIDDM又はSLEを記録している多数ケースのレポートがある(Ronnbomら, J. Intern. Med. 227: 207-210 [1990])。

## 【 0 0 0 7 】

## 抗体療法

治療薬としてのモノクローナル抗体の用途は、ヒトへの使用又は臨床試験の後期のいずれかで許可された幾つかのモノクローナル抗体(mAbs)によって、一層受け入れられた。同種移植の拒絶反応の治療のために米国食品医薬局(FDA)によって認可された最初のmAbは、1986年の抗CD3(OKT3)である。それ以来、mAbの分野における進歩のペースはかなり加速し、特に1994年からは、ヒトの治療のためのさらに7つのmAbの認可につながっている。これらには、1994年の冠動脈血管形成術の合併症の取り扱いのためのレオプロ(ReoPro)(登録商標)、1997年の同種移植の拒絶反応の予防のためのZenapax(登録商標)(抗CD25)、1997年のB細胞非ポジティブリンパ腫の治療のためのリツキサン(Rituxan)(登録商標)(抗CD20)、最初は1998年のクローニ病の治療、続いて1999年のリュウマチ様関節炎の治療のためのインフリキシマブ(Infliximab)(登録商標)(抗TNF- $\alpha$ )、1998年の同種移植の拒絶反応の予防のためのシムレクト(Simulect)(登録商標)(抗CD-25)、1998年の呼吸性感染の治療のためのシナジス(Synagis)(登録商標)(呼吸器合胞体ウイルスの抗Fタンパク質)、1998年のHER2過剰発現転移性乳腫の治療のためのハーセプチニン(Herceptin)(登録商標)(抗HER2/neu)が含まれる(Glennie及びJohnson, Immunol. Today 21: 403-410 [2000])。

## 【 0 0 0 8 】

抗IFN- $\alpha$ 抗体

mAbsによる介入に敏感な疾患の段階には、標的抗原の病理的レベルをすべて含まれる。例えば、SLEの患者の血清に存在し、IDDMの臍臓ランゲルハンス島によって発現するIFN- $\alpha$ を中和する抗体は、これら疾患の治療介入にとって潜在的な候補である。それは、また、

10

20

30

40

50

IFN- $\beta$ 発現の潜在的な増加及び原因を含めて他の自己免疫疾患の治療的介入に用いることができる。ヒトIDDM (Foulis,ら, Lancet 2: 1423-1427 [1987]; Huang,ら, Diabetes 44: 658-664 [1995]; Somoza,ら, J. Immunol. 153: 1360-1377 [1994]) 及びヒトSLE (Hook,ら, Arthritis & Rheumatism 25: 396-400 [1982]; Kim,ら, Clin. Exp. Immunol. 70: 562-569 [1987]; Lacki,ら, J. Med. 28: 99-107 [1997]; Robak,ら, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 46: 375-380 [1998]; Shiozawa,ら, Arthritis & Rheumatism 35: 417-422 [1992]; von Wussow,ら, Rheumatology International 8: 225-230 [1988]) の双方では、疾患とIFN- $\beta$ の間には相関が見受けられるが、IFN- $\beta$ 又はIFN- $\alpha$ のいずれの間とは相関が見られなかった。従って、IDDM又はSLEにおける抗インターフェロンmAbの介入は、すべてではないが、どんなIFN- $\beta$ 又はIFN- $\alpha$ の顕著な中和もなにしに、殆どのIFN- $\beta$ サブタイプの特異的な中和を必要とするであろう。これら前出の2つのインターフェロンの活性を無傷のままにしておくことは、また、顕著な抗ウイルス活性の保持を許容することにとって有利である。10

#### 【0009】

少数のmAbsが組み換えヒトIFN- $\beta$ サブタイプの範囲と一致する反応性を示す一方で、それらは、分析された組み換えIFN- $\beta$ サブタイプの限られた一部のみを中和することが見出されたか、又は刺激を受けた末梢血白血球によって產生されるIFN- $\beta$ サブタイプの混合物を中和することはできなかった (Tsukuiら, Microbiol. Immunol. 30: 1129-1139 [1986]; Berg, J. Interferon Res. 4: 481-491 [1984]; Meager及びBerg, J. Interferon Res. 6: 729-736 [1986]; 米国特許第4,902,618号; 及び欧州特許公開第0,139,676B1号)。20

従って、他のインターフェロン生物学的機能を妨害しないが、殆ど、好ましくはすべてのIFN- $\beta$ サブタイプと結合するだけでなく、そのようなサブタイプを中和する抗IFN- $\beta$ 抗体に関する多大な需要がある。

#### 【0010】

##### (本発明の要約)

本発明は、試験された7つの異なる組み換えヒトIFN- $\beta$ サブタイプのすべて、及び2つの関連性のない天然ヒトIFN- $\beta$ サブタイプのプールを中和することが実験的に見出されたモノクローナル抗体の発生に基づいている。

一側面では、本発明は、少なくともヒトIFN- $\beta$ サブタイプIFN- $\beta$ 1, IFN- $\beta$ 2, IFN- $\beta$ 4, IFN- $\beta$ 5, IFN- $\beta$ 8, IFN- $\beta$ 10、及びIFN- $\beta$ 21と結合し、その生物学的活性を中和する抗ヒトIFN- $\beta$ モノクローナル抗体を提供する。さらなる側面では、本発明は、すべてのヒトIFN- $\beta$ サブタイプと結合し、その生物学的活性を中和する抗ヒトIFN- $\beta$ モノクローナル抗体を提供する。本発明の抗体は、該当するヒトIFN- $\beta$ の生物学的活性を顕著に低下させるか又は除く。一実施態様では、本発明の抗体は、対象であるヒトIFN- $\beta$ の生物学的活性の少なくとも60%、又は少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、なおより好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%を中和することが可能である。その他の実施態様では、ヒトIFN- $\beta$ 生物学的活性中和化モノクローナル抗体は、対応するヒトIFN- $\beta$ の生物学的活性を中和しない。30

#### 【0011】

対象であるヒトIFN- $\beta$ 類の生物学的活性は、IFNAR2結合活性である可能性がある。特定の実施態様では、本発明は、抗ヒトIFN- $\beta$ モノクローナル抗体が、すべて又は実質的にすべてのヒトIFN- $\beta$ サブタイプと結合し、そのIFNAR2結合活性の少なくとも60%、又は少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、なおより好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%をブロックすることが可能であることを示す。その他の実施態様では、本発明は、IFN- $\beta$ サブタイプ1, 2, 4, 5, 8, 10及び21と結合し、そのそれぞれのIFNAR結合活性の少なくとも60%、又は少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、なおより好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも90%40

10

20

30

40

50

好ましくは少なくとも 95%、最も好ましくは少なくとも 99% をブロックすることが可能な抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体を提供する。その他の実施態様では、抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体は、ヒト IFN- $\gamma$  と交差反応しない。

#### 【 0 0 1 2 】

対象であるヒト IFN- $\gamma$  類の生物学的活性は、抗ウイルス活性である可能性がある。一実施態様では、抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体は、すべて又は実質的にすべての IFN- $\gamma$  サブタイプと結合し、その抗ウイルス活性を中和することが可能である。その他の実施態様では、抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体は、ヒト IFN- $\gamma$  サブタイプ 1, 2, 4, 5, 8, 10 及び 21 と結合し、そのそれぞれの抗ウイルス活性を中和することが可能である。特定の実施態様では、本発明は、すべて又は実質的にすべてのヒト IFN- $\gamma$  サブタイプと結合し、その少なくとも 60%、又は少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、さらにより好ましくは少なくとも 85%、なおより好ましくは少なくとも 90%、なおより好ましくは少なくとも 95%、最も好ましくは少なくとも 99% の抗ウイルス活性を中和することが可能である。さらにその他の実施態様では、本発明は、ヒト IFN- $\gamma$  サブタイプ 1, 2, 4, 5, 8, 10 及び 21 と結合し、そのそれぞれの少なくとも 60%、又は少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、さらにより好ましくは少なくとも 85%、なおより好ましくは少なくとも 90%、なおより好ましくは少なくとも 95%、最も好ましくは少なくとも 99% の抗ウイルス活性を中和する抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体を提供する。さらにその他の実施態様では、ヒト IFN- $\gamma$  抗ウイルス中和化モノクローナル抗体は、ヒト IFN- $\gamma$  の抗ウイルス活性を中和しない。10 20

#### 【 0 0 1 3 】

抗体は、マウス、ヒト化又はヒト抗体であってもよい。抗体は、マウス抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 9F3、又はそのヒト化型、例えば 13 型 (V13) 又はそのキメラ型であり得る。本発明の範囲は、また、基本的には、マウス抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 9F3 又はそのヒト化又はキメラ型と同じように IFN- $\gamma$  エピトープと結合する抗体を含む。例えば、この目的のために引用される抗体は、2001 年 1 月 18 日に ATCC へ寄託されて寄託番号 PTA-2917 を有するマウスハイブリドーマ細胞株 9F3.18.5 によって產生される抗 IFN- $\gamma$  抗体である。その他の実施態様では、図 5 A (配列番号: 1) に示されているマウス軽鎖可変ドメインアミノ酸配列、及び / 又は図 5 B (配列番号: 2) に示されているマウス重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含むマウス又はマウス / ヒトキメラ抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体を提供する。さらにその他の実施態様では、本発明は、図 5 A (配列番号: 3) に示されているヒト化軽鎖可変ドメインアミノ酸配列、及び / 又は図 5 B (配列番号: 5) に示されているヒト化軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含むヒト化抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体を提供する。30

#### 【 0 0 1 4 】

さらに提供されているのは、基本的には、マウス抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 9F3 又はそのヒト化又はキメラ型が結合しているヒト IFN- $\gamma$  サブタイプ 1, 2, 4, 8, 10 及び 21 上の同じエピトープと結合する抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体である。さらにここで提供されているのは、ヒト IFN- $\gamma$  サブタイプ 1, 2, 4, 8, 10 及び 21 のそれとの結合に関してマウス抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 9F3 と競合する抗ヒト IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体である。40

#### 【 0 0 1 5 】

同じく提供されているのは、ここで記載されている任意の抗体のをコードする単離された核酸分子、その単離された核酸分子を含むベクター、その核酸分子で形質転換した宿主細胞、及び核酸分子が発現して抗体が產生される条件下で宿主細胞を培養すること、及び場合によっては、宿主細胞からその抗体を回収することを含む抗体を産する方法である。この抗体は、IgG クラス及びアイソタイプ、例えば IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、又は IgG<sub>4</sub> であってもよい。本発明の範囲は、また、Fv、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub> 及び Fab' 断片等の抗体断片が含む。50

## 【 0 0 1 6 】

その他の側面では、本発明は、以下のCDR ( Kabat, ら, Sequence of Protein of Immunological Interest, 第5版, NIH出版 91-3242, ベセズダ, メリーランド[1991], 第1-3巻) を含む抗ヒトIFN-モノクローナル抗体軽鎖又はその断片を提供する: ( a ) 式RASQSVSTSSYsymH ( 配列番号: 7 ) のL1; ( b ) 式YASNLES ( 配列番号: 8 ) のL2; 及び ( c ) 式QHSGIPRTF ( 配列番号: 9 ) のL3。本発明の範囲は、また、そのような抗ヒトIFN-モノクローナル抗体軽鎖断片の軽鎖可変ドメインを含む。本発明の範囲は、さらに、2001年1月9日にATCCへ寄託され、寄託番号PTA-2880を有するXAIIFN-ChLpDR1ベクターによってコードされている、マウス/ヒトキメラ軽鎖可変ドメインアミノ酸配列、又は全キメラ軽鎖ポリペプチドアミノ酸配列を含む抗ヒトIFN-モノクローナル抗体軽鎖ポリペプチドを含む。本発明の範囲は、さらに、2001年1月9日に寄託され、寄託番号PTA-2882を有するVLV30-IgGベクターによってコードされているヒト化軽鎖可変ドメインアミノ酸配列、又は全ヒト化軽鎖ポリペプチドアミノ酸配列を含む抗ヒトIFN-モノクローナル抗体軽鎖ポリペプチドを含む。

10

## 【 0 0 1 7 】

さらにその他の側面では、本発明は、以下のCDRを含む抗ヒトIFN-モノクローナル抗体重鎖又はその断片を提供する: ( a ) 式GYTFT EYIIH ( 配列番号: 10 ) のH1; ( b ) 式SINPDYDITNYNQRFKG ( 配列番号: 11 ) のH2; 及び ( c ) 式WISDFFDY ( 配列番号: 12 ) のH3。本発明の範囲は、また、そのような抗ヒトIFN-モノクローナル抗体重鎖断片の軽鎖可変ドメインを含む。本発明の範囲は、さらに、2001年1月9日にATCCへ寄託され、寄託番号PTA-2883を有するXAIIFN-ChLpDR2ベクターによってコードされている、マウス/ヒトキメラ重鎖可変ドメインアミノ酸配列、又は全キメラ重鎖ポリペプチドアミノ酸配列を含む抗ヒトIFN-モノクローナル抗体重鎖ポリペプチドを含む。さらに含まれているのは、2001年1月9日に寄託され、寄託番号PTA-2881を有するVLV30-IgG2ベクターによってコードされているヒト化重鎖可変ドメインアミノ酸配列、又は全ヒト化重鎖ポリペプチドアミノ酸配列を含む抗ヒトIFN-モノクローナル抗体重鎖ポリペプチドである。

20

## 【 0 0 1 8 】

さらなる側面では、本発明は、( A ) 以下のCDRを含む、少なくとも1つの軽鎖又はその断片: ( a ) 式RASQSVSTSSYsymH ( 配列番号: 7 ) のL1; ( b ) 式YASNLES ( 配列番号: 8 ) のL2; 及び ( c ) 式QHSGIPRTF ( 配列番号: 9 ) のL3; 及び ( B ) 以下のCDRを含む、少なくとも1つの重鎖又はその断片: ( a ) 式GYTFTEYIIH ( 配列番号: 10 ) のH1; ( b ) 式SINPDYDITNYNQRFKS ( 配列番号: 11 ) のH2; ( c ) 式WISDFFDY ( 配列番号: 12 ) のH3を含む抗ヒトIFN-モノクローナル抗体を提供する。この抗体は、2つのジスルフィド結合した抗体重鎖-軽鎖対で構成されているホモ4量体構造である可能性がある。本発明の範囲は、特に、直鎖抗体、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体を含む。さらに提供されているのは、( 1 ) 2001年1月9日にATCCへ寄託され、寄託番号PTA-2880を有しているXAIIFN-ChLpDR1ベクターによってコードされているマウス/ヒトキメラ軽鎖可変ドメインアミノ酸配列、又は全キメラ軽鎖ポリペプチドアミノ酸配列; 及び ( 2 ) 2001年1月9日にATCCへ寄託され、寄託番号PTA-2883を有しているXAIIFN-ChLpDR2ベクターによってコードされているマウス/ヒトキメラ重鎖可変ドメインアミノ酸配列、又は全キメラ重鎖ポリペプチドアミノ酸配列を含むキメラ抗体である。さらに、ここで含まれているのは、( 1 ) 2001年1月9日に寄託され、寄託番号PTA-2882を有するVLV30-IgGベクターによってコードされているヒト化軽鎖可変ドメインアミノ酸配列、又は全ヒト化軽鎖ポリペプチドアミノ酸配列; ( 2 ) 2001年1月9日に寄託され、寄託番号PTA-2881を有するVLV30-IgG2ベクターによってコードされているヒト化重鎖可変ドメインアミノ酸配列、又は全ヒト化重鎖ポリペプチドアミノ酸配列を含むヒト化抗体である。

30

40

## 【 0 0 1 9 】

さらにその他の側面では、本発明は、製薬的に許容可能な担体と混合した本発明の抗体の有効量を含む製薬的組成物を提供する。

50

異なる側面では、本発明は、細胞でのIFN- $\alpha$ の発現と関連している症状の診断のための方法を提供し、それには、その細胞を抗IFN- $\alpha$ 抗体と接触させ、IFN- $\alpha$ の存在を検出することが含まれる。

さらにその他の側面では、本発明は、患者でのIFN- $\alpha$ の発現に関連している疾病又は症状の治療のための方法を提供し、それには、抗IFN- $\alpha$ 抗体の有効量を患者へ投与することが含まれる。この患者は哺乳動物の患者、好ましくはヒトの患者である。疾病は自己免疫疾患、例えばインシュリン依存性糖尿病（IDDM）；全身性エリテマトーデス（SLE）；又は自己免疫甲状腺炎である。

#### 【0020】

（好ましい実施態様の詳細な説明）

10

##### A. 定義

特に定義されなければ、ここで用いられるすべての技術的及び科学的用語は、本発明が属する分野の当業者によって共通に理解されるのと同じ意味を有する。例えば、Singletonら, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第2版., J. Wiley & Sons(ニューヨーク, ニューヨーク 1994)；Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press(コールド スプリング ハーバー, ニューヨーク 1989)を参照。本発明の目的のために、次の用語が下に定義されている。

#### 【0021】

ここで用いられているように、「I型インターフェロン」は、任意の哺乳動物種の天然配列I型インターフェロンのすべてのサブタイプを含むように定義されており、それには、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 及びインターフェロン $\delta$ が含まれる。同じように、用語「ヒトI型インターフェロン」は、天然配列I型ヒトイインターフェロンのすべてのサブタイプを含むように定義されおり、それには、ヒトイインターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 及びインターフェロン $\gamma$ クラス、及び共通の細胞レセプターと結合するものが含まれる。

20

#### 【0022】

特に明確に提供されなければ、用語「インターフェロン」、「IFN- $\alpha$ 」、及び「ヒトイインターフェロン」、「ヒトIFN- $\alpha$ 」及び「hIFN- $\alpha$ 」は、ここで、天然配列ヒトイインターフェロン- $\alpha$ のすべてのサブタイプを含む、天然配列ヒトアルファインターフェロンのすべての種を指す。天然（天然配列）ヒトイインターフェロン $\alpha$ は、高度の構造的ホモロジーを有する異なる遺伝子によってコードされる23又はより近接した関連タンパク質を含む（Weissmann及びWeber, Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 33: 251 [1986]；Interferon Res., 13: 443-444 [1993]；Robertsら, J. Interferon Cytokine Res. 18:805-816[1998]）。ヒトIFN- $\alpha$ 遺伝子座は、2つのサブファミリーを含む。最初のサブファミリーは、14の機能の対立遺伝子から成り、それには、IFN- $\alpha$ A(IFN- $\alpha$ 2)、IFN- $\alpha$ B(IFN- $\alpha$ 8)、IFN- $\alpha$ C(IFN- $\alpha$ 10)、IFN- $\alpha$ D(IFN- $\alpha$ 1)、IFN- $\alpha$ E(IFN- $\alpha$ 22)、IFN- $\alpha$ F(IFN- $\alpha$ 21)、IFN- $\alpha$ G(IFN- $\alpha$ 5)、及びIFN- $\alpha$ H(IFN- $\alpha$ 14)、そして少なくとも80%の相同性を有する偽遺伝子をコードする遺伝子を含む。第二のファミリーである $\beta$ 又は $\tau$ は、少なくとも5つの偽遺伝子及びIFN- $\alpha$ 遺伝子と70%の相同性を示す1つの機能遺伝子（ここでは「IFN- $\alpha$ 1」又は「IFN- $\tau$ 」で表示した）を含む（Weissmann及びWeber [1986]上掲）。

30

#### 【0023】

ここで使用されているように、「第一ヒトイインターフェロン（hIFN- $\alpha$ ）レセプター」、「IFN- $\alpha$ R」、「hIFNAR1」、「IFNAR1」、及び「Uze鎖」は、Uzeら, Cell, 60: 225-234(1990)によってクローニングされた557アミノ酸レセプタタンパク質として定義され、Uzeらの229頁、図5に示されている409残基の細胞外ドメイン、21残基の膜貫通ドメイン、及び100残基の細胞内ドメインを含む。前出の用語によって同じく包含されるのは、IFNAR1の細胞外ドメイン（ECD）（又はECDの断片）を有するIFNAR1の断片である。

40

#### 【0024】

50

ここで使用されているように、「二番目のヒトインターフェロン（hIFN- $\gamma$ 」レセプター」、「IFN- $\gamma$ R」、「hIFNAR2」、「IFNAR2」及び「Novick鎖」は、Domanskiら, J. Biol. Chem. 37: 21606-21611(1995)によってクローニングされた515アミノ酸レセプタータンパク質として定義され、Domanskiらの21608頁の図1に示されている217残基の細胞外ドメイン、21残基の膜貫通ドメイン、及び250残基の細胞内ドメインを含む。前出の用語によって同じく包含されるのは、IFNAR2の細胞外ドメイン（ECD）（又はECDの断片）を有するIFNAR2の断片、及びIFNAR2の可溶化形態、例えば、免疫グロブリン配列、例えば下に記載のようなIFNAR2 ECD-IgG Fcと融合したIFNAR2 ECDである。

## 【0025】

I型インターフェロン、IFN- $\gamma$ 又はその他のポリペプチドとの関連での用語「天然配列」は、その調製の方法にもかかわらず、天然から得た対応するポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。そのような天然配列ポリペプチドは天然から単離することが可能であり、組み換え及び/又は合成法又はその任意の組み合わせによって産生させることが可能である。「天然配列」という用語は、特に、完全長ポリペプチドの天然発生切断又は分泌型（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然発生変異型（例えば、選択スプライシング型）、及び天然発生対立遺伝子変異体を包含する。

「ポリメラーゼ連鎖反応法」又は「PCR」とは、1987年7月28日に発行の米国特許第4,683,195号に記載されたような、核酸、RNA及び/又はDNAの特異的部分の微量を増幅した手法又は技術を指す。一般的に、オリゴヌクレオチドプライマーが設計できるように、興味の対象である領域の末端又はそれを越えた領域からの配列情報は入手可能となるべきである；これらのプライマーは、増幅されるテンプレートの反対側のストランドと配列において同一か又は類似している。2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは、増幅した材料の末端と一致する。PCRは、特定のRNA配列、全ゲノムDNAからの特定のDNA配列、及び全細胞RNAから転写されたcDNA、バクテリオファージ又はプラスミド配列等を増幅するに利用することができる。一般的には、Mullisら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263 (1987) ; Erlich, 編., PCR Technology ( Stockton Press, ニューヨーク, 1989) を参照。ここで使用されているように、唯一ではないが、PCRは、既知の核酸をプライマーとして、そして核酸の特定の部分を増幅又は生成するために核酸ポリメラーゼを使用することを含む、核酸試験試料を増幅するための核酸ポリメラーゼ反応法の例の1つであると考えられる。

## 【0026】

「抗体（Abs）」及び「免疫グロブリン」（Igs）は、同じ構造特性を有する糖タンパク質である。抗体が特定の抗原との結合特異性を示す一方で、免疫グロブリンは、抗原特異性を欠く抗体及び他の抗体様分子の双方を含む。後者のようなポリペプチドは、リンパ系によって低レベルで、及びメラノーマによって増大したレベルで産生される。

## 【0027】

「天然抗体及び免疫グロブリン」は、通常は、約150,000ダルトンのヘテロ4量体糖タンパク質であり、2つの同一の軽（L）鎖及び2つの同一の重（H）鎖で構成される。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖と結合し、その一方で、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間では、ジスルフィド結合の数が変化する。各重鎖と軽鎖は、また、規則正しい間隔のある鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一末端において、多くの定常ドメインが後に続く可変ドメイン（VH）を有する。各軽鎖は、一末端において可変ドメイン（VH）、その片方の末端に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の最初の定常ドメインと並列していて、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並列している。特定のアミノ酸残基は、軽及び重鎖可変ドメインの間の境界面を形成すると考えられている（Chothiaら, J. Mol. Biol. 186:651 [1985] ; Novotny及びHaber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 4592[1985] ; Chothiaら, Nature 342: 877-883 [1999] ）。

## 【0028】

用語「可変」は、抗体間では、可変ドメインのある部分は、配列がかなり異なり、特定の

10

20

30

40

50

抗原に対する各特定の抗体の結合及び特異性に使われているという事実を意味する。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン中に均一に分布しているのではない。それは、軽鎖及び重鎖可変ドメインの双方の相補鎖決定領域 (CDRs) 又は超可変領域と呼ばれている3つのセグメントに集中している。可変ドメインのさらに高度に保存された部分は、フレームワーク (FR)と呼ばれている。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ4つのFR領域を含み、それらの大部分はシート構造をとり、ループ構造を形成し、幾つかの場合には部分的にシート構造を形成する3つのCDRで連結している。各鎖のCDRは、FR領域によって他の鎖のCDRと近接してまとまっており、抗体の抗原結合部位の形成を担っている (Kabatら.(1991)上掲)。定常ドメインは、直接には抗体の抗原への結合に関わっておらず、種々のエフェクター機能、例えば、抗体依存細胞毒性への抗体の関与を示す。

10

## 【0029】

抗体のパパイン消化によって、それぞれが単一抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片、そして名前がそれが容易に結晶化できることを反映している残基「Fc」断片をが生じる。ペプシン処理では、2つの抗原連結部位を有し、まだ抗原と架橋結合することが可能である $F(ab')_2$ 断片が生じる。

## 【0030】

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を有する最少の抗体断片である。2本鎖Fv種では、この領域は、1つの重及び1つの軽鎖可変ドメインの堅くて、非共有結合の二量体から成る。一本鎖Fv種では、軽及び重鎖がその2本鎖Fv種において「二量体」構造類似体で会合することができるよう、1つの重及び1つの軽鎖可変ドメインは、適応性のあるペプチドリンカーによって共有的に連結することができる。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用することでVH-VL二量体の表面上に抗原結合部位を定まるのは、この構造においてである。正確には、6つのCDRが、抗体へ抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は、抗体へ特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも低い親和性においてであるが、抗原を認識してそれと結合する能力を有する。

20

## 【0031】

Fab断片は、また、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一の定常ドメイン(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体のヒンジ領域の1つ又はそれより多いシステインを含めて、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端でのわずかの残基の付加によって、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、ここでは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を有するFab'のための記号表記である。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、元々は、ヒンジシステインを有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学カップリングも知られている。

30

## 【0032】

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、及びと呼ばれる2つの明らかに異なる型の1つに当てはめることができる。

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、免疫グロブリンは異なるクラスに当てはめることができる。免疫グロブリンの5つの主要なクラスがある: IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、及びこれらの幾つかは、さらにサブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>にわけることができる。免疫グロブリンの異なるクラスと一致する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\mu$ 及び $\epsilon$ と呼ばれている。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元構造は、良く知られている。

40

## 【0033】

用語「抗体」は、無傷の免疫グロブリンのすべてのクラス及びサブクラスを含む。用語「抗体」は、抗体断片も包含する。用語「抗体」は、特に、抗体断片クローンを含むモノクローナル抗体を包含する。

「抗体断片」は、無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を有する無傷の抗体の一部分を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 及びFv断片；ダイアボディー；一本鎖Fv(scFv

50

) を含む一本鎖抗体分子；そして抗体断片から形成された多特異性抗体が含まれる。

【0034】

ここで用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体（又は抗体断片）を意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらには、概して異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含む従来型（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。それらの特異性の他に、ハイブリドーマ培養によって合成され、他の免疫グロブリンによる混入がないという点で、モノクローナル抗体は有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示すものであって、ある特定の方法による抗体の產生を必要とすることを意味するためのものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler等, *Nature*, 256: 495 [1975]に最初に記載されたハイブリドーマ法によって作成してもよいし、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号参照）によって作成してもよい。また「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson等, *Nature*, 352: 624-628 [1991]及びMarks等, *J. Mol. Biol.*, 222: 5 10 81-597 (1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離した抗体断片（Fvクローン）を含む抗原認識及び結合部位のクローンを含む。

【0035】

ここで、モノクローナル抗体は特に、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を含み、それは、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種から誘導された又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖の残りの部分は他の種から誘導された又は他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体、並びにそれらが所望の生物学的活性を示す限りにおいて、それらの抗体の断片の対応する配列と同一又は相同である（Cabillyらへの米国特許第4,816,567号；Morrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8 20 1: 6851-6855 [1984]）。

【0036】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそれらの断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合性配列）である。大部分において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、そのレシピエントCDR由来の残基が、マウス、ラット又はウサギなどのヒト以外の種のCDR（ドナー抗体）に由来する所望の特異性、親和性及び容量を持つ残基で置換されている。ある場合は、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基が対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移植されるCDR又は枠配列にも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精密かつ最適化するために施される。一般にヒト化抗体は、CDR領域の全て又は実質上全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質上全てがヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含有するであろう。また、最適なヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部も含有するであろう。さらなる詳細については、Jones等, *Nature* 321: 522-525 (1986)；Reichmann等, *Nature* 332: 323-329 (1988)；及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)；及びClark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000)を参照のこと。ヒト化抗体には、抗体の抗原結合領域が対象である抗原で免疫化したマカクザルによって產生された抗体から誘導したPrimatized（商品名）抗体が含まれる。

【0037】

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のVH及びVLドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、FvポリペプチドはVH及びVLドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはsFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vo 40 50

I. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthun、Dall'Acqua及びCarter, Curr. Opin. Struct. Biol. 8: 443-450(1998)、及びHudson, Curr. Opin. Immunol. 11:548-557(1999)を参照のこと。

【0038】

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(VH-VL)内で軽鎖可変ドメイン(VL)に重鎖可変ドメイン(VH)が結合している。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成を不可能にするリンクァーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を形成する。ダイアボディーは、例えば、欧洲特許第404097号；国際公開第93/11161号；及びHollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

【0039】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものを意味する。その自然環境の夾雜成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって決定した場合95重量%以上の、最も好ましくは99重量%の抗体まで、(2)スピニングカップシクエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分な程度まで、あるいは(3)非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEを行い、クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色によって、均一になるまで精製されうる。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0040】

「中和抗体」とは、それが結合する標的抗原のエフェクター機能を除く又は顕著に減じることができる抗体分子を意味する。従って、「中和化」抗IFN-抗体は、エフェクター機能、例えばIFN-のレセプター結合及び／又は細胞応答の誘発を除くか又は顕著に減じることができる。

【0041】

本発明の目的に関して、IFN-のレセプター活性化活性を中和する抗IFN-抗体の能力をモニターすることができ、例えば、1995年6月1日に発行された国際公開95/14930に記載のキナーゼレセプター活性化(KIRA)アッセイでは、IFNAR1/R2レセプター複合体のチロシンリン酸化を減じる候補抗体の能力(リガンド結による)を測定することによる。

【0042】

本発明の目的に関しては、IFN-による細胞応答の誘発を中和する抗IFN-抗体の能力は、好ましくは、Kawade, J. Interferon Res. 1:61-70(1980)、又はKawade及びWatanabe, J. Interferon Res. 4:571-584(1984)、又はYousefi, ら, Am. Clin. Pathol. 83:735-740(1985)によって記載されているようにIFN-の抗ウイルス活性の中和化をモニターすることによって、或いは、Kurabayashiら, Mol. Cell. Biol., 15: 6386(1995)に記載のように、電気泳動度シフトアッセイにおいて、インターフェロン刺激応答エレメント(ISRE)に由来するオリゴヌクレオチドへのシグナル伝達分子であるインターフェロン刺激因子3(ISGF3)の結合を活性化するIFN-の能力を中和する抗IFN-抗体の能力を試験することによって試験される。

【0043】

「顕著な」減少とは、レセプター(例えば、IFNAR2)結合及び／又は細胞応答の誘発などの標的抗原(例えば、IFN-)のエフェクター機能の少なくとも約60%、又は少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約75%、さらに好ましくは少なくとも約80%、なおさらに好ましくは少なくとも約85%、よりさらに好ましくは少なくとも約90%、よりさらに好ましくは少なくとも約95%、最も好ましくは少なくとも約99%の減少を意味する。好ましくは、ここで定義されている「中和化」抗体は、Kawade(1980)、上掲、又

10

20

30

40

50

はYousefi(1985), 上掲の抗ウイルスアッセイによって測定されるように。IFN- の抗ウイルス活性の少なくとも約 60 %、又は少なくとも約 70 %、好ましくは少なくとも約 75 %、さらに好ましくは少なくとも約 80 %、なおさらに好ましくは少なくとも約 85 %、よりさらに好ましくは少なくとも約 90 %、よりさらに好ましくは少なくとも約 95 %、最も好ましくは少なくとも約 99 %を中和することができる。その他の好ましい実施態様では、ここでの「中和化」抗体は、上で引用したKIRAアッセイで測定されるように、IFN- 結合によって、IFNAR1/IFNAR2レセプター複合体のチロシンリン酸化の減少を少なくとも約 60 %、又は少なくとも約 70 %、好ましくは少なくとも約 75 %、さらに好ましくは少なくとも約 80 %、なおさらに好ましくは少なくとも約 85 %、よりさらに好ましくは少なくとも約 90 %、よりさらに好ましくは少なくとも約 95 %、最も好ましくは少なくとも約 99 % 減少させることができる。特に好ましい実施態様では、ここでの中和化抗IFN- 抗体は、すべて、又は実質的にすべてのIFN- のサブタイプを中和し、IFN- $\gamma$ を中和することができない。この文脈において、用語「実質上すべて」とは、抗IFN- の中和化が、少なくともIFN- 1、IFN- 2、IFN- 4、IFN- 5、IFN- 8、IFN- 10、及びIFN- 21を中和することを意味する。

10

20

**【0044】**  
本発明の目的に関して、レセプターへのIFN- の結合をブロックする抗IFN- 抗体の能力は、競合結合アッセイにおいて、IFNAR2へのIFN- 結合での無関係なコントロール抗体の等量濃度の効果と比較した、IFNAR2へのIFN- の結合を減じるか又は除くある濃度の抗体の特性又は能力で定義される。好ましくは、このブロッキング抗IFN- 抗体は、I無関係なコントロール抗体と比較して、IFNAR2へのIFN- の結合を少なくとも約 50 %、又は少なくとも約 55 %、又は少なくとも 60 %、又は少なくとも約 65 %、又は少なくとも約 70 %、又は少なくとも約 75 %、又は少なくとも約 80 %、又は少なくとも約 85 %、又は少なくとも約 90 %、又は少なくとも約 95 %、又は少なくとも 99 % 減少させることができる。

20

30

**【0045】**  
本発明の目的に関して、IFNAR2へのIFN- の結合をブロックする抗IFN- 抗体の能力は、例えば、Antibody: A Laboratory Manual, コールドスプリングハーバー研究所, Ed Harlow 及び David Lane (1988)のルーチンな競合アッセイによって測定することができる。例えば、下の実施例 2 に記載のIFN- 結合ELISAアッセイを改良して、抗IFN- 抗体と可溶性IFNAR2の間の競合アッセイを利用することができる。そのようなアッセイは、IFN- をマイクロタイパレート上に層状にし、選択した濃度の標識IFNAR2 ECDヒト IgG Fc融合タンパク質と混合した非標識抗IFN- 抗体、又は非標識コントロール抗体の連続希釈物で層状化したプレートをインキュベートし、各インキュベーション混合物中のシグナルを検出及び測定し、次いで、抗体の種々の希釈物によって表示されたシグナル測定を比較することによっておこなうことができる。

30

40

**【0046】**  
特定の好ましい実施態様では、ここで抗IFN- 抗体をブロックすることは、すべて、又は実質上すべてのIFN- のサブタイプのIFNAR2結合をブロックすることができ、IFN- とは交差反応しないであろう。この文脈では、用語「実質上すべて」は、抗IFN- 抗体をブロックすることは、少なくともIFN- 1、IFN- 2、IFN- 4、IFN- 5、IFN- 8、IFN- 10、及びIFN- 21のIFNAR2結合をブロックすることを意味する。特に好ましい実施態様では、本発明の抗IFN- 抗体をブロックすることは、IFN- のすべての既知のサブタイプのIFNAR2結合をブロックすることである。

用語「エピトープ」は、タンパク質抗原上の（モノクローナル又はポリクローナル）抗体のための結合部位を指すために用いられる。

40

50

**【0047】**  
特定のエピトープと結合する抗体は、「エピトープマッピング」によって同定される。タンパク質上のエピトープの位置をマッピング及び特徴付ける多くの方法が当該分野で知られており、これには、例えばHarlow 及びLane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールド・スプリング・ハーバー, ニューヨー

ーク，1999の第11章に記載されているような抗体-抗原複合体の結晶構造を解析すること、競合アッセイ、遺伝子断片発現アッセイ、及び合成ペプチドベースアッセイが含まれる。競合ELISAアッセイは、上と下で論じられている。遺伝子断片発現アッセイによると、タンパク質をコードしているオープンリーディングフレームは、ランダムに又は特定の遺伝的構築物のいずれかによって断片化されていて、タンパク質の発現断片の試験される抗体との活性が測定される。例えば、遺伝子断片はPCRによって生産され、次いで、放射性アミノ酸の存在下で転写されてインビトロでタンパク質へ翻訳される。抗体の放射標識タンパク質断片への結合は、次いで免疫沈降とゲル電気泳動によって測定される。特定のエピトープは、また、ファージ粒子の表面に表示されたランダムペプチド配列の大きなライブラリ（ファージライブラリ）を用いることによって同定される。或いは、重なり合ったペプチド断片の特定されたライブラリは、単純な結合アッセイで、試験抗体との結合を試験することができる。後者の方法は、約5から15のアミノ酸の直鎖状エピトープを特定するために適している。

10

#### 【0048】

二つの抗体が同一又は立体的に重なり合ったエピトープを認識する場合、抗体は、参考の抗体のように、「本質的に同じエピトープ」と結合する。二つのエピトープが同一又は立体的に重なり合ったエピトープと結合するかどうかを決定するために、最も広くそして迅速な方法は競合アッセイであり、それは、標識抗原又は標識抗体のいずれかを用いて、全ての異なる形式で構成することができる。通常は、抗原は96ウェルプレート上に固定化され、標識抗体の結合を阻止する非標識抗体の能力は、放射性又は酵素標識を用いて測定する。

20

#### 【0049】

ここで用いられる場合のアミノ酸又はアミノ酸残基という用語は、変異体について以下でさらに説明するように、天然発生Lアミノ酸又はDアミノ酸を意味する。共通して使用される一及び三文字略語が、アミノ酸についてここで用いられる（Bruce Albertsら，Molecular Biology of the Cell，Garland Publishing, Inc., New York (3d ed. 1994)）。

30

#### 【0050】

「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、参考（例えばネガティブポリペプチド）配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列のアミノ酸残基のパーセントとして定義されている。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下で提供されている配列比較プログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、ソースコードは米国著作権事務所，ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、ALIGN-2プログラムのソースコード及びその使用のための指示書は、2000年6月6日に発行の国際出願公開第2000/39297号に開示されている。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

40

#### 【0051】

ここでの目的のために、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する与えられたアミノ酸配列Aの%アミノ酸同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに

50

対して或る程度の%アミノ酸同一性を有する又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される:

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのアラインメントによって同一であると記録されたアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと異なる場合、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%ポジティブとは異なることは理解されるであろう。特に断らない限りは、ここで全ての%アミノ酸配列同一性値は、上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかし、%アミノ酸配列同一性値は、また、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschulら, Nucleic Acids Res. 25: 3389-34 10 02 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードできる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask=可、鎖=全て、予測される発生=10、最小低複合長=15/5、マルチパスe-値=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ=25、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62を含む。

【0052】

アミノ酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する与えられたアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される: 20

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のA及びBのアラインメントによって同一であると記録されたアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0053】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している; プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している; 又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンクマーが使用される。

【0054】

用語「疾患の状態」は、細胞又は身体機能、系、又は器官の妨害、休止、又は障害が生じている細胞又は哺乳動物全体の生理学的状態を指す。

用語「有効量」とは、哺乳動物における疾患、疾病又は好ましかざる生理学的状態の治療(予防も含む)にとって効果的な薬剤の有効量を指す。本発明では、抗IFN-抗体の「有効量」は、IDDM又はSLE等の自己免疫疾患を緩和、鈍化又は遅延させ; IDDM又はSLE等の自己免疫疾患の発症を予防又は阻害(すなわち、ある程度までやわらげ、そして好ましくは止める); 及び/又はIDDM又はSLE等の自己免疫疾患に関連する1つ又はそれより多い症状をある程度まで和らげることが可能である。

【0055】

本発明の方法では、用語「コントロール」及びその文法上の変異体は、好まざる症状、例 50

えば自己反応性T細胞及び自己免疫の発症等の生理学的症状を予防、部分又は完全阻害、縮小、遅延又は鈍化することを指すのに用いられる。

【0056】

「治療」とは、治癒的処置、及び予防的療法又は防止的療法の両方を指す。治療を必要とする対象には、既に障害を受けているもの並びに障害を予防されるべきものが含まれる。この発明の目的については、限定されるものではないが、有益又は所望される臨床的結果には、検出可能又は検出不可能に関わらず、症状の緩和、疾病の程度の縮小、疾病の安定した（即ち、悪化ではない）状態、疾病の進行の遅延又は鈍化、疾病状態の改善又は緩和、及び軽減（部分的又は全体のいずれか）が含まれる。「治療」は、また、治療を受けていない場合に予想される生存率に比べて伸びた生存率を意味することが可能である。治療を必要とするものには、疾患に罹りやすいものと同時に疾患にすでに罹っているもの、又は疾患が予防されるべきものを含む。

【0057】

「薬学的に許容可能な」担体、賦形剤、又は安定化剤とは、用いられる用量及び濃度で、それに曝される細胞又は哺乳動物にとって無毒なものである。多くの場合、生理学的に許容可能な担体とは、水溶性pH緩衝液である。生理学的に許容可能な担体の例は、緩衝液、例えはリン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えは血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えはポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えはグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えはTWEEN（商品名）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（商品名）を含む。

【0058】

治療の対象のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えはイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0059】

B. 本発明を実行する方法

1. 抗体の生成

(i) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えは免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。この免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質、例えは、血清アルブミン、大豆トリプシンインヒビターに抱合させるのが有用である。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバントを含む。

【0060】

その他の好ましい実施態様では、動物を、IFN- $\alpha$ サブタイプに対して幅広い反応性を有する抗IFN- $\alpha$ 抗体を生成するために、種々の混合物、好ましくはすべてのIFN- $\alpha$ サブタイプで免疫化する。その他の好ましい実施態様では、下の実施例1に記載のセンダイウイルスで誘導したバーキットリンパ腫細胞（ナマルバ細胞）によって分泌されたヒトリンパ芽球腫インターフェロンに存在するヒトIFN- $\alpha$ サブタイプの混合物で、動物を免疫化した。そのようなヒトリンパ芽球腫インターフェロンの適切な調製物は、シグマ化学会社、セイントルイス、ミズーリ州から商業的（製品番号I-9887）に入手することができる。

【0061】

(ii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256:495 (1975)によって最初に記載された

10

20

30

40

50

ハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)を利用して作成することができる。

ハイブリドーマ法では、ハムスター等のマウス又はその他の適切な宿主動物を上記のようにして免疫し、免疫化に用いたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するか又は産生することのできるリンパ球を誘発する。別法として、リンパ球をインビトロで免疫化してもよい。免疫化の後、リンパ球を単離し、ポリエチレンギリコールのような適切な融合剤を用いて骨髄腫細胞株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103頁[Academic Press, 1986])。

#### 【0062】

こうして準備されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは無融合の親骨髄腫細胞の成長又は生存を阻止する一種以上の物質を含有する適切な培地に播種し、生育させる。例えば、親骨髄腫細胞が酵素の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又はHPRT)を欠けていると、ハイブリドーマの培地は通常ヒポキサンチン、アミノブテリジン及びチミジン(HAT培地)等のHGPRT欠乏性細胞の成長を阻止する物質を含む。

#### 【0063】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。これらの中で好ましい骨髄腫株化細胞は、マウス骨髄腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、アメリカ合衆国より入手することができるMOP-21およびMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビル、メリーランド、アメリカ合衆国より入手することができるSP-2及び誘導株、例えばX63-Ag8-653細胞である。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞も、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeurら, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63頁、(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

#### 【0064】

ハイブリドーマ細胞が生育する培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の産生に関してアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、或いはラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等のインビトロ結合アッセイによって測定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munsonら, *Anal. Biochem.*, 107:220(1980)に記載のスキヤッチャード分析によって測定することができる。

#### 【0065】

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が一度同定されると、限界希釈法によりそのクローニングをサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103頁[Academic Press, 1986])。この目的のために適した培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を含む。さらには、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、インビトロで増殖させることができる。

サブクローニングにより分泌したモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィー等の常套的な抗体精製法によって、培地、腹水、又は血清から適切に分離される。

#### 【0066】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、常法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)容易に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、組換え宿主細胞でモノクローナル抗体の合成を得るために、このDNAを発現ベクターへ配し、次いで、それを、この状況

10

20

30

40

50

以外では抗体タンパク質を產生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髄腫細胞のような宿主細胞へトランスフェクトしてもよい。例えば、相同意的なマウス配列をヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインの配列で置換することによって(Morrisonら, Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 81:6851[1984])、又は免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード化配列の全部又は一部を共有結合させることによって、このDNAを修飾することができる。この方法では、ここでの抗IFN-モノクローナル抗体の結合特異性を有するように、「キメラ」又は「ハイブリッド」抗体は調製される。

#### 【0067】

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常部を置換、又は本発明の抗体の1個の抗原結合部位の定常部を置換し、IFN-に対する特異性を有する1個の抗原結合部位、及び異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作り出す。

キメラ又はハイブリッド抗体は、また、合成タンパク質化学において既知の方法を用いてインビトロで調製することができ、それには、架橋剤に関するものが含まれる。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて、又はチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的に関して適した試薬の例としては、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリイミデートが含まれる。

抗体の組み換え產生は、より詳細に下に記載されている。

#### 【0068】

##### (iii) ヒト化抗体

一般的に、ヒト化抗体には、非ヒト源由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合は「移入」可変ドメインに由来する「移入」残基と称されている。ヒト化は、基本的にウィンター(Winter)及び共同研究者の方に従い、齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによっておこなうことができる(Jonesら, Nature, 321:522-525 [1986]; Riechmannら, Nature, 332:323-327 [1988]; Verhoeyenら, Science, 239:1534-1536 [1988]; Clark, Immunol. Today 21: 397-402 [2000]で概説)。

#### 【0069】

よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(Cabilly, 上掲)である。実際には、ヒト化抗体は典型的にはある程度のCDR残基及び場合によってはいくらかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されるヒト抗体である。

#### 【0070】

抗体が、抗原及び他の好ましい生物学的特性に対する高い親和性の保持をともなってヒト化されることは重要である。この目的を達成するために、好ましい方法によって、ヒト化抗体は、親及びヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列及び概念上のヒト化産物の分析の工程によって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは、広く入手可能であり、当該分野に熟練した者にとっては良く知られている。可能選択された候補免疫グロブリン配列の可能性のある三次元立体配置構造を例示して表示するコンピュータープログラムが入手可能である。これら表示の検討によって、候補免疫グロブリン配列の機能化における残基の可能性ある役割の分析が可能になる、すなわち、候補免疫グロブリンのその抗原へ結合する能力に影響を及ぼす残基の分析である。この方法では、標的抗原に対して増大した親和性のような所望される抗体特性が達成されるように、FR残基がコンセンサス及び移入配列から選択されて組み合わされることが可能である。一般的に、CDR残基は、抗原結合に影響を与えることに、直接にそしてかなり十分に関与している。さらなる詳細については、米国特許第5,821,337号を参照のこと。

#### 【0071】

##### (iv) ヒト抗体

ヒトmAbsを生成するために同じ技術を用いる試みは、適切なヒト骨髄腫細胞株が無いこと

10

20

30

40

50

によって妨げられてきた。最も良い結果は、ヘテロ骨髄腫（マウス×ヒトハイブリッド骨髄腫）を融合相手として用いでることで得られた（Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984) ; Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁、（Marcel Dekker, Inc., New York, 1987））。これに代わって、ヒト抗体分泌細胞は、エピスタイン・バーウイルス（EBV）による感染によって不死化することができる。しかしながら、EBV感染細胞をクローニングすることは難しく、通常は、比較的に低レベルの免疫グロブリンのみを産する（James及びBell, J. Immunol. Methods 100: 5-40[1987]）。将来は、ヒトB細胞の不死化は、明確なトランスフォーミング遺伝子の組み合わせを導入することによって達成できる可能性がある。そのような可能性は、SV40ラージT腫瘍性タンパク質及びH-rasの発癌対立遺伝子をともなうテロメラーゼ触媒サブユニットの発現が、正常なヒト上皮及び纖維芽細胞の腫瘍化変換を引き起こしたという最近の証明によって強調されている（Hahnら, Nature 400: 464-468 [1999]）。

#### 【0072】

免疫化することで、内因性免疫グロブリンの生産なしに、ヒト抗体のレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物（例えはマウス）を生産することが現在は可能である（Jakobovitsら, Nature 362: 255-258 [1993] ; Lonberg及びHuszar, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93 [1995] ; Fishwildら, Nat. Biotechnol. 14: 845-851[1996] ; Mendezら, Nat. Genet. 15: 146-156 [1997] ; Green, J. Immunol. Methods 231: 11-23[1999] ; Tomizukaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727[2000] ; Littleら, Immunol. Today 21: 364-370[2000]で概説されている）。例えは、キメラ及び生殖細胞変異体マウスでの抗体重鎖J領域（J<sub>H</sub>）遺伝子のホモ接合体欠失によって、内在性抗体の産生の完全な阻害が生じることが説明されてきた（Jakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-2555 [1993]）。そのような生殖細胞変異マウスへのヒト生殖細胞免疫グロブリン遺伝子アレイの転移は、抗原刺激によるヒト抗体の産生を引き起こす（Jakobovitsら, Nature 362: 255-258 [1993]）。

#### 【0073】

Mendezら（Nature Genetics 15: 146-156[1997]）は、さらに技術を改良し、抗原による刺激を受けた際に、高親和性の完全なヒト抗体を生成する「Xenomouse（登録商標）II」と命名したトランスジェニックマウスの系統を作製した。これは、上に記載したような内因性のJ<sub>H</sub>セグメントへの欠損をともなうマウスへのメガベースヒト重鎖及び軽鎖遺伝子座の生殖細胞系組み込みによって達成された。Xenomouse（登録商標）IIは、およそ6.6 V<sub>H</sub>遺伝子、完全なD<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>領域及び3つの異なる定常領域（μ, δ及びγ）を含む1,020 k bのヒト重鎖遺伝子座を有し、そしてまた、32 V<sub>L</sub>遺伝子、J<sub>L</sub>セグメント及びC<sub>L</sub>遺伝子を含む800 k bのヒト遺伝子座を有する。これらのマウスで生産される抗体は、遺伝子再構成、構築及びレパートリーを含む全ての点でヒトにおいて見られるものと極めて類似している。ヒト抗体は、マウス遺伝子座での遺伝子再構成を防ぐ内因性のJ<sub>H</sub>セグメントの欠損のために、内因性抗体より優先的に多く発現される。

#### 【0074】

Tomizukaら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727[2000]）は、最近、1つは完全なIg重鎖遺伝子座（IgH, ~1.5 Mb）を有し、他方は完全な軽鎖遺伝子座（Ig<sub>L</sub>, ~2 Mb）を有する2つの異なるヒト染色体断片（hCFs）を内因性IgH及びIg<sub>L</sub>が不活性化したマウスへ導入することによる二重Tcマウスの作製を記述した。これらのマウスでは、マウス抗体が無い状態で抗原特異的ヒト抗体応答が高まった。このTc技術は、マウス又は他の動物でのメガベースを越える複合座又は遺伝子クラスター（例えは、T細胞レセプター、主要組織適合抗原複合体又はP450クラスター等をコードするもの）のヒト化を可能にすることができる。この方法のその他の利点は、大きな遺伝子座をクローニングする必要がないことである。すべてのIg遺伝子座を含むメガベースサイズを越えるDNA断片のクローニングは、酵母人工染色体を用いたとしても困難であるために、これには極めて有益である（Petersonら, Trends Genet. 13: 61-66 [1997] ; Jacobovits, Curr. Biol. 4: 761-763 [1994]）。さらには、ヒトIgH遺伝子座の定常領域は、クローニングが困難な配列が含ま

10

20

30

40

50

れていることが知られている (Kang及びCox, *Genomics* 35: 189-195[1996])。

【0075】

別法として、ファージディスプレイ技術を、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インヴィトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させるために使用することができる (McCaffertyら, *Nature* 348: 552-553[1990]; Kipriyanov及びLittle, *Mol. Biotechnol.* 12: 173-201[1999]で概説; Hoogenboom及びChames, *Immuno. Today* 21: 371-378 [2000])。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、纖維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のいずれかヘイン-フレームでクローンされ、ファージ粒子の表面において機能的抗体断片として表示される。纖維状粒子がファージゲノムの单一ストランドのDNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択によって、また、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択を生じる結果となる。従って、ファージはB細胞の特性のいくつかを模倣している。ファージディスプレイは多様な形態で行うことができる (Johnson及びChiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571[1993]で概説されている; Winterら, *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455[1994]; Dall'Acqua及びCarter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 443-450[1998]; Hoogenboom及びChames, *Immunol. Today* 21: 371-378[2000])。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clacksonら, *Nature*, 352: 624-628(1991)は、免疫化されたマウス脾臓から得られたV遺伝子の小ランダム組合せライプラリからの抗-オキサゾロン抗体の異なった配列を単離した。非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構成可能で、抗原(自己抗原を含む)とは異なる配列の抗体を、Marksら, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597(1991)、又はGriffithら, *EMBO J.* 12: 725-734(1993)に記載の技術に本質的に従って単離することができる。天然免疫応答では、抗体遺伝子は高速度で変異を蓄積する(体細胞過剰変異)。導入された幾つかの変化はより高い親和性を与え、そして高親和性表面免疫グロブリンを表示するB細胞は、後の抗原の挑戦の間に、優先的に複製されて分化する。この天然プロセスは、「チェーン・シャッフリング」として知られている技術を用いて模倣することができる (Marksら, *Bio/Technol.* 10, 779-783[1992])。この方法では、ファージディスプレイによって得られた「一次」ヒト抗体の親和性を、重鎖及び軽鎖V領域遺伝子を、免疫化していない供与体から得られたVドメイン遺伝子の天然発生変異体(レパートリー)のレパートリーで経時的に置き換えることによって改良することができる。この技術は、nMの程度での親和性で、抗体及び抗体断片の生産を可能にする。かなり大きなファージ抗体レパートリーを作製するための戦略(「全てのライプラリのもと」としても知られている)は、Waterhouseら, *Nucl. Acids Res.* 21, 2265-2266(1993)によって記載され、そのような大きなファージライプラリからの直接の高親和性ヒト抗体を単離は、印刷中のGriffithら, *EMBO J.* 13: 3245-3260(1994)によって報告されている。ジーンシャッフリングは、また、げっ歯動物の抗体からヒト抗体を誘導するために用いられ、そのヒト抗体は、初発のげっ歯抗体に対して類似の親和性及び特異性を有する。「エピトープ・インプリントティング」とも呼ばれるこの方法によると、ファージディスプレイ技術によって得られたげっ歯抗体の重又は軽鎖V遺伝子ドメイン遺伝子は、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーで置換されて、げっ歯-ヒトキメラを作成する。抗原での選択は、機能性抗原結合部位を使うことができるヒト可変部の単離を引き起こす結果となる、すなわちエピトープは、パートナーの選択を支配(インプリント)する。残りのげっ歯Vドメインを置換するために工程が繰り返されると、ヒト抗体が得られる(1993年4月1日に発行の国際公開93/06213を参照せよ)。CDR移植によるげっ歯抗体の伝統的なヒト化とは違って、この技術によって、げっ歯起源のフレームワーク又はCDR残基を有しない完全なるヒト抗体を提供される。

【0076】

(v) 二重特異的抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合において、結合特異

10

20

30

40

50

性の一方は、中和化抗体を提供するIFN- $\alpha$ に対するもので、他方は任意の他の抗原に対するものである。

【0077】

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え產生は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく [ Millstein及びCuello, *Nature*, 305:537-539 (1983) ]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。通常はアフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される正確な分子の精製は、どちらかというと面倒であり、その産物の量は低い。同様の手順が国際公開第93/08829号(1993年5月13日)、及びTraunecker等, *EMBO J.*, 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

【0078】

異なるそしてより好ましい方法によって、所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリン定常ドメイン配列へ融合することができる。この融合は、好ましくは、少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には、軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合体をコードするDNA、そして望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主微生物へ同時形質移入する。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチドフラグメントの相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)ことからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を必要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。

二重特異性抗体を產生する更なる詳細については、例えばSureshら, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0079】

(vi) ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため [ 米国特許第4,676,980号 ] 及びHIV感染の治療のために [ 国際公開91/00360; 国際公開92/200373; 欧州特許第03089号 ] 提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の常套的架橋法を用いて作製することができる。好適な試薬は当該分野で知られており、多くの架橋技術とともに米国特許第4,676,980号に開示されている。

【0080】

(vii) 抗体断片

ある実施態様では、中和化抗IFN- $\alpha$ 抗体(マウス、ヒト及びヒト化抗体及び抗体変異体を含む)は抗体断片である。抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化を介して誘導された(例えば、Morimotoら, *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennanら, *Science*, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる(Hudson, *Curr. Opin. Immunol.* 11: 548-557[1999]; Littleら, *Immunol. Today* 21: 364-370[2000])。例えば、Fab'-SH断片は大腸菌から直

10

20

30

40

50

接回収することができ、化学的に結合して  $F(ab')_2$  断片を形成することができる (Carterら, Bio/Technology 10:163-167 [1992])。その他の実施態様では、この  $F(ab')_2$  は、ロイシンジッパー GCN4 を用いて  $F(ab')_2$  分子のアセンブリを促進することで形成される。その他の方法によると、Fv、Fab 又は  $F(ab')_2$  断片は、組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片の产生に関する他の技術は、熟練技術者にとって明かである。

## 【0081】

## (viii) 抗体のアミノ酸配列変異体

ここで所望される抗 IFN- 抗体のアミノ酸配列修飾を検討する。例えば、抗体の結合親和性及び / 又は他の生物学的特性を改良することが望ましいであろう。抗 IFN- 抗体のアミノ酸配列変異体は、抗 IFN- 抗体鎖をコードする核酸へ適切なヌクレオチド変化を導入することによって、又はペプチド合成によって調製される。そのような修飾には、例えば、抗 IFN- 抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び / 又は挿入及び / 又は置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、最終的なコンストラクトに達するまでなされ、その最終的なコンストラクトは所望の特徴を有する。このアミノ酸変化は、また、グリコシリ化部位の数又は位置を変化させるなどの抗 IFN- 抗体の翻訳後プロセスを改変することができる。

## 【0082】

突然変異誘発にとって好ましい位置である中和化抗 IFN- 抗体のある残基又は領域の同定に関する有用な方法は、Cunningham 及び Wells, Science 244: 1081-1085 (1989) に記載されているように「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、アミノ酸による抗原との相互作用に影響を及ぼすために、標的残基の残基又は基を同定（例えば、arg, asp, his, lys, 及び glu 等の荷電残基）し、中性又は負荷電アミノ酸（最も好ましくはアラニン又はポリアラニン）で置換する。次に、置換の部位へ又はそれの代わりに、さらなる又は他の変異体を導入することによって、置換に対して機能上の感受性を示すこれらのアミノ酸の位置を精緻化する。従って、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異自体の性質は予め決める必要はない。例えば、与えられた部位における性能を分析するために、alaスキャニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現した抗 IFN- 抗体変異体を、所望の活性に関してスクリーニングする。

## 【0083】

アミノ酸配列挿入物とは、1 又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物だけでなく、1 残基から 100 又はそれより多い残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ- 及び / 又はカルボキシル末端融合物を含む。末端挿入物の例は、N-末端メチオニル残基を有する抗 IFN- 中和化抗体又はエピトープタグに融合した抗体を含む。抗 IFN- 抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させる酵素又はポリペプチド抗体の N- 又は C- 末端への融合物を含む。

## 【0084】

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、中和化抗 IFN- 抗体分子の少なくとも一つのアミノ酸残基が除かれ、その位置に異なる残基が挿入されている。置換突然変異について最も興味深い部位は高頻度可変領域を含むが、FR 変更も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表 1 に示されている。これらの置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表 1 に「例示的置換」と名前を付けた又はアミノ酸の分類に関して以下に更に記載するように、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングすることができる。

## 【0085】

10

20

30

40

表 1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 6 】

抗体の生物学的特性の実質的修飾は、( a ) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又はらせん構造、( b ) 標的部位の電荷又は疎水性、又は( c ) 側鎖の巣を維持しながら、効果が顕著に異なる置換基を選択することによって達成される。天然発生残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- ( 1 ) 疎水性：ノルロイシン, met, ala, val, leu, ile;
- ( 2 ) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- ( 3 ) 酸性：asp, glu;
- ( 4 ) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- ( 5 ) 鎮配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- ( 6 ) 芳香族：trp, tyr, phe。

## 【 0 0 8 7 】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。中和化抗IFN- $\gamma$ 抗体の適切なコンフォメーションを維持することに関与していない任意のシステイン残基も、分子の酸化的安定性を向上させ、異常な架橋を防ぐために、一般的にセリンと置換することができる。逆に、その安定性（特に、抗体が Fv 断片の

のような抗体断片)を向上させるために、それにシステイン結合(複数でも)を加えてよい。

#### 【0088】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体)の1つ又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる開発のために得られた変異体は、それらが生成された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を生成する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟である。簡潔に言えば、高頻度可変領域部位(例えば、6-7部位)を変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物として一価形態で表示される。ファージディスプレイによる変異体は、次いで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。変異の候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とIFN-との接点を同定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここで詳しく記述した技術による置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、1つ又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択することができる。

#### 【0089】

##### (ix) グリコシル化変異体

抗体は、その定常領域の保存的位置でグリコシル化されている( Jefferis及びLund, *Chem. Immunol.* 65: 111-128[1997]; Wright及びMorrison, *Trends Biotechnol.* 15:26-32[1997] )。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖は、タンパク質の機能( Boydら, *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318[1996]; Wittwe及びHoward, *Biochem.* 29: 4175-4180[1990] )、及び糖タンパク質のコンフォメーションと提示されている三次元表面に影響を与える糖タンパク質の部分間の分子内相互作用に影響を与える( Jefferis及びLund, 上掲; Wyss及びWagner, *Current Opin. Biotech.* 7: 409-416[1996] )。オリゴ糖は、また、特異的な認識構造に基づいて、所定の糖タンパク質を有する分子へ標的とすることを担うことができる。例えば、アガラクトシル化されたIgGでは、オリゴ糖部分がCH-2間スペースから飛び出し、末端N-アセチルグルコサミン残基は、マンノース結合タンパク質との結合が可能となることが報告されている( Malhotraら, *Nature Med.* 1: 237-243[1995] )。グリコペプチダーゼによるCAMPATH-1H(ヒトリンパ球のCDw52抗原を認識する、組み換えヒト化マウスモノクローナルIgG1抗体)からのオリゴ糖の除去によって、チャイニーズ・ハムスター卵巣(CH0)細胞は補体媒介溶解(CMCL)の完全縮小を生じ( Boydら, *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318(1996) )、その一方で、ノイラミニダーゼを用いてシアル酸残基の選択的除去によってDMCLの損失を生じない。抗体のグリコシル化が抗体依存性細胞毒性(ADCC)に影響を与えることも報告されている。特に、GlcNAcを二等分する触媒形態のグリコシルトランスフェラーゼである、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnIII)のテトラサイクリン制御発現のあるCHO細胞では、ADCC活性が向上したと報告されている( Umanaら, *Mature Biotech.* 17: 176-180[1999] )。

#### 【0090】

抗体のグリコシル化とは、典型的にはN-結合又はO-結合のいずれかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付与を指す。トリペプチドは、Xがプロリンを除く任意のアミノ酸である、アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニンの配列であり、アスパラギン側鎖への炭水化物部分が酵素的に付与される認識部位である。従って、ポリペプチドのこれらトリペプチド配列のいずれかの存在によって、潜在的なグリコシル化部位を作り出される。O-結合グリコシル化とは、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも用いられるが、殆どの場合にはセリン又はスレオニンへN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの一つの糖を付与するこ

10

20

30

40

50

とを指す。

【0091】

抗体のグリコシル化変異体は、抗体のグリコシル化パターンが改変された変異体である。改変とは、抗体に見出された一つ又は複数の炭水化物部分を除去し、その抗体へ一つ又は複数の炭水化物部分を加え、グリコシル化の組成（グリコシル化パターン）、グリコシル化の程度等を変化させることである。抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変して、それが上記に記載のトリペプチド配列（N-結合グリコシル化部位について）の一つ又は複数を含むようにすることによって簡便に完遂できる。この改変は、また、最初の抗体の配列へ一つ又は複数のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することによって生成される（O-結合グリコシル化部位について）。同じように、グリコシル化部位の除去は、抗体の天然グリコシル化部位内でのアミノ酸改変によって達成することが可能である。

【0092】

アミノ酸配列は、通常は、基礎となる核酸配列を改変することによって改変される。抗IFN-<sub>α</sub>抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該分野で知られている種々の方法によって調製される。これらの方法には、限定されないが、オリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及び抗IFN-<sub>α</sub>抗体の早期に調製した変異体又は非変異体形のカセット突然変異誘発による、天然源からの単離（天然発生アミノ酸配列変異体の場合）又は調製を含む。

【0093】

抗体のグリコシル化（グリコシル化パターンを含む）は、また、アミノ酸配列又は内在するヌクレオチド配列を改変せずに改変することができる。グリコシル化は、抗体を発現するために用いる宿主細胞に大きく依存する。潜在的な治療学としての、組み換え糖タンパク質の発現に用いられる細胞の型、例えば抗体が、希に天然細胞であることから、抗体のグリコシル化パターンの顕著な変化を期待することができる（例えば、Hslerら, J. Biol. Chem. 272: 9062-9070[1997]を参照せよ）。宿主細胞の選択に加えて、抗体の組み換え生産の間にグリコシル化へ影響する因子には、成長形態、培地形態、培養密度、酸素添加、pH、精製概要等が含まれる。オリゴ糖生産に関わる特定の酵素の導入又は過剰発現を含む、種々の方法が特定の宿主生物で達成されるグリコシル化パターンを改変するために提案されている（米国特許第5,047,335号；5,510,261号及び5,278,299号）。グリコシル化、又はある型のグリコシル化は、例えばエンドグリコシダーゼH（EndoH）を用いて、糖タンパク質から酵素的に除くことができる。さらには、組み換え宿主細胞は、例えばある型の多糖類のプロセッシングを欠損させることで、遺伝的に操作することができる。これら及び類似の技術が、当該分野で良く知られている。

【0094】

抗体のグリコシル化構造は炭水化物分析の簡便な技術によって容易に分析でき、それには、レクチンクロマトグラフィー、NMR、質量分析、HPLC、GPC、単糖類組成分析、逐次酵素消化、及び高pHアニオン交換クロマトグラフィーを用いて電荷に基づいてオリゴ糖を単離するHPAEC-PADが含まれる。分析的目的のためにオリゴ糖を遊離させる方法も知られており、限定されないが、酵素処理（ペプチド-N-グリコシダーゼ、F / エンド-β-ガラクトシダーゼを用いて広くおこなわれた）、主にO-結合構造を遊離するために激しいアルカリ環境を利用しての除去、及び無水ヒドラジンを利用した化学的方法でN-及びO-結合オリゴ糖の双方を遊離することが含まれる。

【0095】

（x）抗体の他の修飾

ここで開示されている中和化抗IFN-<sub>α</sub>抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。抗体を含有するリポソームは、例えばEpsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688(1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4,485,045号及び同4,544,545号に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5,013,556号に開示されている。

10

20

30

40

50

。

## 【0096】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、Martinら, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤(ドキソルビシン等)はリポソーム内に包含される。Gabizonら, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照されたい。

10

## 【0097】

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開第81/01145号を参照)を活性な薬剤に転化させるプロドラッグ活性化酵素に抗体をコンジュゲートさせることにより、ADEPTにおいて使用することができる。例えば国際公開第88/07378号及び米国特許第4975278号を参照されたい。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性な細胞毒形態に転化するよう、プロドラッグに作用し得る任意の酵素が含まれる。

## 【0098】

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアリールスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに転化するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシンB及びL)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なもの；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの転化に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ；ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化させるのに有用なラクタマーゼ；及びペニシリニアミダーゼ、例えばそれzelfフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化するのに有用なペニシリンVアミダーゼ又はペニシリングアミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを転化させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328:457-458[1987]を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、所望する細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

20

## 【0099】

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗IFN- $\alpha$ 抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換えDNA技術を使用して作成することができる(Neubergerら, Nature 312:604-608[1984])。

30

## 【0100】

本発明のある実施態様においては、無傷の抗体よりも抗体フラグメントを使用することが望ましい。この場合、その血清半減期を増大させるために抗体フラグメントを改変することが望ましい。これは、例えば、抗体フラグメントにサルベージレセプター結合エピトープを導入することにより(例えば、抗体フラグメント中の適当な領域の突然変異により、あるいはついで抗体フラグメントの何れかの末端又は中央に、例えばDNA又はペプチド合成により融合されるペプチドタグ内にエピトープを導入することにより)、達成できる。

40

1996年10月17日に発行の国際公開第96/32478号を参照せよ。

50

## 【0101】

サルベージレセプター結合エピトープは、一般的には、Fcドメインの一又は二つのループからの一又は複数のアミノ酸残基が抗体断片の類似位置に移される領域を構成する。更により好ましくは、Fcドメインの一又は二つのループの3又はそれ以上の残基が移される。なお更に好ましくは、エピトープはFc領域(例えばIgGの)のCH2ドメインから取上げられ、抗体のCH1、CH3、又はV<sub>H</sub>領域、あるいは一以上のそのような領域に移される。別法として、エピトープをFc領域のCH2ドメインから取上げ、抗体断片のC<sub>L</sub>領域又はV<sub>L</sub>領域、又は両方に移す。

## 【0102】

中和化抗IFN- 抗体の共有結合修飾も本発明の範囲内に含まれる。それらは、化学合成により、又は適用可能ならば抗体の酵素的もしくは化学的開裂により製造し得る。他のタイプの抗体の共有結合修飾は、抗体の標的とするアミノ酸残基を、選択した側鎖又はNもしくはC末端残基と反応できる有機の誘導体化剤と反応させることにより、分子中に導入される。ポリペプチド共有結合修飾の例は、特にここに出典を明示して取り込む米国特許第5,534,615号に記載されている。抗体の共有結合修飾の好適なタイプは、米国特許第4,640,835号；同4,496,689号；同4,301,144号；同4,670,417号；同4,791,192号又は同4,179,337号に記載されたようにして、様々な非タンパク様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの1つに抗体を結合させることから構成される。

## 【0103】

## 2. 所望する特性を有する抗体のスクリーニング

抗体を作製する技術は、上に記載されている。従って、所望する広範な中和化特性を有する抗IFN- 抗体は、当該分野で知られている技術で同定することができる。

## 【0104】

## (i) 結合アッセイ

従って、例えば、本発明の抗中和化IFN- 抗体は、候補抗体を1つ又は複数の個々のIFN- サブタイプ、又は種々のIFN- サブタイプのアレイ又は混合物とインキュベートし、IFN- の生物学的活性の結合及び中和化をモニターすることによって、IFN- 結合アッセイにおいて同定することができる。この結合アッセイは、精製IFN- ポリペプチド類によっておこなうことができる。1つの実施態様では、この結合アッセイは競合アッセイであり、それにおいては、IFN- 結合に関して既知の抗IFN- 抗体と競合する候補抗体の能力が評価される。このアッセイは、ELISA型を含む種々の型でおこなうことが可能であり、下の実施例においても例示されている。候補抗体のIFN- 結合は、下に記載のようなBIAcore(商品名)バイオセンサーリアッセイでもモニターすることが可能である。

## 【0105】

当該分野で知られている任意の適切な競合結合アッセイは、特定のIFN- 種への結合に関して、マウス抗ヒトIFN- モノクローナル抗体9F3と競合する候補抗IFN- モノクローナル抗体の能力を特徴付けるのに利用することができる。日常的な競合アッセイは、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane(1988)に記載されている。その他の実施態様では、下の実施例2に記載されているIFN- 結合ELISAアッセイは、修飾して候補抗体と9F3抗体の間のIFN- 結合競合に用いることができる。そのようなアッセイは、IFN- をマイクロタイタープレート上に層状にし、標識した9F3抗体の選択した濃度と非標識抗IFN- 抗体又は非標識コントロール抗体の連続希釈物と混合したその層状にしたプレートをインキュベートし、9F3抗体標識からのシグナルを検出及び測定し、次いで、抗体の種々の希釈物によって表示されたシグナル測定値を比較することによっておこなうことができる。

## 【0106】

## (ii) 抗ウイルスアッセイ

IFN- の生物学的活性を中和する候補抗体の能力は、例えば、Kawade, J. Interferon Res. 1:61-70(1980)、又はKawade及びWatanabe, J. Interferon Res. 4:571-584(1984)に記

10

20

30

40

50

載のように、IFN- の抗ウイルス活性の中和化をモニターすることによって実行することができる。要約すると、候補抗体の種々の希釈物と前もって混合した固定した濃度のIFN- をヒト羊膜由来FL細胞へ添加し、適切なウイルス、例えばシンドビスウイルスを用いてIFN- の抗ウイルス活性を中和する候補抗体の能力を測定する。この力価は、国際ヒトIFN- (NIH Ga23-901-527) で決められたように国際単位 (IU) で表す。

【0107】

候補抗IFN- 抗体は、抗体のある濃度によって、コントロール抗体の等量濃度の存在下で測定された抗ウイルス活性阻害のベースラインレベルよりも高い抗ウイルス活性が阻害される場合、選択したIFN- サブタイプの抗ウイルス活性を阻害することができると考えられている。場合によっては、候補抗IFN- 抗体のある濃度は、コントロール抗体の等量濃度の存在下で測定したベースライン活性と比較して、抗ウイルス活性アッセイにおいて選択されたIFN- サブタイプの抗ウイルス活性の少なくとも約60%、又は少なくとも又は約70%、好ましくは少なくとも又は約75%、又はより好ましくは少なくとも又は約80%、又はさらにより好ましくは少なくとも又は約85%、又はさらにより好ましくは少なくとも又は約90%、又はさらにより好ましくは少なくとも又は約95%、又は最も好ましくは少なくとも又は約99%を阻害することができる。候補抗IFN- 抗体は、コントロール抗体の等量濃度の存在下において測定された抗ウイルス活性阻害のベースラインレベルよりも高い抗ウイルス活性阻害を示す抗体の濃度でないならば、選択されたIFN- サブタイプの抗ウイルス活性を阻害することができないと考えられている。

【0108】

好ましい実施態様では、ウイルス感染力アッセイで用いた各インターフェロン種は、前もって選択した数のIFN- 標準の単位によって誘導されたのと同じレベルのウイルス生育阻害を提供する濃度へ滴定される。この濃度は、対象であるインターフェロン種の標準化された単位を提供することを担う。種々のIFN- サブタイプの抗ウイルス活性を阻害する抗IFN- 抗体の能力を評価するために、特定のIFN- サブタイプの抗ウイルス活性の50%を阻害する抗IFN- 抗体の有効濃度 (EC50) (活性の標準化した単位を提供する滴定された濃度)を、試験される各IFN- サブタイプについて測定した。

【0109】

1つの実施態様では、抗ウイルス活性中和化アッセイは、下の実施例1に記載のようにおこなった。要約すると、96ウェルマイクロタイパープレート上でA549細胞を $5 \times 10^5$  A549細胞/ウェルの密度まで生育させる。候補抗IFN- 抗体の連続希釈物を、1時間、37ECで100:1の全容量の中で0.2単位/1:1の選択したIFN- サブタイプ (0.2単位/1:1のNIH参考標準組み換えヒトIFN- 2へ標準化)とともにインキュベートした。各100:1容量の抗体/インターフェロンインキュベーション混合物を、次いで $5 \times 10^5$  A549細胞及びマイクロタイパープレート上の個々のウェル中の100:1の培養培地へ添加し、各ウェルで100単位/mlの最終IFN- 濃度を生じせしめた。この結果として生じた細胞培養混合物を、37ECで24時間インキュベートした。その後、細胞を $2 \times 10^5$  pfuの脳心筋炎ウイルス (EMC) で刺激し、37ECでさらに24時間インキュベートした。インキュベーションの最期に、視覚顕微鏡的検査又はクリスタル・バイオレット染色によって細胞生存率を確かめた。アッセイでの特定のIFN- サブタイプの抗ウイルス活性の50%を阻害する候補IFN- 抗体の有効濃度 (EC50) を、試験する各IFN- サブタイプについて測定した。

【0110】

本発明の一側面では、対象であるIFN- サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN- 抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN- サブタイプのそれぞれについて、最大又は約20:g/mlまでの、最大又は約10:g/mlまでの、最大又は約5:g/mlまでの、最大又は約4:g/mlまでの、最大又は約3:g/mlまでの、最大又は約2:g/mlまでの、最大又は約1:g/mlまでのEC50を示す。

【0111】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN- サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和

10

20

30

40

50

化を示す抗IFN-<sub>1</sub> 抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub> サブタイプのそれぞれに関して、又は約0.1g/mlから又は約20:g/mlまでの、又は約0.1:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約0.1:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約0.1:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約0.1:g/mlから又は約3:g/mlまでの、又は約0.1:g/mlから約2:g/mlまでの、又は約0.1:g/mlから約1:g/mlまでのEC50を示す。

#### 【0112】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN-<sub>1</sub> サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN-<sub>1</sub> 抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub> サブタイプのそれぞれに関して、又は約0.2g/mlから又は約20:g/mlまでの、又は約0.2:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約0.2:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約0.2:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約0.2:g/mlから又は約3:g/mlまでの、又は約0.2:g/mlから約2:g/mlまでの、又は約0.2:g/mlから約1:g/mlまでのEC50を示す。 10

#### 【0113】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN-<sub>1</sub> サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN-<sub>1</sub> 抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub> サブタイプのそれぞれに関して、又は約0.3g/mlから又は約20:g/mlまでの、又は約0.3:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約0.3:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約0.3:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約0.3:g/mlから又は約4:g/mlまでの、又は約0.3:g/mlから約2:g/mlまでの、又は約0.3:g/mlから約1:g/mlまでのEC50を示す。 20

#### 【0114】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN-<sub>1</sub> サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN-<sub>1</sub> 抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub> サブタイプのそれぞれに関して、又は約0.4g/mlから又は約20:g/mlまでの、又は約0.4:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約0.4:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約0.4:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約0.4:g/mlから又は約3:g/mlまでの、又は約0.4:g/mlから約2:g/mlまでの、又は約0.4:g/mlから約1:g/mlまでのEC50を示す。 30

#### 【0115】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN-<sub>1</sub> サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN-<sub>1</sub> 抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub> サブタイプのそれぞれに関して、又は約0.5g/mlから又は約20:g/mlまでの、又は約0.5:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約0.5:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約0.5:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約0.5:g/mlから又は約3:g/mlまでの、又は約0.5:g/mlから約2:g/mlまでの、又は約0.5:g/mlから約1:g/mlまでのEC50を示す。

#### 【0116】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN-<sub>1</sub> サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN-<sub>1</sub> 抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub> サブタイプのそれぞれに関して、又は約0.6g/mlから又は約20:g/mlまでの、又は約0.6:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約0.6:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約0.6:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約0.6:g/mlから又は約3:g/mlまでの、又は約0.6:g/mlから約2:g/mlまでの、又は約0.6:g/mlから約1:g/mlまでのEC50を示す。 40

#### 【0117】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN-<sub>1</sub> サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN-<sub>1</sub> 抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub> サブタイプのそれぞれに関して、又は約0.7g/mlから又は約20:g/mlまでの 50

、又は約0.7:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約0.7:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約0.7:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約0.7:g/mlから又は約3:g/mlまでの、又は約0.7:g/mlから約2:g/mlまでの、又は約0.7:g/mlから約1:g/mlまでのEC50を示す。

【0118】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN-<sub>1</sub>サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN-<sub>1</sub>抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub>サブタイプのそれぞれに関して、又は約0.8:g/mlから又は約20:g/mlまでの、又は約0.8:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約0.8:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約0.8:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約0.8:g/mlから又は約3:g/mlまでの、又は約0.8:g/mlから約2:g/mlまでの、又は約0.8:g/mlから約1:g/mlまでのEC50を示す。

【0119】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN-<sub>1</sub>サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN-<sub>1</sub>抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub>サブタイプのそれぞれに関して、又は約0.9:g/mlから又は約20:g/mlまでの、又は約0.9:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約0.9:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約0.9:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約0.9:g/mlから又は約3:g/mlまでの、又は約0.9:g/mlから約2:g/mlまでの、又は約0.9:g/mlから約1:g/mlまでのEC50を示す。

【0120】

本発明のその他の側面では、対象であるIFN-<sub>1</sub>サブタイプに対する抗ウイルス活性の中和化を示す抗IFN-<sub>1</sub>抗体は、上に記載のA549細胞EMCウイルス阻害アッセイにおける対象のIFN-<sub>1</sub>サブタイプのそれぞれに関して、又は約1:g/mlから又は約20:g/mlまでの、又は約1:g/mlから又は約10:g/mlまでの、又は約1:g/mlから又は約5:g/mlまでの、又は約1:g/mlから約4:g/mlまでの、又は約1:g/mlから又は約3:g/mlまでの、又は約1:g/mlから約2:g/mlまでのEC50を示す。

【0121】

(iii) クロス-プロッキングアッセイ

興味の対象である抗体によって結合したIFN-<sub>1</sub>上のエピトープと結合する抗体のスクリーニングのために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane(1988)に記載された日常的なクロスプロッキングアッセイを用いることができる。あるいは又はさらには、エピトープマッピングは当該分野で知られている方法によっておこなうことができる。例えば、本発明のモノクローナル抗体によって結合したIFN-<sub>1</sub>エピトープは、Fendlyら. Cancer Research 50:1550-1558(1990)に記載のような競合結合解析によって測定することができる。その他の実施では、クロスプロッキング研究は、マイクロタイタープレート上の直接蛍光によっておこなうことができる。この方法では、興味の対象であるモノクローナル抗体を、確立された手法を用いて、フルオレッセインイソチオシアネート(FITC)とコンジュゲートさせる(Wofsyら. Selected Method in Cellular Immunology, p.287, Mishel及びSchiigi(編) San Francisco: W. J. Freeman Co.(1980))。選択したIFN-<sub>1</sub>をマイクロタイタープレートのウェル上に層状にし、その層状にしたウェルを、(1)興味の対象のFITC-標識モノクローナル抗体、及び(2)非標識試験モノクローナル抗体の混合物とインキュベートし、抗体によって表示されたクロスプロッキングのレベルを定めるために、各ウェルの蛍光を定量化した。モノクローナル抗体は、関連しないモノクローナル抗体コントロールと比較して50%又はそれより高く、それが他の結合をブロックした場合、エピトープを共有するものと考えられる。

【0122】

細胞ベース生物学的アッセイで得られた結果は、その後、動物、例えばマウス、モデル、及びヒト臨床試験での試験によって追跡することができる。望ましくは、所望される特性

10

20

30

40

50

を有すると同定されたマウスモノクローナル抗体は、当該分野で知られている技術によってキメラ抗体へ変換、又はヒト化することができ、それには、その開示がここで参考文献によって取り入れられている米国特許第5,821,337号に記載のように「遺伝子変換突然変異」を含む。ここでの特定の抗IFN-<sub>α</sub>抗体のヒト化は、また、下の実施例に記載されている。

【0123】

(iv) ファージディスプレイ法

本発明の抗IFN-<sub>α</sub>抗体は、所望される活性を有する合成抗体クローニングするため、コンビナトリアルライプラリを用いて同定することができる。原則として、合成抗体クローニングを、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Fv)の種々の断片(例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、等)を表示するファージを有するファージライプラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライプラリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローニングは抗原へ吸収され、それによって、ライプラリの非結合クローニングから分離される。次いで、この結合クローニングは、抗原から溶出させることができあり、抗原吸収/溶出の付加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗IFN-<sub>α</sub>抗体は、興味の対象であるファージクローニングを選択するために適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて、興味の対象であるファージクローニングからのFv配列、及びKabatら(1991)、上掲に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いての全長抗IFN-<sub>α</sub>抗体クローニングの構築によって得ることができる。

10

20

30

40

【0124】

ファージディスプレイライプラリの構築

抗体の抗原結合ドメインは、それぞれ約110アミノ酸の2つの可変(V)領域である軽(VL)及び重(VH)鎖で形成され、その双方には、3つの超可変ループ又は相補鎖決定領域(CDRs)が存在する。可変領域は、Winterら(Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994))に記載のように、VH及びVLが短くて柔軟なペプチドを介して共有結合している一本鎖Fv(scFv)断片として、又は定常ドメインと融合して非共有的に相互作用しているD(ab')<sub>2</sub>断片のいずれかとしてファージ上に機能的に表示することができる。ここで用いられているように、scFvコード化ファージクローニング、及びFab又はF(ab')<sub>2</sub>コード化ファージクローニングは、総称して「Fvファージクローニング」又は「Fvクローニング」と呼ぶ。

【0125】

動物の天然レパートリー(抗原刺激前のレパートリー)は、それに本質的にどんな非自己分子と中程度の親和性(約10<sup>6</sup>から10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>のK<sub>d</sub><sup>-1</sup>)で結合することができる抗体を提供する。抗体結合部位の配列多様性は、生殖細胞に直接にコードされておらず、V遺伝子から組み合わせ様式でアセンブリしている。ヒト重鎖では、第一の2つの超可変ループ(H1及びH2)は、50未満のVH遺伝子セグメントから得られ、それはDセグメント及びJHセグメントと組み合わせられて第三の超可変ループ(H3)を作り出す。ヒト軽鎖では、第一の2つの超可変ループ(L1及びL2)及び第三(L3)の殆どは、およそ30未満のV8、及びおよそ30未満のV6セグメントから得られ、第三の超可変ループ(L3)を完成する。

【0126】

幹細胞のV遺伝子セグメントの各組み合わせ再配列は、一本のVH-VL組み合わせを発現するB細胞を生じる。免疫化は、免疫原に結合して増幅(クローニング性増殖)し、対応する抗体を分泌する組み換えを作り出すよう任意のB細胞を誘発する。これらの天然抗体は、その後、突然変異誘発の過程及び親和性成熟として知られている選択によって高親和性(10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup>のK<sub>d</sub><sup>-1</sup>)へ成熟する。この時点の後に、通常、細胞を除かれてハイブリドーマを調製され、高親和性モノクローナル抗体が生成される。

【0127】

この過程の3つの段階の後、VH及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって分離してクローニングし、ファージライプラリにおいてランダムに組み換えられることが可能であり、それは、Winterら(Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994))に

50

記載のように抗原結合クローンについて探索することが可能である。免疫化したソースからのライプラリは、ハイブリドーマを構成する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、天然レパートリーをクローニングして、Griffithsら, EMBO J, 12: 725-734(1993)に記載のようにどんな免疫化もせずに、幅広い非自己及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一のソースを提供することが可能である。最終的には、天然ライプラリは、また、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、幹細胞からの再配列されていないV又はVIII遺伝子セグメントをクローニングし、及びランダム配列を有するPCRプライマーを利用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロでの再配列を完成させることによって合成的に作製することができる。

## 【0128】

10

ファージディスプレイは、B細胞を模倣する。纖維状ファージは、マイナーコートタンパク質pIIIへの融合によって、抗体断片を表示するのに用いられる。この抗体断片は、一本鎖Fv断片として表示することが可能であり、そのVH及びVLドメインは、例えば、Marksら, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載のような、又は、例えば、Hoogenboomら, Nucl. Acids. Res., 19: 4133-4137(1991)に記載のような、1つの鎖はpIIIと融合し、もう一方の鎖は、幾つかの野生型コートタンパク質を置換することによってファージ表面上に表示されるようになるFabコートタンパク質構造のアセンブリがある細菌宿主細胞のペリプラズムへ分泌されるFab( $F(ab')_2$ を含む)断片のように、柔軟なポリペプチドペースターによって同じポリペプチド鎖上に連結されている。抗体断片がpIIIのN末端と融合している場合、ファージは感染性がある。しかし、pIIIのN末端ドメインが切り出されて、融合物が第二のドメインで作製され、ファージは感染力がなく、野生型pIIIはヘルパーファージによって提供されるべきである。

20

## 【0129】

pIII融合物及びファージの他のタンパク質は、同じファージレプリコン内で、又は異なるレプリコン上ですべてがコードされる可能性がある。2つのレプリコンが利用される場合、このpIII融合物は、ファージミド、ファージ複製起点を有するプラスミド上でコードされる。ファージミドは、pIIIを含むすべてのファージタンパク質を提供するM13K07のようなヘルパーファージによる「レスキュー」によってファージ粒子へパッケージされることが可能であるが、欠陥のある起点のために、そのものは、Vieira及びMessing, Meth. Enzymol., 153: 3-11(1987)に記載のように、競合してファージミドとともに不十分にパッケージされる。好ましい方法では、Bassら, Proteins, 8: 309-314(1990)及び国際公開第92/09690号(1992年6月11日に出版のPCT/US91/09133)に記載のように、組み換えファージが粒子の表面上にFvコートタンパク質の1つより多いコピーを表示する微量にすぎないファージ粒子を許容する条件下で生育できうるように、ファージ表示系は設計される。

30

## 【0130】

一般的に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。抗IFN- $\alpha$ クローンに有利になるように偏ったライプラリが望ましいならば、検体をIFN- $\alpha$ で免疫化して抗体応答を生成させ、そして、脾臓細胞及び/又は他の末梢血リンパ球(PBLS)である循環B細胞を、ライプラリ構築のために回収する。好ましい実施態様では、IFN- $\alpha$ 免疫化が、IFN- $\alpha$ に対するヒト配列抗体を産するB細胞を生じるように、抗ヒトIFN- $\alpha$ クローンに有利なように偏っているヒト抗体遺伝子断片ライプラリは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイ(及び、機能的な内因性抗体産生系を欠く)を有するトランスジェニックマウスにおける抗ヒトIFN- $\alpha$ 抗体応答を生成することによって得られる。

40

## 【0131】

その他の好ましい実施態様では、IFN- $\alpha$ サブタイプに対する幅広い活性を有する抗IFN- $\alpha$ 抗体を産するB細胞を含む抗体応答を生成するために、動物は、種々の、好ましくはすべてがIFN- $\alpha$ サブタイプの混合物で免疫化される。その他の好ましい実施態様では、動物は、下の実施例1に記載のような、センダイウイルスにより誘導されるバーキットリンパ腫細胞(ナマルバ細胞)によって分泌されるヒトリンパ芽球腫インターフェロンに存在する

50

ヒトIFN- $\gamma$ サブタイプの混合物で免疫化される。そのようなヒトリンパ芽腫インターフェロンの適切な調製物は、シグマ化学会社、セントルイス、ミズーリー州から商業的（製品第I-9887）に得ることができる。

#### 【0132】

抗IFN- $\gamma$ 反応細胞集団のさらなる濃縮は、適切なスクリーニング手法を利用してIFN特異的膜結合抗体を発現するB細胞を単離すること、例えば、IFNアフィニティクロマトグラフィーによる細胞分離、又は蛍光色素標識IFNへの細胞の吸着とその後の蛍光標示式細胞分取器（FACS）によって得ることができる。

#### 【0133】

あるいは、非免疫化供与体からの脾臓細胞及び/又はB細胞又は他のPBLの利用によって可能性のある抗体レパートリーのより良い表示が提供され、また、IFNが免疫原ではない任意の動物（ヒト又は非ヒト）種を利用した抗体ライブラリの構築が可能となる。インビトロの抗体遺伝子コンストラクトを取り込むライブラリに関しては、幹細胞を被検体から収集して非再配列の抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。興味の対象である免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、オオカミ、犬科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ、及びトリ種等から得ることができる。

#### 【0134】

抗体可変遺伝子セグメント（VH及びVLセグメントを含む）をコードする核酸を、興味の対象の細胞から回収して増幅した。再配列したVH及びVL遺伝子ライブラリの場合では、その所望するDNAは、Orlandiら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)に記載されているように、リンパ球からのゲノムDNA又はmRNAを単離し、それに続く再配列したVH及びVL遺伝子の5'及び3'末端と一致するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって得ることが可能であり、よって発現のための多様なV遺伝子レパートリーを作製することができる。このV遺伝子は、Orlandiら、(1989)及びWardら、Nature, 341: 544-546(1989)に記載のように、成熟Vドメインをコードするエクソンの5'末端のバックプライマーとJセグメントに基づいた前方向プライマーにより、cDNA及びゲノムDNAから増幅することが可能である。しかしながら、cDNAからの増幅のためには、バックプライマーは、また、Jonesら、Biotechnol., 9:88-89(1991)に記載のようにリーダーエクソンに、前方向プライマーは、Sastryら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:5728-5732(1989)に記載のように定常領域内に基づくことが可能である。相補性を最大にするために、Orlandiら(1989)又はSastryら(1989)に記載のように、縮重をプライマーへ取り込むことが可能である。好ましくは、例えば、Marksら、J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)の方法に記載のように、又はOrumら、Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498(1993)の方法に記載のように、免疫細胞の核酸試料に存在するすべての入手可能なVH及びVL配列を増幅するために、各V遺伝子ファミリーを標的にしたPCRプライマーを用いて、そのライブラリの多様性を最大にする。発現ベクターへの増幅DNAのクローニングに関しては、希な制限部位を、Orlandiら(1989)に記載のように、又はClacksonら、Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにタグしたプライマーによるさらなるPCR増幅によって、PCRプライマー内の1つの末端へタグとして導入することができる。

#### 【0135】

合成的に再配列したV遺伝子のレパートリーは、V遺伝子セグメントからインビオで誘導することができる。殆どのヒトVH遺伝子セグメントはクローニング及び配列が決定（Tomlinsonら、J. Mol. Biol. 227: 776-798(1992)に報告されている）、そしてマッピングされている（Matsudaら、Nature Genet., 3: 88-94(1993)）；これらクローニングされたセグメント（H1及びH2ループのすべての主要なコンホメーションを含む）は、Hoogenboom及びWinter、J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、多様な配列と長さのH3ループをコードするPCRプライマーによる多様なVH遺伝子レパートリーを作製するのに用いられる。VHレパートリーは、また、Barbasら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461(1992)に記載されているように、単一の長さの長いH3ループに焦点を合わせたすべての配列多様性をともなって作製することができる。ヒトV6及びV8セグメントはクローニング

10

20

30

40

50

及び配列決定がなされ (Williams及びWinter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461(1993) )、合成軽鎖レパートリーを作製するのに利用することができる。VH及びVLフォールドの範囲及びL3及びH3の長さに基づく合成的V遺伝子レパートリーは、相當に構造的多様性を有する抗体をコードする。DNAをコードするV遺伝子の増幅に続いて、生殖系のV遺伝子セグメントは、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)の方法に従ってインピトロで再配列することができる。

## 【0136】

抗体断片のレパートリーは、幾つかの方法でVH及びVL遺伝子レパートリーを共に組み合わせることによって構築することができる。各レパートリーを異なるベクターで作製し、そのベクターを、例えばHogrefeら, Gene, 128: 119-126(1993)に記載のようにインピトロで、又はコンビナトリアル・インフェクション、例えばWaterhouseら, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266(1993)に記載のloxP系によってインピボで組み換えすることが可能である。このインピボの組み換え手法では、大腸菌の形質転換効率によって強いられるライプラリの大きさの限界を克服するために、二本鎖種のFabフラグメントが利用される。未処理のVH及びVLレパートリーは、1つはファージミドへ、そして他はファージベクターへと個別にクローニングされる。この2つのライプラリは、その後、各細胞が異なる組み合わせを有し、そのライプラリの大きさが、存在する細胞の数 (約  $10^{12}$  クローン) によってのみ限定されるように、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせられる。双方のベクターは、VH及びVL遺伝子が単一のレプリコンへ組み換えられ、ファージビリオンへ共にパッケージされるように、インピボの組み換えシグナルを有する。これら巨大なライプラリは、良好な親和性 (約  $10^{-8} M$  の  $K_d^{-1}$  ) の多くの多様な抗体を提供する。

## 【0137】

別法として、このレパートリーは、例えばBarbasら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982(1991)に記載のように同じベクターへ連続してクローニング、又は、Claksonら, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにPCR、続いてクローニングすることでアセンブリすることができる。PCRアセンブリは、また、柔軟なペプチドスペーサーをコードしているDNAとVH及びVL DNAを連結させて、単鎖のFv (scFv) レパートリーを形成することに利用することができる。さらに他の技術では、「細胞内のPCRアセンブリ」は、Embletonら, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837(1992)に記載のように、PCRによってリンパ球内のVH及びVL遺伝子を組み合わせて、その後、連結した遺伝子のレパートリーをクローニングするのに利用される。

## 【0138】

未処理のライプラリ (天然又は合成のいずれか) によって產生された抗体は中度の親和性 (約  $10^6$  ~  $10^7 M^{-1}$  の  $K_d^{-1}$  ) である可能性があるが、Winterら (1994), 上掲に記載のように第二番目のライプラリから構築して遊離することによって、親和性成熟をもインピトロで模倣することが可能である。例えば、Hawkinsら, J. Mol. Biol. 226: 889-896(1992)の方法、又はGramら, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580(1992)の方法においてエラー・プローラーによるPCRを利用して、突然変異をインピトロでランダムに導入することができる。さらには、1つ又はそれより多いCDRをランダムに変異させることによって、例えば、選択した個々のFvクローニングにおいて、興味の対象であるCDRまで及ぶランダム配列を有するプライマーによるPCRを利用して、そしてより高い親和性クローニングすることで親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開第9607754号 (1996年3月14日に発行) は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域へ突然変異生成を誘導して軽鎖遺伝子のライプラリを作製する方法を記載している。その他の有効な手法は、Marksら, Biotechnol. 10: 779-783(1992)に記載のように、非免疫化供与体から得られた天然で発生するVドメイン変異体のレパートリーによるファージディスプレイによって選択されたVH又はVLドメインを組み換えること、及び数回のチェーン・シャッフリングでのより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術は、 $10^{-9} M$  の範囲の親和性の抗体及び抗体断片の產生を可能にする。

10

20

30

40

50

## 【0139】

## 抗IFN クローンのためのファージディスプレイライブリのパニング

## a. IFN の合成

ここで用いられているIFN サブタイプをコードする核酸配列は、公開されたインターフェロンのアミノ酸及び核酸配列、例えば、J. Interferon Res., 13: 443-444(1993)の種々のI型インターフェロンのゲノム及びcDNA配列を有する参考文献の編集、及びそこで引用されている参考文献を利用して設計することができる。IFN A(IFN 2)、IFN B(IFN 8)、IFN C(IFN 10)、IFN D(IFN 1)、IFN E(IFN 22)、IFN F(IFN 21)、IFN G(IFN 5)、及びIFN H(IFN 14)アミノ酸配列又はcDNA配列については、Goeddelら, Nature, 290: 20-26(1981)の23-24頁にある図3及び4を参照せよ。IFN 7(IFN J)のアミノ酸配列をコードするcDNAについては、Cohenら, Dev. Biol. Standard, 60: 111-122(1985)を参照せよ。興味の対象であるインターフェロンをコードするDNAは、当該分野で既知の種々の方法によって調製することができる。限定されるものではないが、これらの方法には、Engelsら, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28:716-734(1989)に記載されている任意の方法による化学合成、例えばトリエステル、亜リン酸塩、ホスホラミダイト及びH-ホスホネート法が含まれる。1つの実施態様では、発現宿主細胞によって好まれるコドンは、インターフェロンコード化DNAの設計に利用される。あるいは、インターフェロンをコードするDNAは、ゲノム又はcDNAライブリから単離することが可能である。

## 【0140】

興味の対象であるインターフェロンをコードするDNA分子の構築に続いて、そのDNA分子は、プラスミド等の発現ベクターの発現コントロール配列と作用可能に連結し、このコントロール配列は、そのベクターで形質転換した宿主細胞によって認識される。一般的に、プラスミドベクターは、その宿主細胞と適合する種から誘導された複製及びコントロール配列を有する。このベクターは、通常は、形質転換細胞で表現型の選択を提供する可能なタンパク質をコードする配列だけでなく複製部位を有する。

## 【0141】

原核生物宿主中での発現に関しては、好適なベクターにはpBR322(ATCC第37017)、phGH107(ATCC第40011)、pB0475、pS0132、pRIT5、pRIT20又はpRIT30シリーズの任意のベクター(Nilsson及びAbrahmsen, Meth. Enzymol., 185:144-161(1990))、pRIT2T、pKK233-2、pDR540及びpPL-ラムダが含まれる。本発明の発現ベクターを含む原核生物宿主細胞には、大腸菌K12株294(ATCC第31446)、大腸菌株JM101(Messing等, Nucl. Acid Res., 9:309(1981))、大腸菌株B、大腸菌II1776(ATCC第31537)、大腸菌c600(Appleyard, Genetics, 39: 440(1954))、大腸菌W3110(F-、ガンマ-、原栄養菌株、ATCC第27325)、大腸菌株27C7(W3110、tonA、phoA、E15、(argF-lac)169、ptr3、degP41、ompT、kan<sup>r</sup>) (米国特許第5,288,931号、ATCC第55244)、枯草菌、サルモネラ菌、セラチア・マルセッセンス、及びシュードモナス種が含まれる。

## 【0142】

原核生物に加えて、真核生物体、例えば酵母菌、あるいは多細胞生物体由来の細胞を宿主細胞として使用することができる。一般的なパン酵母又はサッカロミセス・セレヴィシアのような酵母宿主細胞中での発現に関しては、好適なベクターには、2ミクロンプラスミドに基づくエピソーム的に複製するベクター、組込み型ベクター、及び酵母人工染色体(YAC)ベクターが含まれる。SF9細胞のような昆虫宿主細胞での発現に関しては、好適なベクターにはバキュロウイルスベクターが含まれる。植物宿主細胞、特にタバコのような双子葉植物宿主における発現に対しては、好適な発現ベクターにはアグロバクテリウム・ツメファシエンスのTiプラスミドに由来するベクターが含まれる。

## 【0143】

しかしながら、関心は脊椎動物宿主細胞に対して最も大きい。有用な哺乳動物宿主細胞の例には、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. G

20

30

40

50

en Virol., 36:59 (1997) ; ハムスター乳児腎細胞 (BHK, ATCC CCL 10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -D H F R (CHO, Urlaub及びChasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216) ; マウスのセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)) ; サルの腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70) ; アフリカミドリザルの腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587) ; ヒト子宮頸癌細胞 (HELA, ATCC CCL 2) ; イヌ腎細胞 (MDCK, ATCC CCL 34) ; バッファローラット肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442) ; ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75) ; ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065) ; マウス乳房腫瘍 (MMT 060562, ATCC CCL51) ; TRI細胞 (Mother等, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982)) ; MRC5細胞 ; FS4細胞 ; 及びヒト肝癌細胞株 (HepG2) が含まれる。哺乳動物宿主細胞における発現に対しては、有用なベクターには、SV40由来のベクター、サイトメガロウイルス由来のベクター、例えばpRK5 及びpRK7を含むpRKベクター (Suva等, Science, 237:893-896 (1987) ; 欧州特許第307,247号(3/15/89)、欧州特許第278,776号(8/17/88))、ワクシニアウイルス又は他のポックスウイルス由来のベクター、及びモロニーのマウス白血病ウイルス (MoMLV) 由来のベクターのようなレトロウイルスベクターが含まれる。10

#### 【0144】

場合によっては、対象のペプチドをコードしているDNAは宿主細胞によって培地中への発現産物の分泌を生じさせる分泌リーダー配列に作用可能に結合される。分泌リーダー配列の例には、stII、エコチン (ecotin)、lamb、ヘルペスGD、Ipp、アルカリホスファターゼ、インペルターゼ、及びアルファ因子が含まれる。ここでの使用にまた適しているのはプロテインAの36アミノ酸リーダー配列である (Abrahmsenら, EMBO J., 4:3901(1985) )。20

宿主細胞はこの発明の上述の発現又はクローニングベクターでトランスフェクトされ、好みしくは形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように変性された一般的な培養液中で培養される。

#### 【0145】

トランスフェクションとは、実際に任意のコード化配列が発現するかどうか分からない宿主細胞による発現ベクターの取り込みを意味する。トランスフェクションの多くの方法は、通常の技能を有する技術者に知られており、例えば、CaPO<sub>4</sub>及び電気穿孔法がある。一般に成功したトランスフェクションは、宿主細胞内で該ベクターの働きの兆候が現れた時に認識される。30

#### 【0146】

形質転換とは、DNAが染色体外成分として又は染色体組み込みによってのいずれかで複製可能となるように、生物にDNAを導入することを意味する。用いる宿主細胞によって、その細胞に適した基本的な技術を用いて形質転換は行われる。Sambrookら, Molecular Cloning (第2版) コールドスプリングハーバー研究所, ニューヨーク (1989) のセクション1.82に記載されているような塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は、一般に頑丈な細胞壁バリヤーを持つ原核生物又は他の細胞で利用される。Shawら, Gene, 23:315(1983) 及び1989年6月29日公開の国際公開89/05859に記載されているように、アグロバクテリウム・トウメファシエンスによる感染は、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に関しては、Sambrookら, 上掲のセクション16.30-16.37に記載されているリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は、Axelによる1983年8月16日に発行の米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingenら, J. Bact., 130:946 (1977) 及びHsiaoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、例えば、核注入、電気穿孔法による、又はプロトプラスト融合等によりDNAを細胞中に導入する他の方法も利用され得る。40

#### 【0147】

興味の対象であるインターフェロンを産するために用いる原核生物宿主細胞は、一般的に、Sambrookら, 上掲に記載のように培養することが可能である。

10

30

40

50

## 【0148】

本発明のペプチドを作成するのに使用される哺乳動物宿主細胞は、様々な培地で培養することができる。商業的に入手可能な培地、例えばハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM)、シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM)、シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。さらに、参考文献としてここで取り入れられているすべての開示であるHam及びWallace, Meth. in Enz. 58:44(1979), Barnes及びSato, Anal. Biochem. 102:255(1980), 米国特許第4,767,704号; 同4,657,866号; 同4,927,762号; 又は同4,560,655号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 米国特許再発行第30,985号; 又は米国特許第5,122,469号に記載された任意の培地は、宿主細胞のための培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオシド(例えばアデノシン、及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン(商品名)薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)、及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

10

## 【0149】

この開示で言及している宿主細胞には、宿主動物内の細胞だけでなくインビトロ培養での細胞が含まれる。

20

細胞内発現系又は細胞膜周辺腔分泌系では、宿主細胞膜/細胞壁を破壊することによって(例えば、浸透圧ショック又は界面活性剤に宿主細胞膜を可溶化することによって)、組み換え発現したインターフェロンタンパク質を培養細胞から回収することができる。あるいは、細胞外分泌系では、組み換えタンパク質は、培養培地から回収することができる。第一段階として、培養液又はライセートを遠心分離してすべての粒子状細胞片を取り除く。次いで、膜及び可溶性タンパク質分画を分離する。通常は、インターフェロンは、可溶性タンパク質分画から精製する。IFN が膜結合種として発現したならば、その膜結合ペプチドは、界面活性剤による可溶化によって膜分画から回収することができる。その後、粗ペプチド抽出物は、免疫アフィニティーやイオン交換カラムでの分画化; エタノール沈降; 逆相HPLC; シリカ又はDEAE等のカチオン交換樹脂でのクロマトグラフィー; クロマトフォーカシング; SDS-PAGE; 硫酸アンモニウム塩析; 例えばセファデックスG-75を用いたゲル濾過; 疎水性アフィニティー樹脂及び基質へ固定化したインターフェロンレセプターを用いたリガンドアフィニティー等の適切な手法によってさらに精製することが可能である。

30

## 【0150】

ここで用いられるヒトIFN の多くは、例えば、シグマ(セントルイス, ミズーリ)、カルビオケム-ノバビオケム・コーポレーション(サンディエゴ, カリフォルニア)又はアクチュレイト・ケミカル&サイエンティフィック・コーポレーション(ウエストベリー, ニューヨーク)等の商業的ソースから得ることができる。

40

## 【0151】

Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, コールドスプリングハーバー研究所出版, コールドスプリングハーバー, ニューヨーク(1989)に記載されている標準的クローニング手法を用いて、大腸菌の細胞膜周辺腔への種々のhIFN の種のトランスロケーションを導くプラスミドを構築する。プライマーへ付加したNsiI及びStyI制限部位を用いて、Goeddelら, Nature 290: 20-26(1981)に開示されたhIFN の種々のサブタイプのcDNAクローンへPCR反応を施す。これらのPCR産物を、その後、Cunninghamら, Science 243: 1330-1336(1989)に記載されている発現ベクターpB0720の対応部位へサブクローニングした。Changら, Gene 55: 189-196(1987)に記載のように、この結果によって得られたプラスミドにより、hIFN サブタイプの産生は大腸菌phoAプロモーター及び熱安定性エンテ

50

ロトキシンIIシグナルペプチドのコントロール下に置かれる。各遺伝子の正確なDNA配列は、United States Biochemical Sequence Kit バージョン2.0を利用して確かめられる。各プラスミドを大腸菌株27C7(ATCC#55244)へ形質転換し、Carterら、Bio/Technology 10: 163-167(1992)に記載のように10リッター発酵槽で生育させる。アフィニティークロマトグラフィーによって、各IFN を含有する大腸菌ペーストからヒトhIFNを精製する。細菌細胞を溶解し、そのライセートを10,000×gで遠心分離して細片を取り除く。Staehelinら、Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 1848-1852(1981)に記載されているようにして得たマウス抗hIFN- B抗体(LI-1)を含有する免疫アフィニティーカラムへその上澄み液を注いだ。Royら、Journal of Chromatography, 303: 225-228(1984)の方法の改良によって、LI-1をコントロールされたポアガラスへ固定化した。結合したインターフェロンを、20% (w/v) グリセロールを含有する0.1M クエン酸、pH3.0によってカラムから溶出した。精製したIFNをSDS-PAGE及び免疫プロッティングによって解析し、ここに記載されているようにして、hIFN-誘導抗ウイルスアッセイによって生物活性についてアッセイした。

10

20

30

40

50

### 【0152】

Rehbergら、J. Biol. Chem., 257: 11497-11502(1992)又はHorisberger及びMarco、Pharmac. Ther., 66: 507-534(1995)に記載されているように、ヒトIFN 2/1ハイブリッド分子(IFN 2<sub>1-62</sub> / 6<sub>4-166</sub>)を得た。

### 【0153】

#### b. IFN の固定化

ファージディスプレイクローニングのアフィニティークロマトグラフィー分離での利用のために、例えば、アガロースビーズ、アクリルアミドビーズ、ガラスビーズ、セルロース、種々のアクリルコポリマー、ヒドロキシルメタクリルゲル、ポリアクリル及びポリメタクリルコポリマー、ナイロン、中性及びイオン性担体等の適切な基質へ精製したIFN を付着させることができ。基質へのIFN タンパク質の付着は、Methods in Enzymology, 44巻(1976)に記載されている方法によって完遂することができる。アガロース、デキストラン又はセルロース等の多糖類基質へタンパク質リガンドを付着させるために広く用いられている技術には、ハロゲン化シアンによる担体の活性化、それに続く、活性化基質へのペプチドリガンドの第1級脂肪族又は芳香族アミンのカップリングが含まれる。

### 【0154】

あるいは、IFN は、吸収プレートのウェルをコーティングすることに利用すること、吸収プレートへ付着させた宿主細胞上で発現させるか又はセルソーティングで利用すること、又はストレプトアビシンでコーティングしたビーズによる捕獲のためにビオチンとコンジュゲートすること、又はファージディスプレイライブラリをパニングするためのあらゆる他の当該分野の方法において利用することが可能である。

### 【0155】

#### c. パニング手法

吸着剤との少なくともファージ粒子の一部分の結合に適した条件下で、ファージディスプレイライブラリの試料を固定化IFN と接触させる。通常は、pH、イオン強度、温度等を含む条件を選択して、生理学的条件を模倣する。固相と結合したファージを洗浄し、その後、例えばBarbasら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982(1991)に記載されているように酸で、又は例えばMarksら、J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載されているようにアルカリで、又は例えばClacksonら、Nature, 352: 624-628(1991)の抗原競合法に類似の手法であるIFN 抗原によって溶出する。ファージは、1回目の選択で20-1,000倍に濃縮することが可能である。さらには、この濃縮したファージを細菌培養液で生育させ、さらなる回の選択に供することが可能である。

### 【0156】

好ましい実施態様では、大部分、好ましくはすべてのIFN サブタイプへの感知できる程の結合を示すファージクローニングを同定し、さらに特徴付けるために、ファージを種々の固定化したIFN サブタイプと連続してインキュベートする。この方法では、ファージを最

10 初に 1 つの特異的 IFN サブタイプとインキュベートする。このサブタイプと結合したファージを溶出して、他の IFN サブタイプによる選択に供する。このように、結合及び溶出の工程を、すべての IFN サブタイプについてくり返す。最後に、この手法によって、すべての IFN サブタイプに対して幅広い反応性を有する抗体を表示するファージの集団が産せられる。その後、これらのファージを、IFN の他の種との感知できる程の結合を示さないクローナーを選択するために、他の IFN 種、即ち IFN 以外に対して試験することが可能である。最後に、生物学的活性、例えば、種々の IFN サブタイプの抗ウイルス活性を中和する能力について試験することが可能であり、大部分、好ましくはすべての IFN サブタイプに対する幅広い中和活性を有する抗体を表示するクローナーが最終的に選択される。

#### 【 0 1 5 7 】

選択の効率は多くの要因に依存し、それには、洗浄の間の解離の動力学、そして単一のファージ上の複数の抗体断片が同時に抗原と関われるかどうかということが含まれる。一次解離定数（及び弱い結合親和性）を有する抗体は、短い洗浄、多価ファージディスプレイ及び固相の抗原の高いコーティング密度の利用によって保持することが可能である。高い密度は、多価相互作用を介してファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合に有利に作用する。遅い解離動力学（及び良好な結合親和性）による抗体の選択は、Bassら, *Proteins*, 8: 309-314(1990)及び国際公開第 92/09690 号に記載されているような長い洗浄と単価ファージディスプレイの利用、そして Marksら, *Biotechnol.*, 10: 779-783(1992)に記載されているような抗原の低度のコーティング密度によって促進することが可能である。

#### 【 0 1 5 8 】

親和性に僅かな違いがあったとしても、IFN に対する異なる親和性のファージ抗体の中で選択することは可能である。しかしながら、選択した抗体のランダム変異（例えば、上記の幾つかの親和性成熟の技術で行われているような）は、多くの変異を生じやすく、その殆どが抗原と結合し、僅かがより高い親和性である。IFN を限定すると、希な高い親和性のファージが競合して除かれることが可能である。すべてのより高い親和性の変異体を保持するために、ファージは、IFN の標的モル濃度親和定数よりも低いモル濃度のビオチン化 IFN とインキュベーションできるが、過度のビオチン化 IFN とインキュベートすることが可能である。次いで、高親和性結合ファージをストレプトアビシンでコーティングした常磁性体ビーズによって捕獲することが可能である。そのような「平衡捕獲」は、結合の親和性に従い、親和性の低い過度のファージから、僅かに 2 倍高い親和性の変異体クローナーの単離を可能にする感度で抗体を選択することを可能にする。固相と結合したファージを洗浄するのに用いる条件を操作して、解離定数を基礎として識別することも可能である。

#### 【 0 1 5 9 】

40 1 つの実施態様では、ファージを、上記のクロマトグラフィー・ポリマー基質ビーズのような固相に固定化した種々の IFN サブタイプと連続してインキュベートする。この方法では、このファージを、最初に 1 つの特異的 IFN サブタイプとインキュベートする。このサブタイプと結合したファージを、結合したファージを溶液へ遊離することが可能な任意の塩又は酸緩衝液等の適切な溶離液で固相から溶出させる。次に、この溶出したファージクローナーを、他の IFN サブタイプによる選択に供する。IFN との結合に関して可溶性 IFNAR2 と競合するクローナーの集団を濃縮するために、一連の IFN サブタイプクロマトグラフィー分離から回収したファージクローナーを、IFN へ前もって吸着させた固定化 IFNAR2 の複合体とインキュベートし、非吸着ファージクローナーをインキュベーション反応混合液から回収する。

#### 【 0 1 6 0 】

選択手法を設計して、任意の適切なバッチクロマトグラフィー技術を利用することが可能である。1 つの実施態様では、懸濁液の中の IFN 誘導体化ポリマー基質ビーズへファージクローナーを吸着させ、その吸着ビーズを遠心分離で回収し、溶液へ結合したファージを

遊離することが可能な任意の塩又は酸緩衝液などの適切な溶出緩衝液で、その回収したビーズを再懸濁してインキュベートし、その溶出混合液を遠心分離し、溶出ファージクローンを上澄み液から回収し、次いで、すべての付加的なIFN サブタイプについて、その吸着 / 溶出法をくり返す。IFN との結合について可溶性IFNAR2と競合するクローンの集団を濃縮するために、IFN サブタイプクロマトグラフィー分離から回収したファージクローンを、IFN へ前もって吸着させたIFNAR2誘導体化ポリマー基質ビーズの懸濁物とインキュベートし、そのインキュベーション混合物を遠心分離し、そして非吸着ファージクローンを上澄み液から回収する。

#### 【0161】

10 その他の実施態様では、各アフィニティークロマトグラフィー分離の間のIFNAR2へのIFN 結合を阻害する特性についてファージ集団を濃縮するように、選択法を設計する。この方法では、可溶性IFNAR2が、固定化IFN との結合についてIFNAR2と競合する任意のファージクローンに置き換わることが可能となる条件下で、ファージを固体支持体に固定化した各特異的IFN サブタイプと連続してインキュベートし、次いで、IFNAR2 ECD-IgG Fc等の過度の可溶性IFNAR2を含む溶離液で固相から溶出させる。このように、結合及び溶出の工程を、各特異的IFN サブタイプについてくり返す。

#### 【0162】

20 その他の実施態様では、ファージを懸濁液中のIFN 誘導体化ポリマー基質ビーズへ吸着させ、その吸着ビーズを遠心分離で回収し、その回収したビーズを、可溶性IFNAR2が固定化したIFN への結合についてIFNAR2と競合する任意のファージクローンに置き換わり、溶液へ結合したファージを遊離することが可能である条件下で、過度の可溶性IFNAR2 ( IFNAR2 ECD-IgG Fc等 ) を含む適切な溶出緩衝液に再懸濁してインキュベートし、その溶出混合液を遠心分離し、その溶出したファージクローンを上澄み液から回収し、次いで、すべての付加的なIFN サブタイプについて、その吸着 / 溶出法をくり返す。

#### 【0163】

30 最後に、この方法によって、幅広い範囲のIFN サブタイプに対するIFNAR2結合阻害活性を有する抗体を表示するファージの集団を産する。その後、感知できる程のIFNの他の種との結合を示さないクローンを選択するために、これらのファージをIFN-ヨ等の他のIFN種 ( IFN 種以外 ) に対して試験することができる。最後に、選択したファージクローンを、種々のIFN サブタイプの生物学的活性、例えば抗ウイルス活性を中和する能力について試験することが可能であり、そして、多数の、好ましくはすべてのIFN サブタイプに対する幅広い中和化活性を有する抗体を表示するクローンが最終的に選択される。

#### 【0164】

##### 抗IFN クローンの活性選択

1つの実施態様では、本発明は、他のどんなインターフェロン種の活性と顕著に結合又は中和しないが、多数、好ましくは多くのIFN サブタイプの活性を中和し、且つそれと結合する抗IFN 抗体を提供する。例えば、種々のIFN サブタイプの抗ウイルス活性を中和する種々のファージクローンの能力は、基本的には抗体について先述したのと同じ方法で試験することが可能である。

#### 【0165】

##### 4. 可溶性IFNAR2-IgGの調製

40 hIFNAR2 ( pRK5 hIFNAR2-IgGクローン ) の細胞外ドメイン ( ECD ) に基づくヒト免疫グロブリン融合タンパク質 ( イムノアドヘシン ) をコードするcDNAは、マウスIFN-レセプターイムノアドヘシンの構築に関するHaak-Freendschoら., *Immunology* 79: 594-599(1993)によって記載されているのと同じ方法を利用して作製することが可能である。要約すると、プラスミドpRKCD4<sub>2</sub>Fc<sub>1</sub> は、国際公開第89/02922号 ( 1989年4月6日に公開のPCT/U88/03414 ) の実施例4に記載されているようにして構築する。成熟hIFNAR2 ECDの最初の216残基の配列をコードするcDNAは、公開された配列から得られる ( Novickら., *Cell*, 77: 391-400 [ 1994 ] )。pRKCD4<sub>2</sub>Fc<sub>1</sub> のCD4コード化配列は、pRK5hIFNAR5-IgGクローンを形成するhIFNAR2 ECDコード化 cDNAによって置き換える。リン酸カルシウム沈殿法を用いる一過性トラン

10

20

30

40

50

ンスフェクションによって、hIFNAR5-IgGをヒト胚腎臓293細胞で発現させる。Haak-Frend schoら(1993)、上掲に記載のように、プロテインA-セファロースカラムでのアフィニティークロマトグラフィーによる一段階で、無血清細胞培養上澄み液からイムノアドヘシンを精製する。20%(w/v)グリセロールを含有する0.1Mクエン酸緩衝液、pH3.0、によって、結合したhIFNAR5-IgGを溶出する。精製したhIFNAR5-IgGは、SDS-PAGEによる判定では95%を越える純度である。

## 【0166】

## 5. 抗IFN 抗体の診断的用途

本発明の抗IFN 抗体は、IFN 発現に関する診断的アッセイにおける独特な研究用試薬である。先述したように、IFN 発現は、IDDM、SLE、及び自己免疫甲状腺炎等のある自己免疫疾患で増加する。そのような疾患での種々のIFN サブタイプの発現の増大は、多くのIFN サブタイプに対する幅広い反応性に関して本発明の抗IFN 抗体を利用して検出して定量化することが可能である。抗IFN 抗体は、また、組み換え細胞又は天然源からの種々のIFN サブタイプのアフィニティー精製にとって有用である。

## 【0167】

抗IFN 抗体は、多くの良く知られた診断的アッセイ法の任意の1つにおいて、IFN の検出に利用することができる。例えば、所望する起源から試料を得て、抗体が混合物に存在する任意のIFN サブタイプと抗体/IFN 複合体を形成するように試料と抗IFN 抗体を混合させ、混合物に存在する任意の抗体/IFN 複合体を検出することによって、IFN に関する生物学的試料をアッセイすることができる。特定の試料に適した当該分野で知られた方法によって、アッセイのために生物学的試料を調製することができる。用いられるアッセイの型によって、抗体と試料を混合させる方法、及び抗体/IFN 複合体を検出する方法を選択する。そのようなアッセイには、競合及びサンドイッチャッセイ、及び立体阻害アッセイが含まれる。立体阻害アッセイが単一反応混合液で行われるのに対して、競合アッセイ及びサンドイッチャ法は不可欠な部分として相分離ステップを利用する。

## 【0168】

IFN についての分析法では、すべて、1つ又はそれより多い次の試薬を用いる：標識IFN アナログ、標識抗IFN 抗体、固定化抗IFN 抗体及び立体コンジュゲート。標識試薬は、「トレーサー」としても知られている。

## 【0169】

利用される標識は、IFN とIFN 抗体の結合を妨害しない任意の検出可能な機能性である。免疫アッセイでは、多くの標識が知られており、その例には、直接に検出することができる分子、例えば蛍光色素、化学発光剤、及び分子だけでなく、酵素等の検出されるように反応又は誘導体化されるべき放射性標識が含まれる。そのような標識の例には、ラジオアイソトープ<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、及び<sup>131</sup>I、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシェフェラーゼ、例えばホタルルシェフェラーゼ及び細菌ルシェフェラーゼ(米国特許第4,737,456号)、ルシェフェリン、2,3-ジヒドロタルジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフオスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼであり、色素前駆体、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定な遊離ラジカルを酸化する過酸化水素を利用する酵素とカップリングさせたものを含む。

## 【0170】

これら標識を共有的にタンパク質又はポリペプチドと結合させるために、常套的方法が利用可能である。例えば、カップリング剤、例えばジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス-イミデート、ビス-ジアゾ化ベンジジン等が、上記の蛍光剤、化学発光剤、酵素標識で抗体をタグするのに利用することが可能である。例えば、米国特許第3,940,475

10

20

30

40

50

5号(フルオロメトリー)及び3,645,090号(酵素); Hunterら, *Nature*, 144: 945(1962); Davidら, *Biochemistry*, 13: 1014-1021(1974); Painら, *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230(1981); 及びNygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412(1982)を参照せよ。ここで的好ましい標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリリフォスファターゼ等の酵素である。

## 【0171】

抗体への酵素を含むそのような標識のコンジュゲーションは、免疫アッセイ技術における通常の技術の1つにとって標準的な操作法である。例えば、O'Sullivanら, "Methods for Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, 編 J. J. Langone & H. Van Yunakis, 73巻(Academic Press, ニューヨーク, ニューヨーク, 1981), 147-166頁を参照せよ。

## 【0172】

あるアッセイ法では、試薬の固定化を必要とする。固定化は、溶液で遊離に存在するあらゆるIFNから抗IFN抗体を分離することを伴う。水不溶性基質又は表面への吸着による(Bennichら, 米国特許第3,720,760号)、共有結合による(例えば、グルタルアルデヒド架橋を利用して)、又は例えば免疫沈降による、後に抗IFN抗体又はIFNアナログを不溶化することによるよう、アッセイ法の前に抗IFN抗体又はIFNアナログの何れかを不溶化することによって、これは常套的に完遂される。

## 【0173】

競合又はサンドイッチャッセイとして知られる他のアッセイ法は、良く確立されており、商業的な診断業界では広く利用されている。

競合アッセイは、限られた数の抗IFN抗体抗原結合部位に関して試験試料IFNと競合する微量のIFNアナログの能力に依存する。抗IFN抗体を、一般的に、競合の前後で不溶化し、次いで、抗IFN抗体と結合したトレーサー及びIFNを、未結合のトレーサー及びIFNから分離する。この分離は、デカントすること(結合相手は、前もって不溶化された)又は遠心分離(結合相手は、競合反応の後で沈殿された)によって完遂される。試験試料IFNの量は、マーカー物質の量で測定されるように、結合したトレーサーの量に反比例する。IFNの既知量による用量反応曲線を調整して試験結果と比較し、試験試料に存在するIFNの量を定量的に決定した。

## 【0174】

「同種」アッセイと呼ばれる他の種の競合アッセイは、相分離を必要としない。ここで、抗IFN抗体がIFNと結合する時に、抗IFN抗体の存在が酵素活性を修正するように、IFNとの酵素のコンジュゲートを調製して利用する。この場合、IFN又はその免疫学的に活性な断片を、二価機能性有機架橋によって、ペルオキシダーゼのような酵素へコンジュゲートさせる。抗IFN抗体の結合が標識の酵素活性を阻害するか又は増強するよう、抗IFN抗体との利用に関してコンジュゲートを選択する。この方法それ自体は、EMITという名前の下に広く実施されている。

## 【0175】

同種アッセイに関する立体障害法において、立体コンジュゲートを用いる。ハプテンに対する抗体が抗IFN抗体と同時にコンジュゲートと実質的に結合できないように、小IFN断片へ低分子量ハプテンを共有結合させることで、これらのコンジュゲートを合成する。このアッセイ法の下では、試験試料に存在するIFNは抗IFN抗体と結合し、それによって、抗ハプテンがコンジュゲートと結合することが可能となり、例えば、ハプテンがフルオロフォアの場合の蛍光発光の変化のように、コンジュゲートハプテンの性質に変化を引き起こす結果となる。

## 【0176】

サンドイッチャッセイは、特に、IFN又は抗IFN抗体の測定にとって有用である。連続サンドイッチャッセイでは、試験試料IFNを吸着するのに固定化抗IFN抗体を用い、その試験試料を洗浄によって除き、第二番目の標識抗IFN抗体を吸着するのにその結合IFNを用い、その後、結合物質を残存トレーサーから分離する。結合しているトレーサーの

10

20

30

40

50

量は、試験試料IFN と正比例している。「同時」サンドイッチアッセイでは、標識した抗IFN を添加する前には、試験試料を分離しない。抗IFN モノクローナル抗体を1つの抗体として、ポリクローナル抗IFN 抗体を他方の抗体として用いる連続サンドイッチアッセイは、IFN に関する試料を試験するのに有用である。

## 【0177】

前述は、IFN に関する単に例示的な診断的アッセイである。上記のバイオアッセイを含み、IFN の測定に関して抗IFN 抗体を利用する現在又はその後で開発された他の方法は、その範囲内に含まれる。

## 【0178】

## 6. 抗IFN 抗体の治療的組成物及び投与

10

本発明の抗-IFN 抗体の治療的組成物は、凍結乾燥された製剤又は水性溶液の形態で、所望される程度の純度を持つ抗体を任意の生理学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製されて保管される (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19版, Mack Publishing Co., (イーストン, ペンシルバニア: 1995))。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール、又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；及び/又はトウイーン、ブルロニクス、又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

20

## 【0179】

インビオ投与に用いる製剤は無菌であるべきである。これは、凍結乾燥及び再構成の前又はその後で滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。抗IFN は、通常、凍結乾燥された形態又は溶液で保存される。

治療的抗IFN 抗体組成物は、一般的に無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針で貫通可能なストッパーを備えたバッグ又はバイアルに入れられる。

30

抗IFN 抗体投与の経路は周知の方法、例えば、静脈内、腹膜内、脳内、皮下、筋肉内、眼内、動脈内、脳内脊髄、又は病巣内経路での注射又は注入、又は以下に記載の徐放系による。好ましくは、この抗体は全身に与えられる。

## 【0180】

徐放性製剤の適例としては、例えばフィルム状又はマイクロカプセルの形付けられた半透性マトリックスがある。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ハイドロゲル、ポリ乳酸(米国特許第3,773,919号、欧州特許第58,481号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸の共重合体(Sidmanほか, Biopolymers, 22:547-556 (1983))、ポリ(2-ヒドロキシエチル メタクリレート)(Langerら, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981)及びLanger, Chem. Tech., 12:98-105 (1982))、エチレン 酢酸ビニル(上記Langerら)又はポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸(欧州特許第133,988号)がある。徐放性抗IFNAR2抗体組成物には、リポソーム包括抗体も含まれる。抗体を含むリポソームは、それ自体知られた方法によって調製される: DE3,218,121; Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); 欧州特許第52,322号; 欧州特許第36,676号; 欧州特許第88,046号; 欧州特許第143,949号; 欧州特許第142,641号; 日本特許出願83-118008; 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号。通常、そのリポソームは、脂質含量が約30 mol.%コレステロールより高く、選定比が最適抗体療法に調節されている、小さな(約200-800オングストローム)単一層状型である。

40

## 【0181】

50

抗IFN 抗体は、吸入によって投与することも可能である。ジェット噴霧器及び超音波噴霧器を含む、商業的に入手が可能な液体製剤のための噴霧器は、投与にとって有用である。液体製剤は、直接に噴霧することができる、凍結乾燥粉末は、再構成の後で噴霧することができる。あるいは、フッ化炭素製剤及び定量吸入器を用いてエアロゾル化し、又は凍結乾燥及び精粉末として吸入することができる。

#### 【0182】

治療的に用いられる抗IFN 抗体の「有効量」は、例えば、治療目的、投与経路、用いる抗IFN 抗体の型、及び患者の状態に依存する。従って、治療者は、最大の治療効果を得ることが要求されるときに、用量を滴定し投与経路を修正する必要があるであろう。典型的には、臨床医は、上記の疾患の治療についての所望の効果が達成される用量に達するまで抗IFN 抗体を投与するであろう。この治療の経過は、従来のアッセイによって容易にモニターされる。

#### 【0183】

本発明の抗IFN 抗体で治療される患者には、病状発現前の患者、又は最近、免疫媒介疾患、特に自己免疫疾患の発症のある患者が含まれる。免疫媒介破壊から保護される健全な組織が存在しないまでは、この発明によると患者は治療の候補である。例えば、インシュリン依存性糖尿病 (IDDM) を患有患者は、その患者の膵臓島細胞がもはや生存可能ではない状態になるまでは、抗IFN 抗体による治療の恩恵を受ける。免疫媒介又は自己免疫疾患が発症すると、抗IFN 抗体をできるだけ早く投与し、患者の免疫系による破壊からの健全な組織の保護に必要な限り治療をできるだけ継続することが望ましい。例えば、インシュリンのモニタリングが十分な島応答を示して、島のネクローシスの他の徴候が無くなり（例えば、抗島抗体力価の減少）、その後は、再発に関してインシュリン応答と抗島抗体のレベルをモニターする試験期間のための抗IFN 抗体治療から患者を解放することができるまでIDDM患者を治療する。

#### 【0184】

抗IFN 抗体による免疫媒介又は自己免疫疾患の治療及び予防では、抗体組成物は、製剤化され、服用され、そして良好な医療行為と一致する様式で投与される。これに関して考慮する要因には、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、疾患の原因、抗体を送達する部位、特定の型の抗体、投与の方法、投与計画、そして医療従事者に知られている他の要因が含まれる。投与される抗体の「治療的有効量」は、そのような考慮によって左右され、疾患を予防し、改善し、又は治療するのに必要な最少量であり、そのことには、移植受容者における慢性的自己免疫症及び免疫抑制維持が含まれる。そのような量には、好ましくは、宿主にとって毒性があるか、又は宿主をより顕著に感染しやすくしてしまう量より少ない。

#### 【0185】

一般的な提案として、投与される抗体の治療上有効な量は、1回の投与であろうと複数回の投与であろうと、1日に患者の体重当り約0.1ないし約50mg/kgの範囲であり、使用される抗体の典型的な範囲は、例えば約0.3ないし約20mg/kg/日、より好ましくは約0.3ないし約15mg/kg/日で毎日投与される。所望される用量は、単一のボーラス投与によって、複数のボーラス投与によって、又は抗体の連続注入投与によって送達が可能であり、実施者が到達したい薬理学的減衰のパターンに依存する。

しかしながら、上記のように、これらの示唆された抗体の量は、多くの治療上の判断を必要とする。適した用量の選定と計画における鍵となる要因は、上で示したような得られた結果である。

#### 【0186】

必要ではないが、1つ又はそれより多い薬剤で随意的に製剤化されている抗体は、現在、問題とされている免疫媒介又は自己免疫疾患を予防するか治療するのに利用されている。例えば、リュウマチ様関節炎では、抗体は、グルココルチコステロイドとの組み合わせで与えることができる。そのような他の薬剤の有効量は、製剤に存在する抗IFN 抗体の量、疾患又は治療の種類、上で論じた他の要因に依存する。これらは、一般的に同じ用量及

10

20

30

40

50

びこれまでに用いたような投与経路によって、又は今までに用いた用量の約1～99%で利用される。

【0187】

本発明のさらなる詳細は、さらに本発明の範囲を定める、以下の実施例に見出すことができる。本明細書を通して引用されているすべての参考文献、それに引用されている参考文献は、それらすべての参考文献によって、ここで明白に取り入れられている。

(実施例)

【0188】

以下の実施例は例示として提供され、限定するものではない。この実施例は、本発明の化合物、組成物、及び方法をどのように作製して使用するのかに関する完全な開示及び記載を当業者へ提供し、発明に関して発明者が考慮している範囲を限定することを意図しているものではない。使用する数字（例えば、量、温度等）に関する正確さを保証する努力がなされてきたが、幾つかの実験的誤り及び逸脱については説明されるべきである。特に示さない限り、部分は重量で、温度は摂氏度、そして圧力は大気圧又はその付近である。明細書のすべての引例の開示は、参考文献によって、ここに明白に取り入れられている。

10

【実施例1】

【0189】

幅広い反応性のマウス抗IFN モノクローナル抗体の作製及びキャラクタリゼーション

材料及び方法

IFN サブタイプに対して幅広い反応性を有するマウスモノクローナル抗体

20

ヒトIFN サブタイプの混合物によってマウスを連続して免疫化し、大量の候補mAbsを作製し、次いで結合及び活性に関してスクリーニングすることによって、パンIFN 中和化抗体を開発した。特に、Balb/cマウスを、MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, ハミルトン、モンタナ) に懸濁した2.5 g のリンパ芽球腫hIFN-<sub>1</sub>（シグマの製品番号I-9887, セントルイス、ミズーリ州）で各後足蹠に9回（2週間インターバルで）免疫化した。最後の追加免疫の3日後、35%ポリエチレンギリコールを用いて、膝窩のリンパ節細胞をマウスメラノーマ細胞 P3X63Ag8.U.1 (ATCC CRL1597) と融合させた。ハイブリドーマは、HAT培地で選択した。融合の10日後、ELISAで、種々のhIFN と結合しているmAbsについて、ハイブリドーマ培養上澄み液を最初にスクリーニングした。選定したハイブリドーマ培養液上澄み液を、その後、上記のように、ヒト肺癌腫細胞株A549細胞でIFNの抗ウイルス細胞変性効果を阻害する効力に関して試験した。図1に示したように、1794融合ウェルから得られた3つのmAbsは、多様な設定のIFN サブタイプを中和することができた。これら3つのmAbsをサブクローンして再解析した。

30

【0190】

IFN の抗ウイルス活性の中和化

IFN の抗ウイルス活性を中和する候補抗体の能力を、Yousei, S., ら, Am. J. Clin. Pathol., 83: 735-740(1985)に記載のようにしてアッセイした。要約すると、このアッセイは、脳心筋炎 (EMC) ウィルスで刺激したヒト肺癌腫A549細胞を用いておこなった。mAbsの連続希釈液を、100:1の全容量、37ECで1時間、種々の単位のI型インターフェロンでインキュベートした。これらの混合物を、次いで、24時間、100:1の細胞培養培地の中で $5 \times 10^5$  A549細胞とインキュベートした。その後、さらなる24時間、細胞を $2 \times 10^5$  pfuのEMCウイルスで刺激した。インキュベーションの最後には、視覚顯微鏡的検査又はクリスタル・バイオレット染色によって細胞生存率を確かめた。中和化抗体力価 (EC50) を、100ユニット/mlのI型IFNによって抗ウイルス細胞変性効果の50%を中和する抗体の濃度として定義した。この研究で用いたI型IFNの単位は、NIH基準組み換え体ヒトIFN-2を標準として用いて測定した。試験した種々のI型IFNの比活性は次の通りである：IFN-2/1 (IFN-2残基1-62/-1残基64-166) ( $2 \times 10^7$  IU/mg)、IFN-1 ( $3 \times 10^7$  IU/mg)、IFN-2 ( $2 \times 10^7$  IU/mg)、IFN-5 ( $8 \times 10^7$  IU/mg)、IFN-8 ( $19 \times 10^7$  IU/mg)、及びIFN-10 ( $1.5 \times 10^5$  IU/mg)。試験した白血球IFNは、シグマ製品番号I-2396であった。試験したリンパ芽球腫IFNは、NIH基準Ga23-901-532であった。図3Bに示したデータは、出願人

40

50

の依頼により、Access Biomedical(サンディエゴ、カリフォルニア州)によっておこなわれた実験で上記のアッセイフォーマットを利用して得られた。

【0191】

電気泳動移動度シフトアッセイ

IFNの殆どの即時の作用は、マルチタンパク質複合体を産する潜在的な細胞質シグナルトランスデューサ及び転写タンパク質のアクチベーター(STAT)の活性化、標的プロモーターインターフェロン刺激応答エレメント(ISRE)からの転写を誘導するインターフェロン刺激遺伝子因子-3(ISGF3)と連結している。ISGF3は、3つのタンパク質サブユニットで構成されている:STAT1、STAT2及びp48/ISGF3。p48タンパク質は、インターフェロン制御因子(IRF)ファミリーに属し、ISREと直接に相互作用するDNA結合タンパク質である。従って、IFN処理に応答するISRE特異的細胞性DNA結合複合体をモニターリングすることは、標的細胞上のIFNの効果を評価する単純、迅速そして簡便な方法である。そのような解析を実行する簡便なフォーマットの1つは、電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)であり、IFN処理によるISRE結合活性の誘導は、ISREのコンセンサス配列と一致する放射能標識二重鎖オリゴヌクレオチドプローブの電気泳動移動度においてシフトを引き起す。

【0192】

このアッセイは、基本的に、Kurabayashiら., Mol. Cell Biol., 15: 6386 (1995)による記載のように実行される。要約すると、5 ngの特異的IFNサブタイプに種々の濃度(5-100 μg/ml)の抗IFN mAbsを加えたものを、37℃で30分間、200 μlのDMEMの中で5x10<sup>5</sup> HeLa細胞とインキュベートした。hIFN-αの添加の前に、4℃で15分間、細胞を抗体とインキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、125 μlの緩衝液A(10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM フェニルメチルスルホニルフッ化物, 10 μg/ml ロイペプチド、10 μg/ml アプロチニン)に再懸濁した。氷上で15分のインキュベーションの後、0.025% NP40の添加によって細胞を溶解した。その核ペレットを遠心分離で得て、50 μlの緩衝液B(20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM フェニルメチルスルホニルフッ化物, 10 μg/ml ロイペプチド, 10 μg/ml アプロチニン)に再懸濁し、氷上で30分間、保持した。核分画を遠心分離で透明にし、使用するまでその上澄み液を-70℃で保存した。<sup>32</sup>P-dATP(3,000 Ci/mM, アムシャム)によるDNAポリメラーゼIクレノウ充填反応を利用して、一本鎖オリゴヌクレオチド(ISG15上:5'-GATCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCC-3' [配列番号: 13]、ISG15下:5'-GATCGGCTTCAGTTCCGGTTCCCTTCCC-3' [配列番号: 14])から二重鎖プローブを調製した。Bio-Spin 3カラム(Bio-Rad)を用いて、取り込まれていない放射性ヌクレオチドから標識オリゴヌクレオチドを精製した。5 μl核抽出物、15 μl結合緩衝液(10 mM トリス-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM フェニルメチルスルホニルフッ化物及び15%グリセロール)中の25,000 cpmの標識プローブ及び2 μgの非特異的コンペティターポリ(dI-dC)-ポリ(dI-dC)を含む結合反応を、30分間、室温でインキュベートした。DNA-タンパク質複合体を6%未変性ポリアクリルアミドゲルに溶解させ、オートラジオグラフによって解析した。このアッセイの特異性は、別の反応混合液中への350 ngの非標識ISG15プローブの添加によって測定した。ISGF3特異的複合体の形成は、抗STAT1抗体によるスーパーシフトアッセイによって確かめた。

【0193】

9F3抗IFNモノクローナル抗体

マウス抗ヒトIFN mAb9F3を作製し、クローニングしてシーケンシングした。大腸菌においてF(ab)sの発現及び突然変異誘発に用いたプラスミドpEMX1については、以前に記載した(Wertherら., J. Immunol. 157: 4986-4995 [1996])。要約すると、このプラスミドは、コンセンサスヒトサブグループ1軽鎖(VL-CL)及びコンセンサスヒトサブグループIII重鎖(VHIII-CH1)及びアルカリフォスファターゼをコードするDNA断片を含む。VL及びVHに関するコンセンサス配列については、以前に記載した(Carterら., Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289 [1992])。

【0194】

10

20

30

40

50

## 結果

我々は、IDDMの患者の島で発現している幅広いIFN サブタイプがあることを以前に示した (Huangら., Diabetes 44:658-664 [1995])。我々は、IDDMとIFN 又はIFN のいずれかの発現の間に何ら明らかな関連性がないことも示した (Huangら., [1995]上掲)。SLE 病状の一部分として発現した特定のIFN サブタイプが定義されなかったが、IDDMのように、関連性はIFN とであって、IFN 又はIFN のいずれかとではない (Hooks, ら., Arthritis & Rheumatism 25: 396-400 [1982] ; Kim, ら., Clin. Exp. Immunol. 70: 562-569 [1987] ; Lacki, ら., J. Med. 28: 99-107 [1997] ; Robak, ら., Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 46: 375-380 [1998] ; Shiozawa, ら., Arthritis & Rheumatism 35: 417-422 [1992] ; von Wussow, ら., Rheumatology International 8: 22 10 5-230 [1998] )。これらの観察は、IDDM又はSLEにおける治療行為のための候補抗体は、宿主防御に必要であろう他のインターフェロン ( 、 及び ) 及びインターロイキンの活性を無傷のままにする一方で、大部分のIFN サブタイプを中和するのに必要であろうことを提案することにつながった。

### 【0195】

それらの1つ (9F3) は、幅広い組み換えインターフェロン サブタイプを中和することが可能であり、さらにキャラクタライズされた。図2Aに示されているように、9F3は、7つの組み換え体インターフェロン、IFN -2, 4, 5, 8及び10 (図2) 及びIFN 1及び21 (表2及び図6) の抗ウイルス活性を中和することができた。これらIFN サブタイプは、I型インターフェロン配列樹状図に見積もられた配列の全範囲を含む。さらに重要なのは、IFN サブタイプを中和する9F3 mAbは、IFN (図2、表2) 又はIFNを中和することはできなかった。IFN に関する図2に示す活性の小さな増加は他のアッセイでは再現可能ではなく、アッセイ変動の結果と思われた。

### 【0196】

IFN に対して中和化する他のmAbsが開発されてきた (Tsukui等, Microbiol. Immunol. 30, 1129-1139 (1986); Berg, J. Interferon Res. 4: 481-491 [1984] ; Meager及びBerg, J. Interferon Res. 6: 729-736 [1986] ; 米国特許第4,902,618号；及び欧州特許公開第0,139,676B1号)。しかしながら、これら抗体は、限られた数の組み換え体IFN サブタイプのみを中和し、活性化された白血球によって産せられたような幅広いIFN サブタイプを中和することができなかった。対照的に、9F3 Mabは、活性化された白血球に産せられたIFN サブタイプの不均一な集団における少なくとも95%の抗ウイルス活性を中和することが可能であった (図3A)。同様に、9F3 mAbは、単独の実験で確かめたように、リンパ芽球腫IFN (NIH基準) の単独製剤の抗ウイルス活性をブロックすることも可能であった (図3B)。

### 【0197】

代替バイオアッセイを用いて、IFN を中和する9F3 mAbの能力も試験した。このアッセイは、電気泳動移動度シフトアッセイとして知られているDNA結合アッセイにおける、インターフェロン刺激エレメント (ISRE) に由来するオリゴヌクレオチドへのシグナル分子であるインターフェロン刺激遺伝子因子3 (ISGF3) の結合を活性化するIFN の能力に基づいている (Horvathら., Genes Dev. 9: 984-994 [1995] )。核へのI型インターフェロンシグナルのトランスタクションは、タンパク質複合体、ISGF3の活性化に依存し、それに2つのシグナルトランスデューサ及び転写タンパク質のアクチベーター (STAT) STAT1及びSTAT2、及びインターフェロン制御因子 (IRF) タンパク質であるp48/ISGF3 に関する (Watheletら., Mol. Cell. 1: 507-518 [1998] )。後者はISGF3のDNA配列認識サブユニットであり、直接にISREと相互作用する (McKendryら., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 11455-11459 [1991] ; Johnら., Mol. Cell. Biol. 11: 4189-4195 [1991] )。IFN 又はIFN のいずれかによるCOS細胞の処理は、ISRE由来プローブへのISGF3の結合と一致する複合体の出現につながる。IFN 誘導ではなく、IFN 誘導複合体の出現は、9F3 mAbによってブロックされた (図4)。さらには、9F3 mAbは、このアッセイで試験された6つの組み換え体IFN サブタイプの活性を中和することができた (表2)。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 8 】

表2

mAb 9F3 によって I 型 IFN が誘導した ISGF3 形成の阻害

mAb	IFN- $\alpha$ 2/1	IFN- $\alpha$ 1	IFN- $\alpha$ 2	IFN- $\alpha$ 5	IFN- $\alpha$ 8	IFN- $\alpha$ 21	IFN- $\beta$
9F3.18.5	+++	+++	+++	+	+++	+++	-
IgG1	-	-	-	-	-	-	-

9F3 による IFN 誘導複合体の阻害の程度を示しており、- は誘導バンドが変わらなかったこと；+ は 10  
バンドが部分的に失われたこと、そして+++は誘導バンドが殆ど消えたことを示す。mAb を  $10 \mu\text{g/ml}$   
で使用し；IFN- $\alpha$  を  $25\text{ng/ml}$  で使用した。

【 0 1 9 9 】

9F3 が幅広い種々の組み換え体 IFN サブタイプと活性化された白血球によって産せられた IFN サブタイプの混合物の双方を中和することができたということを証明し、我々は、9F3 mAb の重鎖及び軽鎖の双方をコードする cDNA をクローニングしてシーケンシングした。この重鎖及び軽鎖を精製し、由来する N 末端アミノ酸配列を利用して N 末端に一致する縮重 5' プライマーを設計し、マウス 軽鎖及び IgG2 重鎖の定常ドメインに対応して 3' プライマーを設計した。常套的な PCR 法を利用して対応する cDNA をクローニングし、そのヌクレオチド配列の挿入部を決定した。図 5 は、マウス 9F3 モノクローナル抗体の VL (5A) 及び VH (5B) ドメインの配列アライメント、ヒト重鎖サブグループ III 及びヒト 軽鎖サブグループ III のヒト化バージョン (V13) 及びコンセンサス配列を示す。クローニングされた cDNA が、9F3 mAb の特異性及び特徴を反映する正確な Mab をコードする cDNA を確かめるために、図 5 に示したマウス cDNA 配列及びヒト CH1 ドメインを利用した組み換えキメラタンパク質を生成した。この結果生じたキメラ (CH8-2) は、種々の組み換え体 IFN サブタイプを完全に中和することができた (図 6)。重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、その後、ヒト化抗体の作製に使用した。

【 実施例 2 】

【 0 2 0 0 】

9F3 パン-IFN 中和化モノクローナル抗体のヒト化

材料及び方法

ヒト化 F(ab)s の構築

ヒト化 9F3 の最初の F(ab) 変異体を構築するために、pEMX1 のデオキシリジン含有テンプレートで部位特異的突然変異誘発 (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492 [1985]) をおこなった。6 つの CDR をマウス 9F3 配列へ変化させた (図 5)；各 CDR に含まれる残基は、配列に基づいた CDR の定義に由来する (Kabat ら., (1991) 上掲)。従って、F-1 は、6 つの完全なマウス CDR 配列を有する完全なヒトフレームワークで構成されていた (VL サブグループ 1 及び VH サブグループ III)。他のすべての F(ab) 変異体のプラスミドは、F-1 のプラスミドテンプレートから構築した。商業用キット (Qiagen, バレンシア, カリフォルニア) を利用する二重及び一本鎖 DNA の調製のために、プラスミドを大腸菌株 XL-1 ブルー (ストラタジーン, サンディエゴ, カリフォルニア) へ形質転換した。各変異体に関して、ジデオキシ法 (Sequenase, U.S. Biochemical Corp., クリーブランド, オハイオ) を使用して、軽及び重鎖をコードする DNA を完全にシーケンシングした。プラスミドを MM294 の誘導体である大腸菌株 16C9 へ形質転換し、 $50 \mu\text{g/ml}$  のカルベニシリンを含有するルリアブロスプレート上へプレートし、タンパク質発現に関する單一コロニーを選択した。この單一コロニーを、37 度で 5-8 時間、5 ml ルリア培養液 -  $100 \mu\text{g/ml}$  カルベニシリンで生育させた。この 5 ml の培養液を  $50 \mu\text{g/ml}$  カルベリシニンを含有する 50 ml AP5 培地へ添加し、20 時間、30 度で 4 L バッフル振盪フラスコで生育させた。AP5 培地は：1.5 g グルコース、11.0 g ヘイカーゼ SF (Hycase SF)、0.6 g 酵母抽出 40

10

20

30

40

50

物（保証された）、0.19 g MgSO<sub>4</sub>（無水）、1.07 g NH<sub>4</sub>Cl、3.73 g KCl、1.2 g NaCl、120 ml 1M トリエタノールアミン、pH 7.4、これへ 1 L の水で構成され、次いで、0.1 μm Sealkeen フィルターを通して無菌濾過した。細胞を 3000×g で 1 L 遠心分離ボトルで遠心分離によって収集し、その上澄み液を取り除いた。1 時間の凍結の後、ペレットを 25 ml 冷 10 mM トリス-1 mM EDTA-20% スーパーロース、pH 7.5 に再懸濁し、250 μl の 0.1 M ベンズアミジン（シグマ、セントルイス、ミズーリー州）を添加してタンパク質分解を阻害した。3 時間の氷上の穏やかな攪拌の後、この試料を 15 分間、40,000×g で遠心分離した。次いで、その上澄み液を、10 mM トリス-1 mM EDTA、pH 7.5 で平衡化したプロテイン G-セファロース CL-4B（ファルマシア、ウップラサ、スウェーデン）カラム（0.5 ml 総容量）へ適用した。このカラムを 10 ml の 10 mM トリス-1 mM EDTA、pH 7.5 で洗浄し、3 ml の 0.3 M グリシン、pH 3.0 で溶出し 1.25 ml 1 M トリス、pH 8.0 とした。次いで、F(ab)を、Centricon-30（Amicon、ベヴァリー、マサチューセッツ州）を用いて緩衝液を PBS へ交換し、0.5 ml の最終容量へ濃縮した。すべての F(ab)s の SDS-PAGE ゲルをおこなって純度を確かめ、各変異体の分子量をエレクトロスプレー質量分析計によって確かめた。定量的アミノ酸分析を利用して F(ab) 濃度を確かめた。  
10

### 【0201】

#### キメラ及びヒト化 IgG の構築

キメラ及びヒト化 9F3 のヒト IgG2 種の作製のために、適切なマウス又はヒト化 VL 及び VH（F-13、表 3）ドメインを、ヒト IgG2 CH1-Fc 又はヒト軽鎖 CL ドメインをコードする DNA を含有する、個々の前記の pRK ベクター（Eaton ら、Biochemistry 25: 8343-8347 [1986]）へサブクローニングした。各変異体の全軽及び全重鎖をコードする DNA を、ジデオキシヌクレオチドシーケンシングによって確かめた。このキメラ IgG は、アミノ酸 SerH113 でヒト CH1 ドメインと融合した全マウス 9F3 VH ドメイン、及びアミノ酸 LysL107 でヒト CL ドメインと融合した全マウス 9F3 VL ドメインで構成されている。  
20

### 【0202】

重及び軽鎖プラスミドを、高効率手法を用いて（Gorman ら、DNA Prot. Eng. Tech. 2: 3-10 [1990]）、アデノウイルス形質転換ヒト胚腎臓細胞株、293（Graham ら、J. Gen. Virol. 36: 59-74 [1977]）へ同時トランスフェクションした。培地は無血清へ変え、5 日目まで毎日、収集した。プロテイン A-セファロース CL-4B（ファルマシア）を利用して、抗体をプールした上澄み液から精製した。溶出した抗体は、Centrion-30（Amicon）を用いて緩衝液を PBS へ替え、0.5 ml へ濃縮し、Millex-GV（ミリポア、ベッドフォード、マサチューセッツ）を用いて無菌濾過し、4℃ で保存した。IgG2 の濃度は、定量的アミノ酸分析を利用して決定した。  
30

### 【0203】

#### IFN 結合アッセイ

ELISA では、各ウェルへ 50 μl の 0.1 μg/ml IFN を含む PBS を添加し、終夜、4℃ でインキュベートすることによって、96 ウェルマイクロタイタープレート（Nunc）をコーティングした。その後、このプレートを、洗浄緩衝液（0.05% トウイーン-20 を加えた PBS）で 3 回、洗浄した。次いで、マイクロタイタープレートのウェルを 200 μl の SuperBlock（Pierce）でブロックし、1 時間、室温でインキュベートした。このプレートを、その後、再び洗浄緩衝液で 3 回、洗浄した。洗浄段階の後、10 μg/ml で開始したヒト化 mAb の 100 μl の連続希釈液を指定されたウェルへ添加した。このプレートを、室温で 1 時間、シェーカー装置の上にて室温でインキュベートし、その後、洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。次に、アッセイ緩衝液（0.5% ウシ血清アルブミン、0.05% トウイーン-20 を含む PBS）で 1:1000 で希釈した 100 μl の西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）-コンジュゲートヤギ抗ヒト Fab 特異性（Cappel）を各ウェルへ添加した。このプレートをシェーカー装置の上でインキュベートし、その後、洗浄緩衝液で 3 回、洗浄し、これに続いて、100 μl の基質（TMB, 3,3',5,5'-テトラメチルベンジン；Kirkegaard & Perry）を各ウェルへ添加し、10 分間、室温でインキュベートした。この反応は  
40  
50

、各ウェルへ 100  $\mu$ l の停止溶液 (Kirkegaard & Perryから) を添加して止め、450 nmでの吸光度を自動マイクロプレートリーダーで読み取った。

#### 【0204】

BIAcore (商品名) バイオセンサー アッセイ

BIAcore (商品名) バイオセンサー (Karlssonら, Methods: A companion to Methods in Enzymology 6: 97-108 [1994]) を用いて、ヒト化F(ab)s、キメラ及びヒト化IgG2抗体のIFN 結合を測定した。IFN を、50 mM MES緩衝液、pH6.3にて 60  $\mu$ g/mlでセンサー チップ上に固定化した。抗体を、リン酸緩衝液化生理的食塩水 / 1% トウイーン-20にて 75  $\mu$ g/ml (500 nM) でチップへ曝露した。オン-レート ( $k_{on}$ ) の抗体を測定した。

#### 【0205】

マウス及びヒト化F(ab)sのコンピューターグラフィックモデル

VL及びVHドメイン (図5A及び5B) の配列を用いて、マウス9F3 VL-VHドメインのコンピューターグラフィックモデルを構築した (図7)。このモデルは、どのフレームワーク残基をヒト化抗体へ取り込むべきかを決定するために用いた。ヒト化F(ab)のモデルは、マウスフレームワーク残基の正確な選定を確かなものにするためにも構築した。モデルの構築は、前出に記載のようにしておこなった (Carterら, [1992] 上掲; Wertherら, [1996] 上掲)。

#### 【0206】

##### 結果

ヒト重鎖サブグループIII及び軽鎖サブグループIを、図5 (Kabatら, (1991)上掲) に示すようなヒト化のフレームワークとして用いた。このフレームワークは、他のマウス抗体のヒト化に成功裏に用いられた (Carterら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289 [1992]; Prestaら, J. Immunol. 151: 2623-2632 [1993]; Eigenbrotら, Proteins 18: 49-62 [1994]; Wertherら, J. Immunol. 157: 4986-4995 [1996])。すべてのヒト化変異体を最初に作製し、大腸菌で発現するF(ab)としての結合についてスクリーニングした。500 mlシェーカーフラスコからの典型的な産出量は 0.1-0.4 mg F(ab) であった。

#### 【0207】

相補性決定領域 (CDR) 残基を、配列高頻度可変性 (Kabatら, (1991)上掲) 又はF(ab)-抗原複合体の結晶構造 (Chothiaら, Nature 342: 877-883 [1989]) のいずれかにに基づいて定めた。配列に基づいたCDRは構造に基づいたCDRよりも大きいが、CDR-H1を除いて、2つの定義が一般的には一致する。配列に基づいた定義によると、構造に基づいた系は残基H26-H32をCDR-H1と定める一方で、CDR-H1は残基H31-H35を含む (軽鎖残基の番号は、Lを最初に付ける; 重鎖残基の番号は、Hを最初に付ける) 現在の研究のために、CDR-H1を2つの組み合わせ、すなわち、H26-H35残基を含めて定義した。他のCDRは、配列に基づいた定義を用いて定義した (Kabatら, (1991)上掲)。

#### 【0208】

最初の変異体であるF-1では、CDR残基をマウス抗体からヒトフレームワークへ移した。さらには、F-1軽鎖 (Ch-1) を有するキメラ重鎖、及びキメラ軽鎖 (Ch-2) を有するF-1重鎖で構成されるF(ab)を作製して結合について試験した。F-1は、IFN と弱く結合した (表3)。Ch-1及びCh-2 (表3) の結合親和性を比較は、結合を増すために、F-1 VHドメインのフレームワーク残基を改変する必要があることを示唆した。

#### 【0209】

10

20

30

40

表3

ヒト化抗IFN- $\alpha$ 型

型	テンプレート	変化 <sup>a</sup>	10 $\mu$ g/mlでのOD <sub>450nm</sub>		
			平均	SD	N
Ch-1	F-1 VL/ Murine VH		1.45	0.11	3
Ch-2	Murine VL/ F-2 VH		.024	0.04	3
F-1	Human FR/ CDR swap		0.06	0.00	3
F-2	F-1	ArgH71Leu; AsnH73Lys	0.08	0.01	3
F-3	F-2	PheH67A1a; IleH69Leu; LeuH78A1a	0.14	0.02	3
F-4	F-3	ArgH94Ser	0.495	0.02	3
F-5	F-4	AlaH24Thr	0.545	0.03	3
F-6	F-5	ValH48Ile; AlaH49Gly	0.527	0.02	2
F-7	F-5	AlaH78Leu	0.259	0.02	2
F-8	F-5	LeuH69Ile	0.523	0.05	3
F-9	F-5	AlaH67Phe	0.675	0.09	3
F-10	F-9	LeuH69Ile	0.690	0.03	3
F-11	F-10	LysH75Ser	0.642	0.06	3
F-12	F-10	AsnH76Arg	0.912	0.05	3
F-13	F-12	LeuL46Val TyrL49Ser	1.050	0.16	3
F-14	F-13	LeuH71Arg	0.472	0.06	3
F-15	F-13	LysH73Asn	0.868	0.32	3

<sup>a</sup> マウス残基は血液にある；残基の番号は Kabat ら(1991)による。標準文字は、ヒトフレームワーク残基からマウスへの変化を示す。イタリック文字は、マウスフレームワーク残基からヒトへの変化を示す。IFN- $\alpha$ への Fab の結合を ELISA によってアッセイし、結果を 10  $\mu$ g/ml での OD<sub>450nm</sub> によって提供している。SD、標準偏差；n、実験の繰り返し。

## 【 0 2 1 0 】

F(ab)-抗原結晶構造の研究 ( Chothiaら, [ 1989 ] 上掲 ; Tramontanoら, J. Mol. Biol. 2 15: 175-182[1990] ) と同様に先のヒト化 ( Xiangら, J. Mol. 253: 385-390[1995] ; Wert herら, [ 1996 ] 上掲 ) は、残基 H71 及び H73 は、おそらくは CDR-H1 及び CDR-H2 のコンフォメーションに影響を与えることによって、結合に対して深い影響を与えることが可能である。位置 H71 及び H73 のヒト残基をそれらのマウスの対応残基へ変えることは、僅に結合を向上させたのみであった ( F-2型、表 3 )。位置 H67、H69 及び H78 でのさらなる同時変化 ( F-3型 ) とその後の ArgH94Ser ( F-4型 ) 及び AlaH24Thr ( F-5型 ) の変化は、結合を顕著に向上させた ( 表 3 )。位置 H67、H69 及び H78 を同時に変化させたので、それぞれは、別々にヒトコンセンサスフレームワーク残基へ戻った ; F-7、F-8、F-9、及び F-10 は、ヒト残基が位置 H67 で好まれ、位置 H69 はヒト又はマウス残基になんら優先度を示さず、そしてマウス残基は位置 H78 で好まれる。

10

## 【 0 2 1 1 】

先のヒト化の間、我々は、CDR-H1 及び CDR-2 と近接するフレームワークループの残基、FR-3 ( Kabat ら, ( 1991 ) 上掲 ) が結合に影響を与える可能性があることを見出した ( Eigenbro t, ( 1994 ) 上掲 )。従って、このループの 2 つの残基を、それらのマウスの対応残基へ変えた : LysH75 をマウス Ser ( F-11型 ) 及び AsnH76 をマウス Arg ( F-12型 )。AsnH76Arg の変化のみが、結合における向上に影響した ( 表 3 )。

20

## 【 0 2 1 2 】

マウス及びヒト化 F(ab) のモデルの検討によって、VL-VH 境界面に埋まっている CDR-H3 と相互作用する残基 L46 が、CDR-H3 のコンフォメーションを決定すること及び / 又は VL と VH ドメインの間の相互作用へ作用することのいずれかの役割を果たし得ることを示唆された。同じように、CDR-L2 に近接する L49 位置は、ヒトコンセンサス ( Tyr ) と 9F3 ( Ser ) 配列の間で異なる。従って、LeuL46Val 及び TyrL49Ser 残基が同時に置換されて、それによって、変異体 ( F-13 ) の結合におけるさらなる向上が生じた ( 表 3 )。作製されたすべての変異体の中で最も良い結合に基づいて、F-13 が最終的なヒト化型として選定された。

20

## 【 0 2 1 3 】

ヒト化組み換え抗 IFN モノクローナル抗体 ( V13IgG2 ) は、F-13 由来の VH 及び VL をそれぞれヒト IgG2 CH1-Fc 及びヒト CL ドメインへ融合することによって作製した。次いで、V13Ig G2 の  $K_{DN}$  比及び  $K_D$  値を、キメラ IgG2 又はマウス 9F3 と比較した。固定化した IFN への V13Ig G2 及びキメラ IgG2 結合の BIACore ( 商品名 ) 測定は、それらの  $K_{DN}$  比が類似していることを示した ( 表 4 )。Kinexa ( 商品名 ) 技術を使った親和性測定は、IFN に対する V13IgG2 の親和性が、親マウス 9F3 抗体と比較して 2 倍低くなったことを示した ( 表 4 )。

30

## 【 0 2 1 4 】

表4

抗 IFN $\alpha$  抗体にための BIACore (商品名) 及び Kinexa (商品名) データ

抗体 <sup>a</sup>	$K_{on}(\mu M/秒)$	$Kd(nM)$ <sup>b</sup>	方法
ChIgG2	3.9	0.14	BIACore (商品名)
V13IgG2	3.3	4.1	BIACore (商品名)
抗体 <sup>a</sup>	$K_D(pM)$		
マウス 9F3	1.5		Kinexa (商品名)
V13Fab	3.4		Kinexa (商品名)

<sup>a</sup>V13IgG2 は、ヒト IgG2 CH1-Fc へ結合させた VH ドメイン及びヒト CL ドメインへ結合させた F-13 VL ドメインである；ChIgG2 は、ヒト IgG2 CH1-Fc へ結合させたマウス 9F3 VH ドメイン及びヒト CL ドメインへ結合させたマウス 9F3 VL ドメインである。<sup>b</sup> $K_{off}/K_{on}$ .

## 【0215】

20

## 材料の寄託

以下の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801 ユニバーシティ・ブルーバード, マナサス, バージニア, 20110-2209 アメリカ合衆国(ATCC)へ寄託した：

材料	ATCC番号	寄託日	
1. 9F3マウス抗IFN	PTA-2917	2001年1月18日	
モノクローナル抗体を 分泌するハイブリドーマ細胞株 (Id. 参照: 9F3.18.5)			
2. キメラCH8-2完全長IgG	PTA-2883	2001年1月9日	30
の重鎖の発現のためのpRK ベースベクター (Id. 参照: XAIFN-ChHpDR2)			
3. キメラCH8-2完全長IgG	PTA-2880	2001年1月9日	
の軽鎖の発現のためのpRK ベースベクター (Id. 参照: XAIFN-ChLpDR1)			
4. ヒト化V13完全長IgG <sub>2</sub>	PTA-2881	2001年1月9日	
の重鎖の発現のためのpRK ベースベクター (Id. 参照: VHV30-IgG2)			40
5. ヒト化V13完全長IgG <sub>2</sub>	PTA-2882	2001年1月9日	
の軽鎖の発現のためのpRK ベースベクター (Id. 参照: VLV30-IgG)			

## 【0216】

50

この寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手する

ことができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条35U.S.C.及びそれに従う特許庁長官規則(特に参考番号886OG 638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

【0217】

本出願の譲受人は、寄託した材料が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託材料の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

10

【0218】

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際に、ここに示し記載されたのに加えて本発明の種々の修正は、前記の記載から当該分野の熟練者にとって明かであり、添付した請求項の範囲内にある。

20

【図面の簡単な説明】

【0219】

【図1】抗ヒトIFN-モノクローナル抗体の開発に用いた方法の概略図を示す。

【図2】抗ヒトIFN- $mAb$ (9F3)が、組み換えIFN-ではなく、組み換えIFN-サブタイプのスペクトラムを中和することができるることを示す。 $mAb$  9F3の濃度の増大する下でのA549細胞における脳心筋炎(EMC)ウイルス成長の阻害に関して、表示のIFNをアッセイした。データは、 $mAb$  9F3の非存在下で、表示のIFNによって得られたウイルス生育阻害活性のパーセンテージを示している。

30

【図3】白血球インターフェロン(シグマ)(図3A)及びリンパ芽球腫インターフェロン(NIHレファレンス Ga23-901-532)(図3B)の中和を示す。図3Aでは、白血球インターフェロン(シグマ製No.1-2396)の20,000IU/ml(塗りつぶされた棒)又は5,000IU/ml(白棒)を、ブランクコントロール(緩衝液のみ)(「-」で表示)、10:g/mlコントロールマウスIgG(「mIgG」で表示)、又は10:g/ml  $mAb$  9F3(「9F3」で表示)とインキュベートした。希釈液をアッセイし、残存活性の量を示した。示した結果は、二重測定の手段を示す。図3Bでは、 $mAb$  9F3の示された濃度の存在又は非存在下で、リンパ芽球状インターフェロンを10(塗りつぶされたカラム)又は3(白カラム)IU/mlでアッセイした。高い細胞変性効果は、インターフェロン活性の減少を示す。示された結果は、二重測定の手段を示す。

30

【図4】IFN-によるISGF3/ISRE複合体の誘導、及び複合体の形成を防ぐ9F3  $mAb$ の能力を示す電気泳動度シフトアッセイ(EMSA)の結果を示す。EMSAは、10:g/mlの濃度の9F3  $mAb$ (「9F3」で表示)又はマウスIgGコントロール抗体(「IgG」で表示)で、25ng/mlの濃度のヒトIFN-2(「2」で表示)又はIFN- $\gamma$ (「 $\gamma$ 」で表示)のいずれかの存在又は非存在の下においておこなわれた。

40

【図5A】マウス9F3(マウス、配列番号:1)、ヒト化9F3 13型(V13、配列番号:3)、及びコンセンサスヒト可変ドメイン軽鎖サブグループI(hu I、配列番号:4)の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列のアラインメントを示す。CDR(L1、配列番号:7; L2、配列番号:8; 及びL3、配列番号:9)を下線によって強調した。残基の番号付けは、上掲のKabatら(1991)による。マウス9F3とV13配列の間の違い、及び9F3とhu I配列の違いは、星印で示されている。

【図5B】マウス9F3(マウス、配列番号:2)、ヒト化9F3 13型(V13、配列番号:5) 50

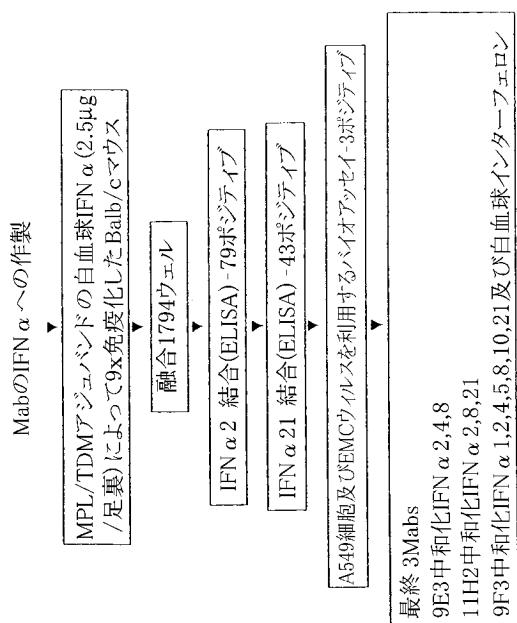
、及びコンセンサスヒト可変ドメイン重鎖サブグループIII(huIII、配列番号：6)の重鎖可変ドメインアミノ酸配列のアラインメントを示す。CDR(H1、配列番号：10；H2、配列番号：11；及びH3、配列番号：12)を下線によって強調した。残基の番号付けは、上掲のKabatら、(1991)による。マウス9F3とV13配列の間の違い、及び9F3とhuIII配列の違いは、星印で示されている。

【図6】脳心筋炎(EMC)ウイルスで刺激したA549細胞中の組み換えIFN- $\alpha$ サブタイプによって示されたウイルス生育阻害に対する、開始mAb 9F3(左パネル)及びキメラタンパク質CH8-2(右パネル)の中和活性を示す。

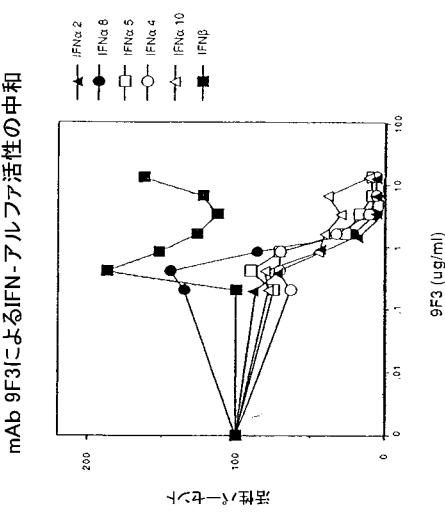
【図7】ヒト化9F3 13型のモデルを示す。VL及びVHドメインのバックボーンは、リボンで示されている。CDRは白色で示されて標識されている(L1、L2、L3、H1、H2、H3)。ヒトからマウスへ変えられたフレームワーク側鎖は白色で示され、残基番号で標識されている。

10

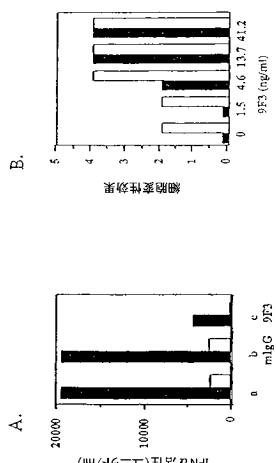
【図1】



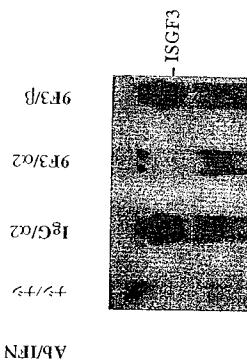
【図2】



【図3】



【図4】



【図5 B】

可変重鎖ドメイン

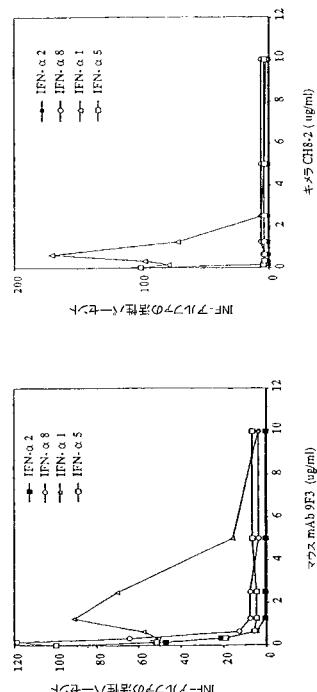
マウス	1	10	20	30	40		
	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTS	G	T	Y	Y		
	**	**	*	***	*		
V13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGY	T	F	E	Y		
	**	*	**	***	*		
huIII	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT	F	S	S	Y		
	---	---	---	---	---		
マウス	50	a	60	70	80	abc	90
	SINPDYDIT	N	Y	N	Q	R	F
	**	**	*	**	**	**	*
V13	SINPDYDIT	Y	N	Q	R	F	T
	**	**	*	**	**	*	*
huIII	VISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---
マウス	100						
	WISDFFDYWGQGTTLMSAAS						
	***	*					
V13	WISDFFDYWGQGTLTVSSAS						
	*****						
huIII	GRVGYYDYWGQGTLTVSSAS						
	---						

【図5 A】

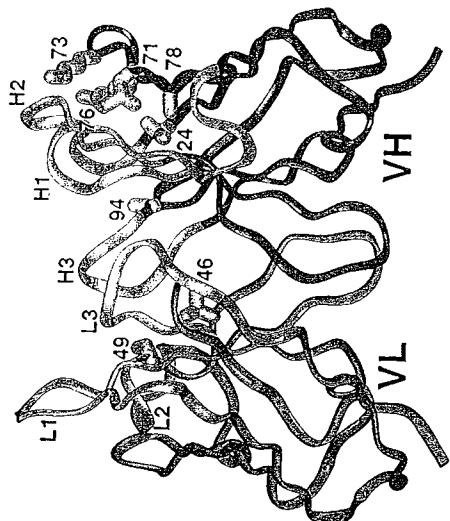
可変重鎖ドメイン

マウス	1	10	20	30	abcd	40
	DIVLTQSFASLAVSLGQRATISCRASQSV	S	T	SSY	SYMH	YQQKPGQPPKV
	**	*	**	*	*	*
V13	DIQMTQSPS	L	A	S	V	T
	SASVGDRVTITCRASQSV	T	S	Y	S	Y
	DIQMTQSPS	S	L	S	---	---
huIII	DIQMTQSPS	S	L	S	---	---
	SSASVGDRVTITCRASQSI	N	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---
マウス	50	60	70	80	90	
	YASNLESGVP	A	R	G	T	
	PARFSGSGSGT	*	*	*****	*	
V13	YASNLESGVP	S	R	G	T	
	SRFSGSGSGT	*	*	*****	*	
huIII	AASSLES	G	V	P	F	
	GVPSRFSGSGSGT	*	*	*****	*	
	DFTLTISSLQ	P	E	D	F	
	QEDFATYYCQH	*	*	*****	*	
	SWGIPRTF	*	*	*	*	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
マウス	100					
	GAGTKLELRRAV					
	*	*	***	*		
V13	GQGTKVEIKRTV					
huIII	GQGTKVEIKRTV					

【図6】



【図7】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau
  
(10) International Publication Number  
PCT WO 02/066649 A2
(51) International Patent Classification: C12N 15/13, (74) Agent: DELANEY, Karoline, A.; Knobbe, Martens, Olson & Bear, I.I.P. 620 Newport Center Drive, Sixteenth Floor, Newport Beach, CA 92660 (US)  
C07K 16/24, C12N 5/20, A61K 39/395, G01N 33/577, 33/68, A61P 37/06

(21) International Application Number: PCT/US02/02709

(22) International Filing Date: 29 January 2002 (29.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/270,775 22 February 2001 (22.02.2001) US  
Not furnished 9 January 2002 (09.01.2002) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

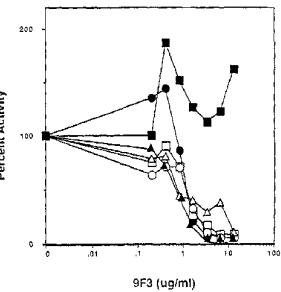
(72) Inventors: and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): CHUNTARAPAI, Anan [US/US]; 826 Ellis Drive, Colma, CA 94015 (US). KIM, Jin, K. [US/US]; 22830 San Juan Road, Cupertino, CA 95014 (US). PRESTA, Leonard, G. [US/US]; 1900 Gough Street #106, San Francisco, CA 94109 (US). STEWART, Timothy [US/US]; 465 Douglas Street, San Francisco, CA 94114 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AI, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CI, CZ (utility model), DE (utility model), DK (utility model), DM, DZ, EC, FR (utility model), ES, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:  
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTI-INTERFERON- $\alpha$  ANTIBODIESNeutralization of IFN- $\alpha$  activities by mAb 9F3(57) Abstract: The present invention relates generally to the generation and characterization of neutralizing anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibodies with broad reactivity against various IFN- $\alpha$  subtypes. The invention further relates to the use of such anti-IFN- $\alpha$  antibodies in the diagnosis and treatment of disorders associated with increased expression of IFN- $\alpha$ , in particular, autoimmune disorders such as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and systemic lupus erythematosus (SLE).

WO 02/066649 A2

ANTI-INTERFERON- $\alpha$  ANTIBODIESBackground of the Invention5 Field of the Invention

The present invention relates generally to the generation and characterization of neutralizing anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibodies with broad reactivity against various IFN- $\alpha$  subtypes. The invention further relates to the use of such anti-IFN- $\alpha$  antibodies in the diagnosis and treatment of disorders associated with increased expression of IFN- $\alpha$ , in 10 particular, autoimmune disorders such as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and systemic lupus erythematosus (SLE).

Description of the Related ArtInterferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )

15 Although interferons were initially discovered for their anti-viral activities, subsequent research has unraveled a plethora of regulatory activities associated with these powerful cytokines. Type I interferons form an ancient family of cytokines that includes IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\omega$  and IFN- $\tau$  (Roberts *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 805-816 [1998]). They are coded by intronless genes and are widely distributed amongst 20 vertebrates. Whereas IFN- $\beta$  is coded by a single gene in primates and rodents, more than 10 and 15 different subtypes of IFN- $\alpha$  have been found in mice and man respectively. Other interferons of type I are more restricted, e.g. IFN- $\delta$  in the pig, IFN- $\tau$  in cattle and sheep, and IFN- $\omega$  in cattle and humans. Thus, human type I interferons comprise multiple members of the IFN- $\alpha$  family, and single members of the IFN- $\beta$  and IFN- $\omega$  families. All type I IFNs 25 appear to bind to a single receptor that is comprised of at least two membrane spanning proteins. Type II interferons on the other hand are represented by a single member, IFN- $\gamma$ , and bind to a distinct receptor.

Although all type I IFNs, including IFN- $\alpha$ , exhibit anti-viral and anti-proliferative activities and thereby help to control viral infections and tumors (Lefevre *et al.*, *Biochimie* 30 80: 779-788 [1998]; Horton *et al.*, *Cancer Res.* 59: 4064-4068 [1999]; Alexenko *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 769-779 [1997]; Gresser, *J. Leukoc. Biol.* 61: 567-574 [1997]), there are also several autoimmune diseases that are associated with increased expression of

WO 02/066649

PCT/US02/02709

IFN $\alpha$ , most notably insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and systemic lupus erythematosus (SLE).

Type I diabetes, also known as autoimmune diabetes or insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), is an autoimmune disease characterized by the selective destruction of 5 pancreatic  $\beta$  cells by autoreactive T lymphocytes (Bach, *Endocr. Rev.* 15: 516-542 [1994]; Castano and Eisenbarth, *Annu. Rev. Immunol.* 8: 647-679 [1990]; Shehadeh and Lafferty, *Diabetes Rev.* 1: 141-151 [1993]). The pathology of IDDM is very complex involving an interaction between an epigenetic event (possibly a viral infection), the pancreatic  $\beta$  cells and the immune system in a genetically susceptible host. A number of cytokines, including 10 IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , have been implicated in the pathogenesis of IDDM in humans and in animal models of the disease (Campbell *et al.*, *J. Clin. Invest.* 87: 739-742 [1991]; Huang *et al.*, *Diabetes* 44: 658-664 [1995]; Rhodes and Taylor, *Diabetologia* 27: 601-603 [1984]). For example, pancreatic *Ifn- $\alpha$*  mRNA expression and the presence of immunoreactive IFN- $\alpha$  in  $\beta$  cells of patients with IDDM have been reported (Foulis *et al.*, *Lancet* 2: 1423-1427 15 [1987]; Huang *et al.*, [1995] *supra*; Somoza *et al.*, *J. Immunol.* 153: 1360-1377 [1994]). IFN- $\alpha$  expression has been associated with hyperexpression of major histocompatibility complex (MHC) class I $\alpha$  antigens in human islets (Foulis *et al.*, [1987] *supra*; Somoza *et al.*, [1994] *supra*). In two rodent models of autoimmune diabetes, the diabetes-prone DP-BB rat and streptozotocin-treated mice, *Ifn- $\alpha$*  mRNA expression in islets precedes insulitis 20 and diabetes (Huang *et al.*, *Immunity* 1: 469-478 [1994]). Furthermore, transgenic mice harboring a hybrid human insulin promoter-*Ifn- $\alpha$*  construct develop hypoinsulinemic diabetes accompanied by insulitis (Stewart *et al.*, *Science* 260: 1942-1946 [1993]).

It appears that local expression of IFN- $\alpha$  by pancreatic islet cells in response to 25 potential diabetogenic stimuli such as viruses may trigger the insulitic process. Consistent with its role as an initiating agent, IFN- $\alpha$  has been shown to induce intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and HLA class I $\alpha$  on endothelial cells from human islets, which may contribute to leukocyte infiltration during insulitis (Chakrabarti *et al.*, *J. Immunol.* 157: 522-528 [1996]). Furthermore, IFN- $\alpha$  facilitates T cell stimulation by the induction of the co-stimulatory molecules ICAM-1 and B7.2 on antigen-presenting cells in islets 30 (Chakrabarti *et al.*, *Diabetes* 45: 1336-1343 [1996]). These studies collectively indicate that early IFN- $\alpha$  expression by  $\beta$  cells may be a critical event in the initiation of autoimmune diabetes. Although there are a number of reports implicating IFN- $\gamma$  in the development of

WO 02/066649

PCT/US02/02709

IDDM in rodent models, there is a poor correlation between the expression of this cytokine and human IDDM. Thus, cells expressing IFN- $\gamma$  can be found in the islets of a subset of human patients selected for significant lymphocytic infiltration into the islets. In a group of patients that were not selected by this criterion there was no obvious association between

5 IFN- $\gamma$  expression and human IDDM.

Based on the increased level of IFN- $\alpha$  expression in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), IFN- $\alpha$  has also been implicated in the pathogenesis of SLE (Ytterberg and Schnitzer, *Arthritis Rheum.* 25: 401-406 [1982]; Shi *et al.*, *Br. J. Dermatol.* 117: 155-159 [1987]). It is interesting to note that IFN- $\alpha$  is currently used for the treatment 10 of cancer as well as viral infection such as chronic hepatitis due to hepatitis B or hepatitis C virus infection. Consistent with the observations of increased levels of IFN- $\alpha$  triggering autoimmunity, significant increase in the appearance of autoimmune disorders such as IDDM, SLE and autoimmune thyroiditis has been reported in the patients undergoing IFN- $\alpha$  therapy. For example, prolonged use of IFN- $\alpha$  as an anti-viral therapy has been shown to 15 induce IDDM (Waguri *et al.*, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 23: 33-36 [1994]; Fabris *et al.*, *J. Hepatol.* 28: 514-517 [1998]) or SLE (Garcia-Porrúa *et al.*, *Clin. Exp. Rheumatol.* 16: 107-108 [1998]). The treatment of coxsackievirus B (CBV) infection with IFN- $\alpha$  therapy is also associated with the induction of IDDM (Chehadeh *et al.*, *J. Infect. Dis.* 181: 1929-1939 [2000]). Similarly, there are multiple case reports documenting IDDM or SLE in IFN- $\alpha$  20 treated cancer patients (Rounblom *et al.*, *J. Intern. Med.* 227: 207-210 [1990]).

*Antibody therapy*

The use of monoclonal antibodies as therapeutics has gained increased acceptance with several monoclonal antibodies (mAbs) either approved for human use or in late stage 25 clinical trials. The first mAb approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of allograft rejection was anti-CD3 (OKT3) in 1986. Since then the pace of progress in the field of mAbs has been considerably accelerated, particularly from 1994 onwards which led to approval of additional seven mAbs for human treatment. These include ReoPro<sup>®</sup> for the management of complications of coronary angioplasty in 1994, 30 Zenapax<sup>®</sup> (anti-CD25) for the prevention of allograft rejection in 1997, Rituxan<sup>®</sup> (anti-CD20) for the treatment of B cell non-Hodgkin's lymphoma in 1997, Infliximab<sup>®</sup> (anti-TNF- $\alpha$ ) initially for the treatment of Crohn's disease in 1998 and subsequently for the

WO 02/066649

PCT/US02/02709

treatment of rheumatoid arthritis in 1999, Simulect® (anti-CD25) for the prevention of allograft rejection in 1998, Synagis® (anti-F protein of respiratory syncytial virus) for the treatment of respiratory infections in 1998, and Herceptin® (anti-HER2/neu) for the treatment of HER2 overexpressing metastatic breast tumors in 1998 (Glennie and Johnson,

5 *Immunol. Today* 21: 403-410 [2000]).

Anti-IFN- $\alpha$  Antibodies

Disease states that are amenable to intervention with mAbs include all those in which there is a pathological level of a target antigen. For example, an antibody that  
10 neutralizes IFN- $\alpha$  present in the sera of patients with SLE, and expressed by the pancreatic islets in IDDM, is a potential candidate for therapeutic intervention in these diseases. It could also be used for therapeutic intervention in other autoimmune diseases with underlying increase in and causative role of IFN- $\alpha$  expression. In both human IDDM (Foulis, *et al.*, *Lancet* 2: 1423-1427 [1987]; Huang, *et al.*, *Diabetes* 44: 658-664 [1995];  
15 Somoza, *et al.*, *J. Immunol.* 153: 1360-1377 [1994]) and human SLE (Hooks, *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 25: 396-400 [1982]; Kim, *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 70: 562-569 [1987]; Lacki, *et al.*, *J. Med.* 28: 99-107 [1997]; Robak, *et al.*, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 46: 375-380 [1998]; Shiozawa, *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 35: 417-422 [1992]; von Wussow, *et al.*, *Rheumatology International* 8: 225-230 [1988])  
20 there appears to be correlation between disease and IFN- $\alpha$  but not with either IFN- $\beta$  or IFN- $\gamma$ . Thus, anti-interferon mAb intervention in IDDM or SLE would require specific neutralization of most, if not all, of the IFN- $\alpha$  subtypes, without any significant neutralization of IFN- $\beta$  or IFN- $\gamma$ . Leaving the activity of these last two interferons intact may also have an advantage in allowing the retention of significant anti-viral activity.

25 While a few mAbs that show reactivity with a range of recombinant human IFN- $\alpha$  subtypes have been described, these were found to neutralize only a limited subset of the recombinant IFN- $\alpha$  subtypes analyzed or were not capable of neutralizing the mixture of IFN- $\alpha$  subtypes that are produced by stimulated peripheral blood leukocytes (Tsukui *et al.*, *Microbiol. Immunol.* 30: 1129-1139 [1986]; Berg, *J. Interferon Res.* 4: 481-491 [1984];  
30 Meager and Berg, *J. Interferon Res.* 6: 729-736 [1986]; US Patent No. 4,902,618; and EP publication No. 0,139,676 B1).

WO 02/066649

PCT/US02/02709

Accordingly, there is a great need for anti-IFN- $\alpha$  antibodies that not only bind to most, preferably all, subtypes of IFN- $\alpha$  but also neutralize such subtypes while do not interfere with the biological function of other interferons.

5

#### Summary of the Invention

The present invention is based on the development of a monoclonal antibody that was experimentally found to neutralize all seven of different recombinant human IFN- $\alpha$  subtypes tested and two independent pools of natural human IFN- $\alpha$  subtypes.

In one aspect, the invention provides an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody which binds to and neutralizes a biological activity of at least human IFN- $\alpha$  subtypes IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\alpha$ 4, IFN- $\alpha$ 5, IFN- $\alpha$ 8, IFN- $\alpha$ 10, and IFN- $\alpha$ 21. In a further aspect, the invention provides an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody which binds to and neutralizes a biological activity of all human IFN- $\alpha$  subtypes. The antibody of the invention can significantly reduce or eliminate a biological activity of the human IFN- $\alpha$  in question. In one embodiment, the antibody of the invention is capable of neutralizing at least 60%, or at least 70%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, even more preferably at least 85%, still more preferably at least 90%, still more preferably at least 95%, most preferably at least 99% of a biological activity of the subject human IFN- $\alpha$ . In another embodiment, the human IFN- $\alpha$  biological activity-neutralizing monoclonal antibody does not neutralize the corresponding biological activity of human IFN- $\beta$ .

The biological activity of the subject human IFN- $\alpha$ 's may be IFNAR2-binding activity. In a particular embodiment, the invention provides an anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody is capable of binding to and blocking at least 60%, or at least 70%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, even more preferably at least 85%, still more preferably at least 90%, still more preferably at least 95%, most preferably at least 99% of the IFNAR2-binding activity of all, or substantially all human IFN- $\alpha$  subtypes. In another embodiment, the invention provides an anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody that is capable of binding to and blocking at least 60%, or at least 70%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, even more preferably at least 85%, still more preferably at least 90%, still more preferably at least 95%, most preferably at least 99% of the IFNAR2-binding activity of each of human IFN- $\gamma$  subtypes 1, 2, 4, 5, 8, 10 and 21. In

WO 02/066649

PCT/US02/02709

another embodiment, the anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody does not cross-react with human IFN- $\beta$ .

The biological activity of the subject human IFN- $\alpha$ 's may be an antiviral activity. In one embodiment, the anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody is capable of binding to and neutralizing the antiviral activity of all, or substantially all human IFN- $\alpha$  subtypes. In another embodiment, the anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody is capable of binding to and neutralizing the antiviral activity of each of human IFN- $\gamma$  subtypes 1, 2, 4, 5, 8, 10 and 21. In a particular embodiment, the invention provides an anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody that is capable of binding to and neutralizing at least 60%, or at least 70%, 10 preferably at least 75%, more preferably at least 80%, even more preferably at least 85%, still more preferably at least 90%, still more preferably at least 95%, most preferably at least 99% of the antiviral activity of all, or substantially all human IFN- $\alpha$  subtypes. In yet another embodiment, the invention provides an anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody which binds to and neutralizes at least 60%, or at least 70%, or at least 75%, or at least 15 80%, or at least 85%, or at least 90%, or at least 95%, or at least 99% of the antiviral activity of each of human IFN- $\gamma$  subtypes 1, 2, 4, 5, 8, 10 and 21. In still another embodiment, the human IFN- $\alpha$  antiviral activity-neutralizing monoclonal antibody does not neutralize the antiviral activity of human IFN- $\beta$ .

The antibody may be a murine, humanized or human antibody. The antibody may 20 be the murine anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody 9F3 or a humanized version of it such as version 13 (V13) or chimeric form thereof. The scope of the invention also covers an antibody that binds essentially the same IFN- $\alpha$  epitope as murine anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody 9F3 or a humanized or chimeric form thereof. For example, a reference antibody for this purpose is an anti-IFN- $\alpha$  antibody produced by the murine 25 hybridoma cell line 9F3.18.5 deposited with ATCC on January 18, 2001 and having accession No. PTA-2917. In another embodiment, the invention provides a murine or murine/human chimeric anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody comprising the murine light chain variable domain amino acid sequence shown in Fig. 5A (SEQ ID NO:1) and/or the murine heavy chain variable domain amino acid sequence shown in Fig. 5B (SEQ ID 30 NO:2). In yet another embodiment, the invention provides a humanized anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody comprising the humanized light chain variable domain amino acid

WO 02/066649

PCT/US02/02709

sequence shown in Fig. 5A (SEQ ID NO:3) and/or the humanized heavy chain variable domain amino acid sequence shown in Fig. 5B (SEQ ID NO:5).

5 Additionally provided is an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody that binds essentially the same epitopes on human IFN- $\alpha$  subtypes 1, 2, 4, 5, 8, 10 and 21 that are bound by murine anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody 9F3 or a humanized or chimeric form thereof. Further provided herein is an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody that competes with murine anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody 9F3 for binding to each of human IFN- $\alpha$  subtypes 1, 2, 4, 5, 8, 10 and 21.

10 Also provided is an isolated nucleic acid molecule encoding any of the antibodies described herein, a vector comprising the isolated nucleic acid molecule, a host cell transformed with the nucleic acid molecule, and a method of producing the antibody comprising culturing the host cell under conditions wherein the nucleic acid molecule is expressed to produce the antibody and optionally recovering the antibody from the host cell. The antibody may be of the IgG class and isotypes such as IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, or IgG<sub>4</sub>.  
15 The scope of the invention also covers antibody fragments such as Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab' fragments.

In another aspect, the present invention provides an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody light chain or a fragment thereof, comprising the following CDR's (as defined by Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH 20 Publication 91-3242, Bethesda MD [1991], vols. 1-3): (a) L1 of the formula RASQSVSTSSYMH (SEQ ID NO: 7); (b) L2 of the formula YASNLES (SEQ ID NO: 8); and (c) L3 of the formula QHSGWIPRTF (SEQ ID NO: 9). The scope of the invention also covers the light chain variable domain of such anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody light chain fragment. The scope of the invention further includes an anti-human IFN- $\alpha$  25 monoclonal antibody light chain polypeptide comprising the mouse/human chimeric light chain variable domain amino acid sequence, or the entire chimeric light chain polypeptide amino acid sequence, encoded by the XAIFN-ChLpDR1 vector deposited with the ATCC on January 9, 2001 and having accession No. PTA-2880. The scope of the invention additionally includes an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody light chain polypeptide 30 comprising the humanized light chain variable domain amino acid sequence, or the entire humanized light chain polypeptide amino acid sequence, encoded by the VLV30-IgG vector deposited with the ATCC on January 9, 2001 and having accession No. PTA-2882.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

In yet another aspect, the invention provides an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody heavy chain or a fragment thereof, comprising the following CDR's: (a) H1 of the formula GYTFT EYIIH (SEQ ID NO: 10); (b) H2 of the formula SINPDYDITNYNQRFKG (SEQ ID NO: 11); and (c) H3 of the formula WISDFFDY (SEQ ID NO: 12). The scope of the invention also covers the heavy chain variable domain of such anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody heavy chain fragment. The scope of the invention further includes an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody heavy chain polypeptide comprising the mouse/human chimeric heavy chain variable domain amino acid sequence, or the entire chimeric heavy chain polypeptide amino acid sequence, 10 encoded by the XAIFN-ChHpDR2 vector deposited with the ATCC on January 9, 2001 and having accession No. PTA-2883. Additionally included is an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody heavy chain polypeptide comprising the humanized heavy chain variable domain amino acid sequence, or the entire humanized heavy chain polypeptide amino acid sequence, encoded by the vector VHV30-IgG2 deposited with the ATCC on 15 January 9, 2001 and having accession No. PTA-2881.

In a further aspect, the invention provides an anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody comprising (A) at least one light chain or a fragment thereof, comprising the following CDR's: (a) L1 of the formula RASQSVSTSSYMH (SEQ ID NO: 7); (b) L2 of the formula YASNLES (SEQ ID NO: 8); and (c) L3 of the formula QHSGIPRTF (SEQ ID NO: 9); and (B) at least one heavy chain or a fragment thereof, comprising the following CDR's: (a) H1 of the formula GYTFTYEYIIH (SEQ ID NO: 10); (b) H2 of the formula SINPDYDITNYNQRFKG (SEQ ID NO: 11); and (c) H3 of the formula WISDFFDY (SEQ ID NO: 12). The antibody may be a homo-tetrameric structure composed of two disulfide-bonded antibody heavy chain-light chain pairs. The scope of the 25 invention specifically includes a linear antibody, a murine antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, or a human antibody. Further provided is a chimeric antibody comprising (1) the mouse/human chimeric light chain variable domain amino acid sequence, or the entire chimeric light chain polypeptide amino acid sequence, encoded by the XAIFN-ChLpDR1 vector deposited with the ATCC on January 9, 2001 and having 30 accession No. PTA-2880; and (2) the mouse/human chimeric heavy chain variable domain amino acid sequence, or the entire chimeric heavy chain polypeptide amino acid sequence, encoded by the XAIFN-ChHpDR2 vector deposited with the ATCC on January 9, 2001 and

WO 02/066649

PCT/US02/02709

having accession No. PTA-2883. Additionally provided herein is a humanized antibody comprising (1) the humanized light chain variable domain amino acid sequence, or the entire humanized light chain polypeptide amino acid sequence, encoded by the VLV30-IgG vector deposited with the ATCC on January 9, 2001 and having accession No. PTA-2882; 5 and (2) the humanized heavy chain variable domain amino acid sequence, or the entire humanized heavy chain polypeptide amino acid sequence, encoded by the vector VHV30-IgG2 deposited with the ATCC on January 9, 2001 and having accession No. PTA-2881.

In yet another aspect, the invention provides a pharmaceutical composition comprising an effective amount of the antibody of the invention in admixture with a 10 pharmaceutically acceptable carrier.

In a different aspect, the invention provides a method for diagnosing a condition associated with the expression of IFN- $\alpha$  in a cell, comprising contacting the cell with an anti-IFN- $\alpha$  antibody, and detecting the presence of IFN- $\alpha$ .

In yet another aspect, the invention provides a method for the treatment of a disease 15 or condition associated with the expression of IFN- $\alpha$  in a patient, comprising administering to the patient an effective amount of an anti-IFN- $\alpha$  antibody. The patient is a mammalian patient, preferably a human patient. The disease is an autoimmune disease, such as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM); systemic lupus erythematosus (SLE); or autoimmune thyroiditis.

20 Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows a schematic diagram of the strategy used for the development of the anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibodies.

Fig. 2 shows that a murine anti-human IFN- $\alpha$  mAb (9F3) is able to neutralize a 25 spectrum of recombinant IFN- $\alpha$  subtypes but not recombinant IFN- $\beta$ . The indicated IFN's were assayed for inhibition of encephalomyocarditis (EMC) viral growth in A549 cells in the presence of increasing concentrations of the mAb 9F3. Data are presented as the percentage of the viral growth inhibition activity obtained with the indicated IFN in the absence of mAb 9F3.

Figs. 3A-3B show the neutralization of leukocyte interferon (Sigma) (Fig. 3A) and 30 lymphoblastoid interferon (NIH reference Ga23-901-532) (Fig. 3B). In Fig. 3A, 20,000 IU/ml (filled bars) or 5,000 IU/ml (open bars) of leukocyte interferon (Sigma Product No. L-2396) were incubated with blank control (buffer only) (denoted as “-”), 10  $\mu$ g/ml control

WO 02/066649

PCT/US02/02709

mouse IgG (denoted as "mIgG"), or 10  $\mu$ g/ml mAb 9F3 (denoted as "9F3"). Dilutions were assayed and the amount of remaining activity shown. The results shown are means of duplicate determinations. In Fig. 3B, lymphoblastoid interferon (NIH reference Ga23-901-532) was assayed at 10 (filled columns) or 3 (open columns) IU/ml in the presence or 5 absence of the indicated concentrations of mAb 9F3. A higher cytopathic effect is indicative of a decrease in interferon activity. The results shown are the means of duplicate determinations.

Fig. 4 depicts results of an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) showing the induction of an ISGF3/ISRE complex by IFN- $\alpha$  and the ability of 9F3 mAb to prevent the 10 formation of the complex. EMSA was performed in the presence or absence of either human IFN- $\alpha$ 2 (denoted as " $\alpha$ 2") or IFN- $\beta$  (denoted as " $\beta$ ") at a concentration of 25 ng/ml with 9F3 mAb (denoted as "9F3") or murine IgG control antibody (denoted as "IgG") at a concentration of 10  $\mu$ g/ml.

Fig. 5A shows the alignment of light chain variable domain amino acid sequences 15 of murine 9F3 (murine, SEQ ID NO: 1), humanized 9F3 version 13 (V13, SEQ ID NO: 3), and the consensus human variable domain light  $\kappa$  subgroup I (hukI, SEQ ID NO: 4). The CDRs (L1, SEQ ID NO: 7; L2, SEQ ID NO: 8; and L3, SEQ ID NO: 9) are highlighted by underlining. The residue numbering is according to Kabat *et al.*, (1991) *supra*. The differences between the murine 9F3 and V13 sequences and the differences between 9F3 20 and hukI sequences are indicated by asterisks.

Fig. 5B shows the alignment of heavy chain variable domain amino acid sequences of murine 9F3 (murine, SEQ ID NO: 2), humanized 9F3 version 13 (V13, SEQ ID NO: 5), and the consensus human variable domain heavy subgroup III (hulII, SEQ ID NO: 6). The 25 CDRs (H1, SEQ ID NO: 10; H2, SEQ ID NO: 11; and H3, SEQ ID NO: 12) are highlighted by underlining. The residue numbering is according to Kabat *et al.* (1991) *supra*. The differences between the murine 9F3 and V13 sequences and the differences between 9F3 and hulII sequences are indicated by asterisks.

Fig. 6 shows neutralization activity of the starting mAb 9F3 (left panel) and the 30 chimeric protein CH8-2 (right panel) toward the viral growth inhibition exhibited by recombinant IFN- $\alpha$  subtypes in A549 cells challenged with encephalomyocarditis (EMC) virus.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

Fig. 7 depicts a model of humanized 9F3 version 13. Backbone of VL and VH domains is shown as a ribbon. CDRs are shown in white and are labeled (L1, L2, L3, H1, H2, H3). Framework side chains altered from human to murine are shown in white and are labeled by residue number.

5

Detailed Description of the Preferred Embodiment

A. Definitions

Unless defined otherwise, technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. See, e.g. Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed.*, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). For purposes of the present invention, the following terms are defined below.

As used herein, the term "type I interferon" is defined to include all subtypes of native sequence type I interferons of any mammalian species, including interferon- $\alpha$ , interferon- $\beta$ , interferon- $\delta$ , interferon- $\omega$  and interferon- $\tau$ . Similarly, the term "human type I interferon" is defined to include all subtypes of native sequence type I human interferons, including human interferon- $\alpha$ , interferon- $\beta$  and interferon- $\omega$  classes and which bind to a common cellular receptor.

Unless otherwise expressly provided, the terms "interferon- $\alpha$ ," "IFN- $\alpha$ ," and "human interferon- $\alpha$ ," "human IFN- $\alpha$ " and "hIFN- $\alpha$ " are used herein to refer to all species of native sequence human alpha interferons, including all subtypes of native sequence human interferons- $\alpha$ . Natural (native sequence) human interferon- $\alpha$  comprises 23 or more closely related proteins encoded by distinct genes with a high degree of structural homology (Weissmann and Weber, *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 33: 251 [1986]; *J. Interferon Res.*, 13: 443-444 [1993]; Roberts *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 805-816 [1998]). The human IFN- $\alpha$  locus comprises two subfamilies. The first subfamily consists of at least 14 functional, non-allelic genes, including genes encoding IFN- $\alpha$ A (IFN- $\alpha$ 2), IFN- $\alpha$ B (IFN- $\alpha$ 8), IFN- $\alpha$ C (IFN- $\alpha$ 10), IFN- $\alpha$ D (IFN- $\alpha$ 1), IFN- $\alpha$ E (IFN- $\alpha$ 22), IFN- $\alpha$ F (IFN- $\alpha$ 21), IFN- $\alpha$ G (IFN- $\alpha$ 5), and IFN- $\alpha$ H (IFN- $\alpha$ 14), and pseudogenes having at least 80% homology. The second subfamily,  $\alpha_{II}$  or T, contains at least 5 pseudogenes and one

WO 02/066649

PCT/US02/02709

functional gene (denoted herein as "IFN- $\alpha$ 1" or "IFN-T") which exhibits 70% homology with the IFN- $\alpha$  genes (Weissmann and Weber [1986] *supra*).

As used herein, the terms "first human interferon- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ ) receptor", "IFN- $\gamma$ R", "hIFNAR1", "IFNAR1", and "Uze chain" are defined as the 557 amino acid receptor 5 protein cloned by Uze *et al.*, *Cell*, **60**: 225-234 (1990), including an extracellular domain of 409 residues, a transmembrane domain of 21 residues, and an intracellular domain of 100 residues, as shown in Fig. 5 on page 229 of Uze *et al.* Also encompassed by the foregoing terms are fragments of IFNAR1 that contain the extracellular domain (ECD) (or fragments of the ECD) of IFNAR1.

10 As used herein, the terms "second human interferon- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ ) receptor", "IFN- $\gamma$ R", "hIFNAR2", "IFNAR2", and "Novick chain" are defined as the 515 amino acid receptor protein cloned by Domanski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **37**: 21606-21611 (1995), including an extracellular domain of 217 residues, a transmembrane domain of 21 residues, and an intracellular domain of 250 residues, as shown in Fig. 1 on page 21608 of Domanski 15 *et al.* Also encompassed by the foregoing terms are fragments of IFNAR2 that contain the extracellular domain (ECD) (or fragments of the ECD) of IFNAR2, and soluble forms of IFNAR2, such as IFNAR2 ECD fused to an immunoglobulin sequence, e.g. IFNAR2 ECD-IgG Fc as described below.

The term "native sequence" in connection with type I interferon, IFN- $\alpha$  or any other 20 polypeptide refers to a polypeptide that has the same amino acid sequence as a corresponding polypeptide derived from nature, regardless of its mode of preparation. Such native sequence polypeptide can be isolated from nature or can be produced by recombinant and/or synthetic means or any combinations thereof. The term "native sequence" 25 specifically encompasses naturally-occurring truncated or secreted forms (e.g., an extracellular domain sequence), naturally-occurring variant forms (e.g., alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants of the full length polypeptides.

"Polymerase chain reaction" or "PCR" refers to a procedure or technique in which minute 30 amounts of a specific piece of nucleic acid, RNA and/or DNA, are amplified as described in U.S. Patent No. 4,683,195 issued 28 July 1987. Generally, sequence information from the ends of the region of interest or beyond needs to be available, such that oligonucleotide primers can be designed; these primers will be identical or similar in sequence to opposite strands of the template to be amplified. The 5' terminal nucleotides of the two primers can

WO 02/066649

PCT/US02/02709

coincide with the ends of the amplified material. PCR can be used to amplify specific RNA sequences, specific DNA sequences from total genomic DNA, and cDNA transcribed from total cellular RNA, bacteriophage or plasmid sequences, etc. See generally Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology* 5 (Stockton Press, NY, 1989). As used herein, PCR is considered to be one, but not the only, example of a nucleic acid polymerase reaction method for amplifying a nucleic acid test sample comprising the use of a known nucleic acid as a primer and a nucleic acid polymerase to amplify or generate a specific piece of nucleic acid.

"Antibodies" (Abs) and "immunoglobulins" (Igs) are glycoproteins having the same 10 structural characteristics. While antibodies exhibit binding specificity to a specific antigen, immunoglobulins include both antibodies and other antibody-like molecules which lack antigen specificity. Polypeptides of the latter kind are, for example, produced at low levels by the lymph system and at increased levels by myelomas.

"Native antibodies and immunoglobulins" are usually heterotetrameric 15 glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies between the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (VH) 20 followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (VL) and a constant domain at its other end; the constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light- and heavy-chain variable 25 domains (Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 186:651 [1985]; Novotny and Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4592 [1985]; Chothia *et al.*, *Nature* 342: 877-883 [1989]).

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains 30 differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called complementarity-determining regions (CDRs) or hypervariable regions both in the light-chain and the heavy-chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework (FR). The variable domains of

WO 02/066649

PCT/US02/02709

native heavy and light chains each comprise four FR regions, largely adopting a  $\beta$ -sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the  $\beta$ -sheet structure. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FR regions and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.* (1991) *supra*). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody-dependent cellular toxicity.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an  $F(ab')_2$  fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. In a two-chain Fv species, this region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. In a single-chain Fv species, one heavy- and one light-chain variable domain can be covalently linked by a flexible peptide linker such that the light and heavy chains can associate in a "dimeric" structure analogous to that in a two-chain Fv species. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the VH-VL dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group.  $F(ab')_2$  antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called  $\kappa$  and  $\lambda$ , based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these can be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, and IgA<sub>2</sub>. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , and  $\mu$  respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

The term "antibody" includes all classes and subclasses of intact immunoglobulins. The term "antibody" also covers antibody fragments. The term "antibody" specifically covers monoclonal antibodies, including antibody fragment clones.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody that contains the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, and Fv fragments; diabodies; single-chain antibody molecules, including single-chain Fv (scFv) molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody (or antibody fragment) obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they are synthesized by the hybridoma culture, and are not contaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (see, *e.g.*, U.S.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" also include clones of antigen-recognition and binding-site containing antibody fragments (Fv clones) isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), for example.

5 The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from  
10 another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567 to Cabilly *et al.*; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 [1984]).

15 "Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from part or all of a complementarity-determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues  
20 from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. These modifications  
25 are made to further refine and optimize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a  
30 portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); and Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000). The humanized antibody includes

WO 02/066649

PCT/US02/02709

a Primatized™ antibody wherein the antigen-binding region of the antibody is derived from an antibody produced by immunizing macaque monkeys with the antigen of interest.

"Single-chain Fv" or "scFv" antibody fragments comprise the VH and VL domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, 5 the scFv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the VH and VL domains, which enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of scFv see Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Dall'Acqua and Carter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 443-450 (1998), and Hudson, *Curr. Opin. Immunol.* 10: 548-557 (1999).

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) in the same polypeptide chain (VH - VL). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains 15 are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its 20 natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues 25 of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one 30 purification step.

By "neutralizing antibody" is meant an antibody molecule which is able to eliminate or significantly reduce an effector function of a target antigen to which it binds. Accordingly, a "neutralizing" anti-IFN- $\alpha$  antibody is capable of eliminating or significantly

WO 02/066649

PCT/US02/02709

reducing an effector function, such as receptor binding and/or elicitation of a cellular response, of IFN- $\alpha$ .

For the purpose of the present invention, the ability of an anti-IFN- $\alpha$  antibody to neutralize the receptor activation activity of IFN- $\alpha$  can be monitored, for example, in a 5 Kinase Receptor Activation (KIRA) Assay as described in WO 95/14930, published June 1, 1995, by measuring the ability of a candidate antibody to reduce tyrosine phosphorylation (resulting from ligand binding) of the IFNAR1/R2 receptor complex.

For the purpose of the present invention, the ability of the anti-IFN- $\alpha$  antibodies to neutralize the elicitation of a cellular response by IFN- $\alpha$  is preferably tested by monitoring 10 the neutralization of the antiviral activity of IFN- $\alpha$ , as described by Kawade, *J. Interferon Res.* 1:61-70 (1980), or Kawade and Watanabe, *J. Interferon Res.* 4:571-584 (1984), or Yousefi, et al., *Am. J. Clin. Pathol.* 83: 735-740 (1985), or by testing the ability of an anti-IFN- $\alpha$  antibody to neutralize the ability of IFN- $\alpha$  to activate the binding of the signaling molecule, interferon-stimulated factor 3 (ISGF3), to an oligonucleotide derived from the 15 interferon-stimulated response element (ISRE), in an electrophoretic mobility shift assay, as described by Kurabayashi et al., *Mol. Cell Biol.*, 15: 6386 (1995).

“Significant” reduction means at least about 60%, or at least about 70%, preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85%, still more preferably at least about 90%, still more preferably at least about 95%, 20 most preferably at least about 99% reduction of an effector function of the target antigen (e.g. IFN- $\alpha$ ), such as receptor (e.g. IFNAR2) binding and/or elicitation of a cellular response. Preferably, the “neutralizing” antibodies as defined herein will be capable of neutralizing at least about 60%, or at least about 70%, preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85%, still more 25 preferably at least about 90%, still more preferably at least about 95%, most preferably at least about 99% of the anti-viral activity of IFN- $\alpha$ , as determined by the anti-viral assay of Kawade (1980), *supra*, or Yousefi (1985), *supra*. In another preferred embodiment, the “neutralizing” antibodies herein will be capable of reducing tyrosine phosphorylation, due to IFN- $\alpha$  binding, of the IFNAR1/IFNAR2 receptor complex, by at least about 60%, or at 30 least about 70%, preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%; even more preferably at least about 85%, still more preferably at least about 90%, still more preferably at least about 95%, most preferably at least about 99%, as determined in the

WO 02/066649

PCT/US02/02709

KIRA assay referenced above. In a particularly preferred embodiment, the neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibodies herein will be able to neutralize all, or substantially all, subtypes of IFN- $\alpha$  and will not be able to neutralize IFN- $\beta$ . In this context, the term "substantially all" means that the neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibody will neutralize at least IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\alpha$ 2,

5 IFN- $\alpha$ 4, IFN- $\alpha$ 5, IFN- $\alpha$ 8, IFN- $\alpha$ 10, and IFN- $\alpha$ 21.

For the purpose of the present invention, the ability of an anti-IFN- $\alpha$  antibody to block the binding of an IFN- $\alpha$  to receptor is defined as the property or capacity of a certain concentration of the antibody to reduce or eliminate the binding of IFN- $\alpha$  to IFNAR2 in a competition binding assay, as compared to the effect of an equivalent concentration of 10 irrelevant control antibody on IFN- $\alpha$  binding to IFNAR2 in the assay. Preferably, the blocking anti-IFN- $\alpha$  antibody reduces the binding of IFN- $\alpha$  to IFNAR2 by at least about 50%, or at least about 55%, or at least about 60%, or at least about 65%, or at least about 70%, or at least about 75%, or at least about 80%, or at least about 85%, or at least about 90%, or at least about 95%, or at least about 99%, as compared to the irrelevant control 15 antibody.

For the purpose of the present invention, the ability of an anti-IFN- $\alpha$  antibody to block the binding of IFN- $\alpha$  to IFNAR2 can be determined by a routine competition assay such as that described in *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). For example, the IFN- $\alpha$ -binding ELISA 20 assay described in Example 2 below could be modified to employ competition binding between an anti-IFN- $\alpha$  antibody and a soluble IFNAR2. Such an assay could be performed by layering the IFN- $\alpha$  on microtiter plates, incubating the layered plates with serial dilutions of unlabeled anti-IFN- $\alpha$  antibody or unlabeled control antibody admixed with a selected concentration of labeled IFNAR2 ECD-human IgG Fc fusion protein, detecting 25 and measuring the signal in each incubation mixture, and then comparing the signal measurements exhibited by the various dilutions of antibody.

In a particularly preferred embodiment, the blocking anti-IFN- $\alpha$  antibodies herein will be able to block the IFNAR2-binding of all, or substantially all, subtypes of IFN- $\alpha$  and will not cross-react with IFN- $\beta$ . In this context, the term "substantially all" means that the 30 blocking anti-IFN- $\alpha$  antibody will block the IFNAR2-binding of at least IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\alpha$ 4, IFN- $\alpha$ 5, IFN- $\alpha$ 8, IFN- $\alpha$ 10, and IFN- $\alpha$ 21. In a particularly preferred embodiment,

WO 02/066649

PCT/US02/02709

the blocking anti-IFN- $\alpha$  antibodies of the present invention will block the IFNAR2-binding of all known subtypes of IFN- $\alpha$ .

The term "epitope" is used to refer to binding sites for (monoclonal or polyclonal) antibodies on protein antigens.

5       Antibodies which bind to a particular epitope can be identified by "epitope mapping." There are many methods known in the art for mapping and characterizing the location of epitopes on proteins, including solving the crystal structure of an antibody-antigen complex, competition assays, gene fragment expression assays, and synthetic peptide-based assays, as described, for example, in Chapter 11 of Harlow and Lane, *Using Antibodies*, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. Competition assays are discussed above and below. According to the gene fragment expression assays, the open reading frame encoding the protein is fragmented either randomly or by specific genetic constructions and the reactivity of the expressed fragments of the protein with the antibody to be tested is determined. The gene fragments may, for example, be produced by PCR and then transcribed and translated into protein *in vitro*, in the presence of radioactive amino acids. The binding of the antibody to the radioactively labeled protein fragments is then determined by immunoprecipitation and gel electrophoresis. Certain epitopes can also be identified by using large libraries of random peptide sequences displayed on the surface of phage particles (phage libraries).

10      Alternatively, a defined library of overlapping peptide fragments can be tested for binding to the test antibody in simple binding assays. The latter approach is suitable to define linear epitopes of about 5 to 15 amino acids.

15

An antibody binds "essentially the same epitope" as a reference antibody, when the two antibodies recognize identical or sterically overlapping epitopes. The most widely used 25 and rapid methods for determining whether two epitopes bind to identical or sterically overlapping epitopes are competition assays, which can be configured in all number of different formats, using either labeled antigen or labeled antibody. Usually, the antigen is immobilized on a 96-well plate, and the ability of unlabeled antibodies to block the binding of labeled antibodies is measured using radioactive or enzyme labels.

30      The term amino acid or amino acid residue, as used herein, refers to naturally occurring L amino acids or to D amino acids as described further below with respect to variants. The commonly used one- and three-letter abbreviations for amino acids are used

WO 02/066649

PCT/US02/02709

herein (Bruce Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York (3d ed. 1994)).

“Percent (%) amino acid sequence identity” with respect to the polypeptide sequences referred to herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in a sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are obtained as described below by using the sequence comparison computer program ALIGN-2. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and its source code has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California, and the source code for the ALIGN-2 program and instructions for its use are disclosed in International Application Publication No. WO2000/39297 published July 6, 2000. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

For purposes herein, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

30

100 times the fraction X/Y

WO 02/066649

PCT/US02/02709

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described above using the ALIGN-2 sequence comparison computer program. However, % amino acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final 15 gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence 20 identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

100 times the fraction X/Y

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

30 Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to

WO 02/066649

PCT/US02/02709

a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers 5 do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

The term "disease state" refers to a physiological state of a cell or of a whole mammal in which an interruption, cessation, or disorder of cellular or body functions, 10 systems, or organs has occurred.

The term "effective amount" refers to an amount of a drug effective to treat (including prevention) of a disease, disorder or unwanted physiological conditions in a mammal. In the present invention, an "effective amount" of an anti-IFN- $\alpha$  antibody may reduce, slow down or delay an autoimmune disorder such as IDDM or SLE; reduce, prevent 15 or inhibit (i.e., slow to some extent and preferably stop) the development of an autoimmune disorder such as IDDM or SLE; and/or relieve to some extent one or more of the symptoms associated with autoimmune disorders such as IDDM or SLE.

In the methods of the present invention, the term "control" and grammatical variants thereof, are used to refer to the prevention, partial or complete inhibition, reduction, delay 20 or slowing down of an unwanted event, e.g. physiological condition, such as the generation of autoreactive T cells and development of autoimmunity.

"Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in which the disorder is to be prevented. For 25 purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, alleviation of symptoms, diminishment of extent of disease, stabilized (i.e., not worsening) state of disease, delay or slowing of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission (whether partial or total), whether detectable or undetectable. "Treatment" can also mean prolonging survival as compared to expected 30 survival if not receiving treatment. Those in need of treatment include those already with the condition or disorder as well as those prone to have the condition or disorder or those in which the condition or disorder is to be prevented.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

"Pharmaceutically acceptable" carriers, excipients, or stabilizers are ones which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as 5 EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as Tween<sup>TM</sup>, polyethylene glycol (PEG), and Pluronics<sup>TM</sup>.

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as 10 dogs, horses, cats, cows, etc. Preferably, the mammal is human.

B. Methods for carrying out the invention

1. Generation of Antibodies

(i) *Polyclonal antibodies*

20 Methods of preparing polyclonal antibodies are known in the art. Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. It may be useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be 25 immunogenic in the mammal being immunized, such as serum albumin, or soybean trypsin inhibitor. Examples of adjuvants which may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM.

In another preferred embodiment, animals are immunized with a mixture of various, preferably all, IFN- $\alpha$  subtypes in order to generate anti-IFN- $\alpha$  antibodies with broad 30 reactivity against IFN- $\alpha$  subtypes. In another preferred embodiment, animals are immunized with the mixture of human IFN- $\alpha$  subtypes that is present in the human lymphoblastoid interferons secreted by Burkitt lymphoma cells (Namalva cells) induced

WO 02/066649

PCT/US02/02709

with Sendai virus, as described in Example 1 below. A suitable preparation of such human lymphoblastoid interferons can be obtained commercially (Product No. I-9887) from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

5 (ii) *Monoclonal antibodies*

Monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster or macaque monkey, is immunized as hereinabove described to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. Lymphocytes then are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103, [Academic Press, 1996]).

The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these, preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from MOP-21 and MC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, [1987]).

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of

WO 02/066649

PCT/US02/02709

monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by 5 the Scatchard analysis of Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107: 220 (1980).

After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the cells may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103, Academic Press, 1996). Suitable culture media for this purpose 10 include, for example, DMEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from 15 the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the monoclonal antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA 20 may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place 25 of the homologous murine sequences (Morrison, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 6851 [1984]), or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. In that manner, "chimeric" or "hybrid" antibodies are prepared that have the binding specificity of an anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibody herein.

30 Typically such non-immunoglobulin polypeptides are substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent

WO 02/066649

PCT/US02/02709

antibody comprising one antigen-combining site having specificity for an IFN- $\alpha$  and another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

Chimeric or hybrid antibodies also may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, 5 immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptopbutyrimidate.

Recombinant production of antibodies will be described in more detail below.

10        *(iii) Humanized antibodies*

Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a non-human source. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers 15 by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 [1986]; Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327 [1988]; Verhoeven *et al.*, *Science* 239: 1534-1536 [1988]); reviewed in Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 [2000]).

Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (Cabilly, *supra*), 20 wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

It is important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the 25 antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer 30 programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, i.e. the analysis of residues that influence the ability

WO 02/066649

PCT/US02/02709

of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the consensus and import sequence so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the CDR residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding. For further details, see U.S. patent No. 5,821,337.

5 (iv) *Human antibodies*

Attempts to use the same technology for generating human mAbs have been hampered by the lack of a suitable human myeloma cell line. The best results were obtained 10 using heteromyelomas (mouse x human hybrid myelomas) as fusion partners (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur, *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987). Alternatively, human antibody-secreting cells can be immortalized by infection with the Epstein-Barr virus (EBV). However, EBV-infected cells are difficult to clone and usually produce only 15 relatively low yields of immunoglobulin (James and Bell, *J. Immunol. Methods* 100: 5-40 [1987]). In future, the immortalization of human B cells might possibly be achieved by introducing a defined combination of transforming genes. Such a possibility is highlighted by a recent demonstration that the expression of the telomerase catalytic subunit together with the SV40 large T oncprotein and an oncogenic allele of H-ras resulted in the 20 tumorigenic conversion of normal human epithelial and fibroblast cells (Hahn *et al.*, *Nature* 400: 464-468 [1999]).

It is now possible to produce transgenic animals (e.g. mice) that are capable, upon immunization, of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production (Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 [1993]; Lonberg and 25 Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93 [1995]; Fishwild *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 14: 845-851 [1996]; Mendez *et al.*, *Nat. Genet.* 15: 146-156 [1997]; Green, *J. Immunol. Methods* 231: 11-23 [1999]; Tomizuka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 [2000]; reviewed in Little *et al.*, *Immunol. Today* 21: 364-370 [2000]). For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy chain joining region (J<sub>H</sub>) gene in chimeric 30 and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production (Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-2555 [1993]). Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice results

WO 02/066649

PCT/US02/02709

in the production of human antibodies upon antigen challenge (Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 [1993]).

Mendez *et al.* (*Nature Genetics* 15: 146-156 [1997]) have generated a line of transgenic mice designated as "XenoMouse® II" that, when challenged with an antigen, 5 generates high affinity fully human antibodies. This was achieved by germ-line integration of megabase human heavy chain and light chain loci into mice with deletion into endogenous  $J_H$  segment as described above. The XenoMouse® II harbors 1,020 kb of human heavy chain locus containing approximately 66  $V_H$  genes, complete  $D_H$  and  $J_H$  regions and three different constant regions ( $\mu$ ,  $\delta$  and  $\gamma$ ), and also harbors 800 kb of human 10  $\kappa$  locus containing 32  $V_\kappa$  genes,  $J_\kappa$  segments and  $C_\kappa$  genes. The antibodies produced in these mice closely resemble that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and repertoire. The human antibodies are preferentially expressed over endogenous antibodies due to deletion in endogenous  $J_H$  segment that prevents gene rearrangement in the murine locus.

15 Tomizuka *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 [2000]) have recently described generation of a double trans-chromosomal (Tc) mice by introducing two individual human chromosome fragments (hCFs), one containing the entire Ig heavy chain locus ( $IgH$ , ~1.5 Mb) and the other the entire  $\kappa$  light chain locus ( $Ig\kappa$ , ~2 Mb) into a mouse strain whose endogenous  $IgH$  and  $Ig\kappa$  loci were inactivated. These mice mounted antigen- 20 specific human antibody response in the absence of mouse antibodies. The Tc technology may allow for the humanization of over megabase-sized, complex loci or gene clusters (such as those encoding T-cell receptors, major histocompatibility complex, P450 cluster etc) in mice or other animals. Another advantage of the method is the elimination of a need of cloning the large loci. This is a significant advantage since the cloning of over megabase-sized DNA fragments encompassing whole Ig loci remains difficult even with the use of yeast artificial chromosomes (Peterson *et al.*, *Trends Genet.* 13: 61-66 [1997]; Jacobovits, *Curr. Biol.* 4: 761-763 [1994]). Moreover, the constant region of the human  $IgH$  locus is known to contain sequences difficult to clone (Kang and Cox, *Genomics* 35: 189-195 25 [1996]).

30 Alternatively, the phage display technology can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors (McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 [1990];

WO 02/066649

PCT/US02/02709

reviewed in Kipriyanov and Little, *Mol. Biotechnol.* 12: 173-201 [1999]; Hoogenboom and Chames, *Immunol. Today* 21: 371-378 [2000]). According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B-cell. Phage display can be performed in a variety of formats (reviewed in Johnson and Chiswell, 5 *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 [1993]); Winter *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455 [1994]; Dall'Acqua and Carter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 443-450 [1998]; Hoogenboom and Chames, *Immunol. Today* 21: 371-378 [2000]). Several sources 10 of V-gene segments can be used for phage display. Clackson *et al.*, (*Nature* 352: 624-628 [1991]) isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random 15 combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), or Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). In a natural immune response, antibody genes accumulate 20 mutations at a high rate (somatic hypermutation). Some of the changes introduced will confer higher affinity, and B cells displaying high-affinity surface immunoglobulin are preferentially replicated and differentiated during subsequent antigen challenge. This natural process can be mimicked by employing the technique known as "chain shuffling" (Marks *et al.*, *Bio/Technol.* 10: 779-783 [1992]). In this method, the affinity of "primary" 25 human antibodies obtained by phage display can be improved by sequentially replacing the heavy and light chain V region genes with repertoires of naturally occurring variants (repertoires) of V domain genes obtained from unimmunized donors. This technique allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities in the nM range. A strategy for making very large phage antibody repertoires (also known as "the mother-of- 30 all libraries") has been described by Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993), and the isolation of a high affinity human antibody directly from such large phage library is reported by Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 13: 3245-3260 (1994). Gene shuffling can also be used to derive human antibodies from rodent antibodies, where the human antibody

WO 02/066649

PCT/US02/02709

has similar affinities and specificities to the starting rodent antibody. According to this method, which is also referred to as "epitope imprinting", the heavy or light chain V domain gene of rodent antibodies obtained by phage display technique is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating rodent-human chimeras. Selection on 5 antigen results in isolation of human variable capable of restoring a functional antigen-binding site, i.e. the epitope governs (imprints) the choice of partner. When the process is repeated in order to replace the remaining rodent V domain, a human antibody is obtained (see PCT patent application WO 93/06213, published 1 April 1993). Unlike traditional 10 humanization of rodent antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no framework or CDR residues of rodent origin.

(v) *Bispecific antibodies*

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of 15 the binding specificities is for an IFN- $\alpha$  to provide a neutralizing antibody, the other one is for any other antigen.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two heavy chains have different 20 specificities (Millstein and Cuello, *Nature* 305: 537-539 [1983]). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. 25 Similar procedures are disclosed in PCT application publication No. WO 93/08829 (published 13 May 1993), and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991).

According to a different and more preferred approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an 30 immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2 and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the

WO 02/066649

PCT/US02/02709

immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, 5 however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance. In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid 10 immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation.

15 For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology 121, 210 (1986).

(vi) *Heteroconjugate antibodies*

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. 20 Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (PCT application publication Nos. WO 91/00360 and WO 92/200373; EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross- 25 linking agents are well known in the art, and are disclosed in U.S. Patent No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

(vii) *Antibody fragments*

In certain embodiments, the neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibody (including murine, 30 human and humanized antibodies, and antibody variants) is an antibody fragment. Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, e.g., Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-117 [1992] and Brennan *et al.*,

WO 02/066649

PCT/US02/02709

*Science* 229:81 [1985]). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells (reviewed in Hudson, *Curr. Opin. Immunol.* 11: 548-557 [1999]; Little *et al.*, *Immunol. Today* 21: 364-370 [2000]). For example, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form F(ab')<sub>2</sub> fragments (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 [1992]). In another embodiment, the F(ab')<sub>2</sub> is formed using the leucine zipper GCN4 to promote assembly of the F(ab')<sub>2</sub> molecule. According to another approach, Fv, Fab or F(ab')<sub>2</sub> fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner.

10

(viii) *Amino acid sequence variants of antibodies*

Amino acid sequence modification(s) of the anti-IFN- $\alpha$  antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of the anti-IFN- $\alpha$  antibodies are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the nucleic acid encoding the anti-IFN- $\alpha$  antibody chains, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the anti-IFN- $\alpha$  antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the anti-IFN- $\alpha$  antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites.

A useful method for identification of certain residues or regions of the neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis," as described by Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Here, a residue or group of target residues are identified (e.g., charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with the antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example,

WO 02/066649

PCT/US02/02709

to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed anti-IFN- $\alpha$  antibody variants are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions 5 ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intra-sequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an anti-IFN- $\alpha$  neutralizing antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to an epitope tag. Other insertional variants of the anti-IFN- $\alpha$  antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody of 10 an enzyme or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at 15 least one amino acid residue in the neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibody molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitution mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 1 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 1, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

20

**Table 1**

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn

Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
- 10 (3) acidic: asp, glu;
- (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibody also may be substituted, generally with serine, to improve 5 the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant crosslinking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as a Fv fragment).

A particularly preferred type of substitution variant involves substituting one or 10 more hypervariable region residues of a parent antibody (e.g. a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitution variants is affinity maturation 15 using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (e.g. 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (e.g. antagonist activity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues 20 contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or in addition, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and IFN- $\alpha$ . Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein 25 and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

(ix) *Glycosylation Variants*

Antibodies are glycosylated at conserved positions in their constant regions (Jefferis 30 and Lund, *Chem. Immunol.* 65:111-128 [1997]; Wright and Morrison, *Trends Biotechnol.* 15:26-32 [1997]). The oligosaccharide side chains of the immunoglobulins affect the protein's function (Boyd *et al.*, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318 [1996]; Wittwe and Howard, *Biochem.* 29:4175-4180 [1990]), and the intramolecular interaction between portions of the

WO 02/066649

PCT/US02/02709

glycoprotein which can affect the conformation and presented three-dimensional surface of the glycoprotein (Jefferis and Lund, *supra*; Wyss and Wagner, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416 [1996]). Oligosaccharides may also serve to target a given glycoprotein to certain molecules based upon specific recognition structures. For example, it has been 5 reported that in agalactosylated IgG, the oligosaccharide moiety 'flips' out of the inter-CH<sub>2</sub> space and terminal N-acetylglucosamine residues become available to bind mannose binding protein (Malhotra *et al.*, *Nature Med.* 1:237-243 [1995]). Removal by glycopeptidase of the oligosaccharides from CAMPATH-1H (a recombinant humanized murine monoclonal IgG1 antibody which recognizes the CDw52 antigen of human 10 lymphocytes) produced in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells resulted in a complete reduction in complement mediated lysis (CMCL) (Boyd *et al.*, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318 [1996]), while selective removal of sialic acid residues using neuraminidase resulted in no loss of DMCL. Glycosylation of antibodies has also been reported to affect antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In particular, CHO cells with tetracycline- 15 regulated expression of  $\beta$ (1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII), a glycosyltransferase catalyzing formation of bisecting GlcNAc, was reported to have improved ADCC activity (Umana *et al.*, *Mature Biotech.* 17:176-180 [1999]).

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. 20 The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, 25 or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Glycosylation variants of antibodies are variants in which the glycosylation pattern of an antibody is altered. By altering is meant deleting one or more carbohydrate moieties found in the antibody, adding one or more carbohydrate moieties to the antibody, changing 30 the composition of glycosylation (glycosylation pattern), the extent of glycosylation, etc.

Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by

WO 02/066649

PCT/US02/02709

the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites). Similarly, removal of glycosylation sites can be accomplished by amino acid alteration within the native glycosylation sites of the antibody.

- 5 The amino acid sequence is usually altered by altering the underlying nucleic acid sequence. Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the anti-IFN- $\alpha$  antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) 10 mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the anti-IFN- $\alpha$  antibody.

The glycosylation (including glycosylation pattern) of antibodies may also be altered without altering the amino acid sequence or the underlying nucleotide sequence. Glycosylation largely depends on the host cell used to express the antibody. Since the cell 15 type used for expression of recombinant glycoproteins, e.g. antibodies, as potential therapeutics is rarely the native cell, significant variations in the glycosylation pattern of the antibodies can be expected (see, e.g. Hse *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070 [1997]). In addition to the choice of host cells, factors which affect glycosylation during recombinant 20 production of antibodies include growth mode, media formulation, culture density, oxygenation, pH, purification schemes and the like. Various methods have been proposed to alter the glycosylation pattern achieved in a particular host organism including introducing or overexpressing certain enzymes involved in oligosaccharide production (U. S. Patent Nos. 5,047,335; 5,510,261 and 5,278,299). Glycosylation, or certain types of glycosylation, can be enzymatically removed from the glycoprotein, for example using 25 endoglycosidase H (Endo H). In addition, the recombinant host cell can be genetically engineered, e.g. make defective in processing certain types of polysaccharides. These and similar techniques are well known in the art.

The glycosylation structure of antibodies can be readily analyzed by conventional 30 techniques of carbohydrate analysis, including lectin chromatography, NMR, Mass spectrometry, HPLC, GPC, monosaccharide compositional analysis, sequential enzymatic digestion, and HPAEC-PAD, which uses high pH anion exchange chromatography to separate oligosaccharides based on charge. Methods for releasing oligosaccharides for analytical purposes are also known, and include, without limitation, enzymatic treatment

WO 02/066649

PCT/US02/02709

(commonly performed using peptide-N-glycosidase F/endo- $\beta$ -galactosidase), elimination using harsh alkaline environment to release mainly O-linked structures, and chemical methods using anhydrous hydrazine to release both N- and O-linked oligosaccharides.

5 (x) *Other modifications of antibodies*

The neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 10 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of 15 defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982) via a disulfide interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

20 The antibody of the present invention may also be used in ADEPT by conjugating the antibody to a prodrug-activating enzyme which converts a prodrug (e.g., a peptidyl chemotherapeutic agent, see WO81/01145) to an active drug. See, for example, WO 88/07378 and U.S. Patent No. 4,975,278.

25 The enzyme component of the immunoconjugate useful for ADEPT includes any enzyme capable of acting on a prodrug in such a way so as to convert it into its more active form exhibiting the desired biological properties.

Enzymes that are useful in the method of this invention include, but are not limited to, alkaline phosphatase useful for converting phosphate-containing prodrugs into free drugs; arylsulfatase useful for converting sulfate-containing prodrugs into free drugs; 30 cytosine deaminase useful for converting non-toxic 5-fluorocytosine into the anti-cancer drug, 5-fluorouracil; proteases, such as serratia protease, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidases and cathepsins (such as cathepsins B and L), that are useful for converting peptide-containing prodrugs into free drugs; D-alanylcarboxypeptidases, useful

WO 02/066649

PCT/US02/02709

for converting prodrugs that contain D-amino acid substituents; carbohydrate-cleaving enzymes such as  $\beta$ -galactosidase and neuraminidase useful for converting glycosylated prodrugs into free drugs;  $\beta$ -lactamase useful for converting drugs derivatized with  $\beta$ -lactams into free drugs; and penicillin amidases, such as penicillin V amidase or penicillin G amidase, useful for converting drugs derivatized at their amine nitrogens with phenoxyacetyl or phenylacetyl groups, respectively, into free drugs. Alternatively, antibodies with enzymatic activity, also known in the art as "abzymes", can be used to convert the prodrugs of the invention into free active drugs (see, e.g., Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Antibody-abzyme conjugates can be prepared as described herein for delivery of the abzyme to a desired cell population.

10 The enzymes can be covalently bound to the neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibodies by techniques well known in the art such as the use of the heterobifunctional crosslinking reagents discussed above. Alternatively, fusion proteins comprising at least the antigen binding region of an antibody of the invention linked to at least a functionally active portion 15 of an enzyme of the invention can be constructed using recombinant DNA techniques well known in the art (see, e.g., Neuberger *et al.*, *Nature* 312:604-608 [1984]).

20 In certain embodiments of the invention, it may be desirable to use an antibody fragment, rather than an intact antibody. In this case, it may be desirable to modify the antibody fragment in order to increase its serum half-life. This may be achieved, for example, by incorporation of a salvage receptor binding epitope into the antibody fragment (e.g., by mutation of the appropriate region in the antibody fragment or by incorporating the epitope into a peptide tag that is then fused to the antibody fragment at either end or in the middle, e.g., by DNA or peptide synthesis). See WO96/32478 published October 17, 1996.

25 The salvage receptor binding epitope generally constitutes a region wherein any one or more amino acid residues from one or two loops of a Fc domain are transferred to an analogous position of the antibody fragment. Even more preferably, three or more residues from one or two loops of the Fc domain are transferred. Still more preferred, the epitope is taken from the CH2 domain of the Fc region (e.g., of an IgG) and transferred to the CH1, 30 CH3, or V<sub>H</sub> region, or more than one such region, of the antibody. Alternatively, the epitope is taken from the CH2 domain of the Fc region and transferred to the C<sub>L</sub> region or V<sub>L</sub> region, or both, of the antibody fragment.

Covalent modifications of the neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibodies are also included within the scope of this invention. They may be made by chemical synthesis or by

WO 02/066649

PCT/US02/02709

enzymatic or chemical cleavage of the antibody, if applicable. Other types of covalent modifications of the antibody are introduced into the molecule by reacting targeted amino acid residues of the antibody with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues. Exemplary covalent 5 modifications of polypeptides are described in US Patent 5,534,615, specifically incorporated herein by reference. A preferred type of covalent modification of the antibody comprises linking the antibody to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol, polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

10

2. Screening for antibodies with the desired properties

Techniques for generating antibodies have been described above. Anti-IFN- $\alpha$  antibodies with the desired, broad range neutralizing properties can then be identified by methods known in the art.

15

(i) *Binding Assays*

Thus, for example, the neutralizing anti-IFN- $\alpha$  antibodies of the present invention can be identified in IFN- $\alpha$  binding assays, by incubating a candidate antibody with one or more individual IFN- $\alpha$  subtypes, or an array or mixture of various IFN- $\alpha$  subtypes, and monitoring binding and neutralization of a biological activity of IFN- $\alpha$ . The binding assay 20 may be performed with purified IFN- $\alpha$  polypeptide(s). In one embodiment, the binding assay is a competitive binding assay, where the ability of a candidate antibody to compete with a known anti-IFN- $\alpha$  antibody for IFN- $\alpha$  binding is evaluated. The assay may be performed in various formats, including the ELISA format, also illustrated in the Examples below. IFN- $\alpha$  binding of a candidate antibody may also be monitored in a BIAcore<sup>TM</sup> 25 Biosensor assay, as described below.

Any suitable competition binding assay known in the art can be used to characterize the ability of a candidate anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibody to compete with murine anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody 9F3 for binding to a particular IFN- $\alpha$  species. A routine competition assay is described in *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring 30 Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). In another embodiment, the IFN- $\alpha$ -binding ELISA assay described in Example 2 below could be modified to employ IFN- $\alpha$  binding competition between a candidate antibody and the 9F3 antibody. Such an assay

WO 02/066649

PCT/US02/02709

could be performed by layering the IFN- $\alpha$  on microtiter plates, incubating the layered plates with serial dilutions of unlabeled anti-IFN- $\alpha$  antibody or unlabeled control antibody admixed with a selected concentration of labeled 9F3 antibody, detecting and measuring the signal from the 9F3 antibody label, and then comparing the signal measurements exhibited 5 by the various dilutions of antibody.

(ii) *Antiviral Assays*

The ability of a candidate antibody to neutralize a biological activity of IFN- $\alpha$  can, for example, be carried out by monitoring the neutralization of the antiviral activity of IFN- $\alpha$  as described by Kawade, *J. Interferon Res.* 1:61-70 (1980), or Kawade and Watanabe, *J. Interferon Res.* 4:571-584 (1984). Briefly, a fixed concentration of IFN- $\alpha$  premixed with various dilutions of a candidate antibody is added to human amnion-derived FL cells, and the ability of the candidate antibody to neutralize the antiviral activity of IFN- $\alpha$  is determined, using an appropriate virus, e.g. Sindbis virus. The titers are expressed in 10 international units (IU), as determined with the international reference human IFN- $\alpha$  (NIH 15 Ga23-901-527).

The candidate anti-IFN- $\alpha$  antibody is considered able to inhibit the anti-viral activity of a selected IFN- $\alpha$  subtype if a certain concentration of the antibody inhibits more anti-viral activity than the baseline level of anti-viral activity inhibition measured in the 20 presence of an equivalent concentration of control antibody. Optionally, the certain concentration of the candidate anti-IFN- $\alpha$  antibody will inhibit at least or about 60%, or at least or about 70%, preferably at least or about 75%, or more preferably at least or about 80%, or even more preferably at least or about 85%, or still more preferably at least or about 90%, or still more preferably at least or about 95%, or most preferably at least or 25 about 99% of the anti-viral activity of the selected IFN- $\alpha$  subtype in the anti-viral activity assay as compared to baseline activity measured in the presence of an equivalent concentration of control antibody. The candidate anti-IFN- $\alpha$  antibody is considered unable to inhibit the anti-viral activity of a selected IFN- $\alpha$  subtype if there is no concentration of the antibody that exhibits more anti-viral activity inhibition than the baseline level of anti-viral activity inhibition measured in the presence of an equivalent concentration of control 30 antibody.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

In a preferred embodiment, each interferon species used in the viral infectivity assay is titrated to a concentration that provides the same level of inhibition of viral growth as that induced by a preselected number of units of an IFN- $\alpha$  standard. This concentration serves to provide the normalized units of the subject interferon species. In order to assess 5 the ability of an anti-IFN- $\alpha$  antibody to inhibit the anti-viral activity of various IFN- $\alpha$  subtypes, the effective concentration (EC50) of anti-IFN- $\alpha$  antibody for inhibiting 50% of a particular IFN- $\alpha$  subtype's anti-viral activity (at the concentration titrated to provide the normalized units of activity) is determined for each IFN- $\alpha$  subtype to be tested.

In one embodiment, the antiviral activity neutralization assay is performed as 10 described in Example 1 below. Briefly, A549 cells are grown to a density of  $5 \times 10^5$  A549 cells/well on 96-well microtiter plates. Serial dilutions of candidate anti-IFN- $\alpha$  antibody are incubated with 0.2 units/:1 of a selected IFN- $\alpha$  subtype (normalized to 0.2 units/:1 of NIH reference standard recombinant human IFN- $\alpha$ 2) in a total volume of 100 :1 at 37EC for one hour. Each 100 :1 volume of antibody/interferon incubation mixture is then added to 15  $5 \times 10^5$  A549 cells and 100 :1 of culture medium in an individual well on the microtiter plate, yielding a final IFN- $\alpha$  concentration of 100 units/ml in each well. The resulting cell culture mixtures are incubated for 24 hours at 37EC. Cells are then challenged with  $2 \times 10^3$  pfu of encephalomyocarditis (EMC) virus and incubated for an additional 24 hours at 37EC. At the end of the incubation, cell viability is determined by visual microscopic examination or 20 crystal violet staining. The effective concentration (EC50) of a candidate IFN- $\alpha$  antibody for inhibiting 50% of a particular IFN- $\alpha$  subtype's anti-viral activity in the assay is determined for each IFN- $\alpha$  subtype to be tested.

In one aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that exhibits anti-viral 25 activity neutralization against the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 of up to or about 20 :g/ml, or up to or about 10 :g/ml, or up to or about 5 :g/ml, or up to or about 4 :g/ml, or up to or about 3 :g/ml, or up to or about 2 :g/ml, or up to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that exhibits anti-viral 30 activity neutralization against the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 0.1 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 0.1 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 0.1 :g/ml to or about 5 :g/ml, or from or about 0.1 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or

WO 02/066649

PCT/US02/02709

about 0.1 :g/ml to or about 3 :g/ml, from or about 0.1 :g/ml to or about 2 :g/ml, or from or about 0.1 :g/ml to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that anti-viral activity neutralization against the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 0.2 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 0.2 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 0.2 :g/ml to or about 5 :g/ml, or from or about 0.2 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or about 0.2 :g/ml to or about 3 :g/ml, from or about 0.2 :g/ml to or about 2 :g/ml, or from or about 0.2 :g/ml to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that neutralizes the anti-viral activity of the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 0.3 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 0.3 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 0.3 :g/ml to or about 5 :g/ml, or from or about 0.3 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or about 0.3 :g/ml to or about 3 :g/ml, from or about 0.3 :g/ml to or about 2 :g/ml, or from or about 0.3 :g/ml to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that neutralizes the anti-viral activity of the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 0.4 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 0.4 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 0.4 :g/ml to or about 5 :g/ml, or from or about 0.4 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or about 0.4 :g/ml to or about 3 :g/ml, from or about 0.4 :g/ml to or about 2 :g/ml, or from or about 0.4 :g/ml to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that neutralizes the anti-viral activity of the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 0.5 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 0.5 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 0.5 :g/ml to or about 5 :g/ml, or from or about 0.5 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or about 0.5 :g/ml to or about 3 :g/ml, from or about 0.5 :g/ml to or about 2 :g/ml, or from or about 0.5 :g/ml to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that neutralizes the anti-viral activity of the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 0.6 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 0.6 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 0.6 :g/ml to or about 5 :g/ml, or from or about 0.6 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or about 0.6 :g/ml to or about 3 :g/ml, from or about 0.6 :g/ml to or about 2 :g/ml, or from or about 0.6 :g/ml to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

5 In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that neutralizes the anti-viral activity of the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 0.7 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 0.7 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 0.7 :g/ml to or about 5 :g/ml, or from or about 0.7 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or about 0.7 :g/ml to or about 3 :g/ml, from or about 0.7 :g/ml to or about 2 :g/ml, or from or about 0.7 :g/ml to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

10 15 In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that neutralizes the anti-viral activity of the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 0.8 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 0.8 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 0.8 :g/ml to or about 5 :g/ml, or from or about 0.8 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or about 0.8 :g/ml to or about 3 :g/ml, from or about 0.8 :g/ml to or about 2 :g/ml, or from or about 0.8 :g/ml to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

20 25 In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that neutralizes the anti-viral activity of the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 0.9 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 0.9 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 0.9 :g/ml to or about 5 :g/ml, or from or about 0.9 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or about 0.9 :g/ml to or about 3 :g/ml, from or about 0.9 :g/ml to or about 2 :g/ml, or from or about 0.9 :g/ml to or about 1 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

30 In another aspect of the invention, the anti-IFN- $\alpha$  antibody that neutralizes the anti-viral activity of the subject IFN- $\alpha$  subtypes will exhibit an EC50 from or about 1 :g/ml to or about 20 :g/ml, from or about 1 :g/ml to or about 10 :g/ml, from or about 1 :g/ml to or

WO 02/066649

PCT/US02/02709

about 5 :g/ml, or from or about 1 :g/ml to or about 4 :g/ml, from or about 1 :g/ml to or about 3 :g/ml, or from or about 1 :g/ml to or about 2 :g/ml with respect to each of the subject IFN- $\alpha$  subtypes in the A549 cell EMC viral inhibition assay described above.

5        *(iii) Cross-blocking Assays*

To screen for antibodies which bind to an epitope on IFN- $\alpha$  bound by an antibody of interest, a routine cross-blocking assay such as that described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be performed. Alternatively, or additionally, epitope mapping can be performed by methods 10 known in the art. For example, the IFN- $\alpha$  epitope bound by a monoclonal antibody of the present invention can be determined by competitive binding analysis as described in Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550 -1558 (1990). In another example, cross-blocking studies can be done with direct fluorescence on microtiter plates. In this method, the monoclonal antibody of interest is conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), using established 15 procedures (Wofsy *et al. Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel and Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). The selected IFN- $\alpha$  is layered onto the wells of microtiter plates, the layered wells are incubated with mixtures of (1) FITC-labeled monoclonal antibody of interest and (2) unlabeled test monoclonal antibody, and the fluorescence in each well is quantitated to determine the level of cross-blocking 20 exhibited by the antibodies. Monoclonal antibodies are considered to share an epitope if each blocks binding of the other by 50% or greater in comparison to an irrelevant monoclonal antibody control.

The results obtained in the cell-based biological assays can then be followed by testing in animal, e.g. murine, models, and human clinical trials. If desired, murine 25 monoclonal antibodies identified as having the desired properties can be converted into chimeric antibodies, or humanized by techniques well known in the art, including the "gene conversion mutagenesis" strategy, as described in U.S. Patent No. 5,821,337, the entire disclosure of which is hereby expressly incorporated by reference. Humanization of a particular anti-IFN- $\alpha$  antibody herein is also described in the Examples below.

30

*(iv) Phage Display Method*

Anti-IFN- $\alpha$  antibodies of the invention can be identified by using combinatorial libraries to screen for synthetic antibody clones with the desired activity or activities. In principle, synthetic antibody clones are selected by screening phage libraries containing 5 phage that display various fragments (e.g. Fab, F(ab')<sub>2</sub>, etc.) of antibody variable region (Fv) fused to phage coat protein. Such phage libraries are panned by affinity chromatography against the desired antigen. Clones expressing Fv fragments capable of binding to the desired antigen are adsorbed to the antigen and thus separated from the non-binding clones in the library. The binding clones are then eluted from the antigen, and can 10 be further enriched by additional cycles of antigen adsorption/elution. Any of the anti-IFN- $\alpha$  antibodies of the invention can be obtained by designing a suitable antigen screening procedure to select for the phage clone of interest followed by construction of a full length anti-IFN- $\alpha$  antibody clone using the Fv sequences from the phage clone of interest and suitable constant region (Fc) sequences described in Kabat *et al.* (1991), *supra*.

15

**Construction of phage display libraries**

The antigen-binding domain of an antibody is formed from two variable (V) regions of about 110 amino acids each, from the light (VL) and heavy (VH) chains, that both 20 present three hypervariable loops or complementarity-determining regions (CDRs). Variable domains can be displayed functionally on phage, either as single-chain Fv (scFv) fragments, in which VH and VL are covalently linked through a short, flexible peptide, or as D(ab')<sub>2</sub> fragments, in which they are each fused to a constant domain and interact non-covalently, as described in Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). As 25 used herein, scFv encoding phage clones and Fab or F(ab')<sub>2</sub> encoding phage clones are collectively referred to as "Fv phage clones" or "Fv clones".

The naive repertoire of an animal (the repertoire before antigen challenge) provides it with antibodies that can bind with moderate affinity ( $K_d^{-1}$  of about  $10^6$  to  $10^7$  M<sup>-1</sup>) to essentially any non-self molecule. The sequence diversity of antibody binding sites is not 30 encoded directly in the germline but is assembled in a combinatorial manner from V gene segments. In human heavy chains, the first two hypervariable loops (H1 and H2) are drawn from less than 50 VH gene segments, which are combined with D segments and JH segments to create the third hypervariable loop (H3). In human light chains, the first two

WO 02/066649

PCT/US02/02709

hypervariable loops (L1 and L2) and much of the third (L3) are drawn from less than approximately 30 V8 and less than approximately 30 V6 segments to complete the third hypervariable loop (L3).

Each combinatorial rearrangement of V-gene segments in stem cells gives rise to a 5 B cell that expresses a single VH-VL combination. Immunizations triggers any B cells making a combination that binds the immunogen to proliferate (clonal expansion) and to secrete the corresponding antibody. These naive antibodies are then matured to high affinity ( $K_d^{-1}$  of  $10^9\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) by a process of mutagenesis and selection known as affinity maturation. It is after this point that cells are normally removed to prepare hybridomas and 10 generate high-affinity monoclonal antibodies.

At three stages of this process, repertoires of VH and VL genes can be separately cloned by polymerase chain reaction (PCR) and recombined randomly in phage libraries, which can then be searched for antigen-binding clones as described in Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Libraries from immunized sources provide high- 15 affinity antibodies to the immunogen without the requirement of constructing hybridomas. Alternatively, the naive repertoire can be cloned to provide a single source of human antibodies to a wide range of non-self and also self antigens without any immunization as described by Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finally, naive libraries can also be made synthetically by cloning the unarranged V- or VIII-gene segments from stem 20 cells, and using PCR primers containing random sequence to encode the highly variable CDR3 regions and to accomplish rearrangement in vitro as described by Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Phage display mimics the B cell. Filamentous phage is used to display antibody 25 fragments by fusion to the minor coat protein pIII. The antibody fragments can be displayed as single chain Fv fragments, in which VH and VL domains are connected on the same polypeptide chain by a flexible polypeptide spacer, e.g. as described by Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), or as Fab (including  $\text{F}(\text{ab}')_2$ ) fragments, in which one chain is fused to pIII and the other is secreted into the bacterial host cell periplasm where assembly of a Fab-coat protein structure which becomes displayed on the phage surface by 30 displacing some of the wild type coat proteins, e.g. as described in Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991). When antibody fragments are fused to the N-terminus of pIII, the phage is infective. However, if the N-terminal domain of pIII is

WO 02/066649

PCT/US02/02709

excised and fusions made to the second domain, the phage is not infective, and wild type pIII must be provided by helper phage.

The pIII fusion and other proteins of the phage can be encoded entirely within the same phage replicon, or on different replicons. When two replicons are used, the pIII fusion is encoded on a phagemid, a plasmid containing a phage origin of replication. Phagemids can be packaged into phage particles by "rescue" with a helper phage such as M13K07 that provides all the phage proteins, including pIII, but due to a defective origin is itself poorly packaged in competitions with the phagemids as described in Vieira and Messing, *Meth. Enzymol.*, 153: 3-11 (1987). In a preferred method, the phage display system is designed such that the recombinant phage can be grown in host cells under conditions permitting no more than a minor amount of phage particles to display more than one copy of the Fv-coat protein fusion on the surface of the particle as described in Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) and in WO 92/09690 (PCT/US91/09133 published June 11, 1992).

15 In general, nucleic acids encoding antibody gene fragments are obtained from immune cells harvested from humans or animals. If a library biased in favor of anti-IFN- $\alpha$  clones is desired, the subject is immunized with IFN- $\alpha$  to generate an antibody response, and spleen cells and/or circulating B cells other peripheral blood lymphocytes (PBLs) are recovered for library construction. In a preferred embodiment, a human antibody gene 20 fragment library biased in favor of anti-human IFN- $\alpha$  clones is obtained by generating an anti-human IFN- $\alpha$  antibody response in transgenic mice carrying a functional human immunoglobulin gene array (and lacking a functional endogenous antibody production system) such that IFN- $\alpha$  immunization gives rise to B cells producing human-sequence antibodies against IFN- $\alpha$ .

25 In another preferred embodiment, animals are immunized with a mixture of various, preferably all, IFN- $\alpha$  subtypes in order to generate an antibody response that includes B cells producing anti-IFN- $\alpha$  antibodies with broad reactivity against IFN- $\alpha$  subtypes. In another preferred embodiment, animals are immunized with the mixture of human IFN- $\alpha$  subtypes that is present in the human lymphoblastoid interferons secreted by Burkitt 30 lymphoma cells (Namalva cells) induced with Sendai virus, as described in Example 1 below. A suitable preparation of such human lymphoblastoid interferons can be obtained commercially (Product No. I-9887) from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

Additional enrichment for anti-IFN- $\alpha$  reactive cell populations can be obtained by using a suitable screening procedure to isolate B cells expressing IFN- $\alpha$ -specific membrane bound antibody, e.g., by cell separation with IFN- $\alpha$  affinity chromatography or adsorption of cells to fluorochrome-labeled IFN- $\alpha$  followed by fluorescence-activated cell sorting 5 (FACS).

Alternatively, the use of spleen cells and/or B cells or other PBLs from an unimmunized donor provides a better representation of the possible antibody repertoire, and also permits the construction of an antibody library using any animal (human or non-human) species in which IFN- $\alpha$  is not antigenic. For libraries incorporating *in vitro* 10 antibody gene construction, stem cells are harvested from the subject to provide nucleic acids encoding unarranged antibody gene segments. The immune cells of interest can be obtained from a variety of animal species, such as human, mouse, rat, lagomorpha, luprine, canine, feline, porcine, bovine, equine, and avian species, etc.

Nucleic acid encoding antibody variable gene segments (including VH and VL 15 segments) are recovered from the cells of interest and amplified. In the case of rearranged VH and VL gene libraries, the desired DNA can be obtained by isolating genomic DNA or mRNA from lymphocytes followed by polymerase chain reaction (PCR) with primers matching the 5' and 3' ends of rearranged VH and VL genes as described in Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), thereby making diverse V gene 20 repertoires for expression. The V genes can be amplified from cDNA and genomic DNA, with back primers at the 5' end of the exon encoding the mature V-domain and forward primers based within the J-segment as described in Orlandi *et al.* (1989) and in Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). However, for amplifying from cDNA, back primers can 25 also be based in the leader exon as described in Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), and forward primers within the constant region as described in Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). To maximize complementarity, degeneracy can 30 be incorporated in the primers as described in Orlandi *et al.* (1989) or Sastry *et al.* (1989). Preferably, the library diversity is maximized by using PCR primers targeted to each V- gene family in order to amplify all available VH and VL arrangements present in the immune cell nucleic acid sample, e.g. as described in the method of Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) or as described in the method of Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). For cloning of the amplified DNA into expression vectors,

WO 02/066649

PCT/US02/02709

rare restriction sites can be introduced within the PCR primer as a tag at one end as described in Orlandi *et al.* (1989), or by further PCR amplification with a tagged primer as described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Repertoires of synthetically rearranged V genes can be derived *in vitro* from V gene segments. Most of the human VH-gene segments have been cloned and sequenced (reported in Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), and mapped (reported in Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); these cloned segments (including all the major conformations of the H1 and H2 loop) can be used to generate diverse VH gene repertoires with PCR primers encoding H3 loops of diverse sequence and length as described in Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). VH repertoires can also be made with all the sequence diversity focussed in a long H3 loop of a single length as described in Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Human V6 and V8 segments have been cloned and sequenced (reported in Williams and Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) and can be used to make synthetic light chain repertoires. Synthetic V gene repertoires, based on a range of VH and VL folds, and L3 and H3 lengths, will encode antibodies of considerable structural diversity. Following amplification of V-gene encoding DNAs, germline V-gene segments can be rearranged *in vitro* according to the methods of Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Repertoires of antibody fragments can be constructed by combining VH and VL gene repertoires together in several ways. Each repertoire can be created in different vectors, and the vectors recombined *in vitro*, e.g., as described in Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), or *in vivo* by combinatorial infection, e.g., the loxP system described in Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). The *in vivo* recombination approach exploits the two-chain nature of Fab fragments to overcome the limit on library size imposed by *E. coli* transformation efficiency. Naive VH and VL repertoires are cloned separately, one into a phagemid and the other into a phage vector. The two libraries are then combined by phage infection of phagemid-containing bacteria so that each cell contains a different combination and the library size is limited only by the number of cells present (about  $10^{12}$  clones). Both vectors contain *in vivo* recombination signals so that the VH and VL genes are recombined onto a single replicon and are co-packaged into phage virions. These huge libraries provide large numbers of diverse antibodies of good affinity ( $K_d^{-1}$  of about  $10^8$  M).

WO 02/066649

PCT/US02/02709

Alternatively, the repertoires may be cloned sequentially into the same vector, e.g. as described in Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), or assembled together by PCR and then cloned, e.g. as described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). PCR assembly can also be used to join VH and VL DNAs with DNA 5 encoding a flexible peptide spacer to form single chain Fv (scFv) repertoires. In yet another technique, "in cell PCR assembly" is used to combine VH and VL genes within lymphocytes by PCR and then clone repertoires of linked genes as described in Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

The antibodies produced by naive libraries (either natural or synthetic) can be of 10 moderate affinity ( $K_d^{-1}$  of about  $10^6$  to  $10^7$  M $^{-1}$ ), but affinity maturation can also be mimicked *in vitro* by constructing and reselecting from secondary libraries as described in Winter *et al.* (1994), *supra*. For example, mutation can be introduced at random *in vitro* by using error-prone polymerase (reported in Leung *et al.*, *Technique*, 1: 11-15 (1989)) in the method of Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) or in the method of Gram 15 *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Additionally, affinity maturation can be performed by randomly mutating one or more CDRs, e.g. using PCR with primers carrying random sequence spanning the CDR of interest, in selected individual Fv clones and screening for higher affinity clones. WO 9607754 (published 14 March 1996) described a method for inducing mutagenesis in a complementarity determining region of 20 an immunoglobulin light chain to create a library of light chain genes. Another effective approach is to recombine the VH or VL domains selected by phage display with repertoires of naturally occurring V domain variants obtained from unimmunized donors and screen for higher affinity in several rounds of chain reshuffling as described in Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). This technique allows the production of antibodies and 25 antibody fragments with affinities in the  $10^9$  M range.

Panning Phage Display Libraries for Anti-IFN- $\alpha$  Clones

a. Synthesis of IFN- $\alpha$

Nucleic acid sequence encoding the IFN- $\alpha$  subtypes used herein can be designed 30 using published amino acid and nucleic acid sequences of interferons, e.g. see the *J. Interferon Res.*, 13: 443-444 (1993) compilation of references containing genomic and cDNA sequences for various type I interferons, and the references cited therein. For the IFN- $\alpha$ A (IFN- $\alpha$ 2), IFN- $\alpha$ B (IFN- $\alpha$ 8), IFN- $\alpha$ C (IFN- $\alpha$ 10), IFN- $\alpha$ D (IFN- $\alpha$ 1), IFN- $\alpha$ E (IFN-

WO 02/066649

PCT/US02/02709

$\alpha$ 22), IFN- $\alpha$ F (IFN- $\alpha$ 21), IFN- $\alpha$ G (IFN- $\alpha$ 5), and IFN- $\alpha$ H (IFN- $\alpha$ 14) amino acid sequences or cDNA sequences, see Figs. 3 and 4 on pages 23-24 of Goeddel *et al.*, *Nature*, 290: 20-26 (1981). For cDNA encoding the amino acid sequence of IFN- $\alpha$ 7 (IFN- $\alpha$ J), see Cohen *et al.*, *Dev. Biol. Standard*, 60: 111-122 (1985). DNAs encoding the interferons of interest can be 5 prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, chemical synthesis by any of the methods described in Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989), such as the triester, phosphite, phosphoramidite and H-phosphonate methods. In one embodiment, codons preferred by the expression host cell are used in the design of the interferon-encoding DNA. Alternatively, DNA encoding 10 the interferon can be isolated from a genomic or cDNA library.

Following construction of the DNA molecule encoding the interferon of interest, the DNA molecule is operably linked to an expression control sequence in an expression vector, such as a plasmid, wherein the control sequence is recognized by a host cell transformed with the vector. In general, plasmid vectors contain replication and control 15 sequences which are derived from species compatible with the host cell. The vector ordinarily carries a replication site, as well as sequences which encode proteins that are capable of providing phenotypic selection in transformed cells.

For expression in prokaryotic hosts, suitable vectors include pBR322 (ATCC No. 37,017), phGH107 (ATCC No. 40,011), pBO475, pS0132, pRIT5, any vector in the 20 pRIT20 or pRIT30 series (Nilsson and Abrahmsen, *Meth. Enzymol.*, 185: 144-161 (1990)), pRIT2T, pKK233-2, pDR540 and pPL-lambda. Prokaryotic host cells containing the expression vectors suitable for use herein include *E. coli* K12 strain 294 (ATCC NO. 31446), *E. coli* strain JM101 (Messing *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 9: 309 (1981)), *E. coli* strain B, *E. coli* strain  $\Delta$ 1776 (ATCC No. 31537), *E. coli* c600 (Appleyard, *Genetics*, 39: 440 25 (1954)), *E. coli* W3110 (F-, gamma-, prototrophic, ATCC No. 27325), *E. coli* strain 27C7 (W3110, *tonA*, *phoA* *E15*, (*argF-lac*)169, *ptr3*, *degP41*, *ompT*, *kan*<sup>r</sup>) (U.S. Patent No. 5,288,931, ATCC No. 55,244), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, and *Pseudomonas* species.

In addition to prokaryotes, eukaryotic organisms, such as yeasts, or cells derived 30 from multicellular organisms can be used as host cells. For expression in yeast host cells, such as common baker's yeast or *Saccharomyces cerevisiae*, suitable vectors include episomally replicating vectors based on the 2-micron plasmid, integration vectors, and yeast artificial chromosome (YAC) vectors. For expression in insect host cells, such as Sf9 cells,

WO 02/066649

PCT/US02/02709

suitable vectors include baculoviral vectors. For expression in plant host cells, particularly dicotyledonous plant hosts, such as tobacco, suitable expression vectors include vectors derived from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*.

However, interest has been greatest in vertebrate host cells. Examples of useful 5 mammalian host cells include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36: 59 (1977)); baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green 10 monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 15 cells (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383: 44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma cell line (Hep G2). For expression in mammalian host cells, useful vectors include vectors derived from SV40, vectors derived from cytomegalovirus such as the pRK vectors, including pRK5 and pRK7 (Suva *et al.*, *Science*, 237: 893-896 (1987), EP 307,247 (3/15/89), EP 278,776 (8/17/88)) vectors derived from vaccinia viruses or other 20 pox viruses, and retroviral vectors such as vectors derived from Moloney's murine leukemia virus (MoMLV).

Optionally, the DNA encoding the interferon of interest is operably linked to a 25 secretory leader sequence resulting in secretion of the expression product by the host cell into the culture medium. Examples of secretory leader sequences include stII, ecotin, lamB, herpes GD, lpp, alkaline phosphatase, invertase, and alpha factor. Also suitable for use herein is the 36 amino acid leader sequence of protein A (Abrahmsen *et al.*, *EMBO J.*, 4: 3901 (1985)).

Host cells are transfected and preferably transformed with the above-described 30 expression or cloning vectors of this invention and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

Transfection refers to the taking up of an expression vector by a host cell whether or not any coding sequences are in fact expressed. Numerous methods of transfection are

WO 02/066649

PCT/US02/02709

known to the ordinarily skilled artisan, for example, CaPO<sub>4</sub> precipitation and electroporation. Successful transfection is generally recognized when any indication of the operation of this vector occurs within the host cell.

Transformation means introducing DNA into an organism so that the DNA is replicable, either as an extrachromosomal element or by chromosomal integrant. Depending on the host cell used, transformation is done using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in section 1.82 of Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989), is generally used for prokaryotes or other cells that contain substantial cell-wall barriers. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw *et al.*, *Gene*, 23: 315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method described in sections 16.30-16.37 of Sambrook *et al.*, *supra*, is preferred. General aspects of mammalian cell host system transformations have been described by Axel in U.S. 4,399,216 issued 16 August 1983. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) and Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells such as by nuclear injection, electroporation, or by protoplast fusion may also be used.

20 Prokaryotic host cells used to produce the interferon of interest can be cultured as described generally in Sambrook *et al.*, *supra*.

The mammalian host cells used to produce the interferon of interest can be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's 25 Medium ((DMEM), Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in Ham and Wallace, *Meth. Enz.*, 58: 44 (1979), Barnes and Sato, *Anal. Biochem.*, 102: 255 (1980), U.S. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; or 4,560,655; WO 90/03430; WO 87/00195; U.S. Pat. Re. 30,985; or U.S. 5,122,469, the disclosures of all of which are incorporated herein by reference, may be used as culture media for the host cells. 30 Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleosides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as Gentamycin™ drug), trace elements

WO 02/066649

PCT/US02/02709

(defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used 5 with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

The host cells referred to in this disclosure encompass cells in *in vitro* culture as well as cells that are within a host animal.

In an intracellular expression system or periplasmic space secretion system, the 10 recombinantly expressed interferon protein can be recovered from the culture cells by disrupting the host cell membrane/cell wall (e.g. by osmotic shock or solubilizing the host cell membrane in detergent). Alternatively, in an extracellular secretion system, the recombinant protein can be recovered from the culture medium. As a first step, the culture 15 medium or lysate is centrifuged to remove any particulate cell debris. The membrane and soluble protein fractions are then separated. Usually, the interferon is purified from the 20 soluble protein fraction. If the IFN- $\alpha$  is expressed as a membrane bound species, the membrane bound peptide can be recovered from the membrane fraction by solubilization with detergents. The crude peptide extract can then be further purified by suitable procedures such as fractionation on immunoaffinity or ion-exchange columns; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation exchange resin such as DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for example, Sephadex G-75; hydrophobic affinity resins and ligand affinity 25 using interferon receptor immobilized on a matrix.

Many of the human IFN- $\alpha$  used herein can be obtained from commercial sources, 25 e.g. from Sigma (St. Louis, MO), Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA) or ACCURATE Chemical & Scientific Corporation (Westbury, NY).

Standard cloning procedures described in Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) are used to construct plasmids that direct the translocation of the various species of hIFN- $\alpha$  30 into the periplasmic space of *E. coli*. PCR reactions are performed on cDNA clones of the various subspecies of hIFN- $\alpha$  disclosed in Goeddel *et al.*, *Nature* 290: 20-26 (1981) with Nsil and StyI restriction sites added to the primers. These PCR products are then subcloned into the corresponding sites of the expression vector pB0720 described in Cunningham *et*

WO 02/066649

PCT/US02/02709

al., *Science* 243:1330-1336 (1989). The resulting plasmids place production of the hIFN- $\alpha$  subtypes under control of the *E. coli* *phoA* promoter and the heat-stable enterotoxin II signal peptide as described in Chang et al., *Gene* 55: 189-196 (1987). The correct DNA sequence of each gene is confirmed using the United States Biochemical Sequenase Kit version 2.0. Each plasmid is transformed into the *E. coli* strain 27C7 (ATCC # 55244) and grown in 10 liter fermentors as described in Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992). Human hIFNs are purified from *E. coli* paste containing each IFN- $\alpha$  by affinity chromatography. Bacterial cells are lysed, and the lysate is centrifuged at 10,000 x g to remove debris. The supernatant is applied to an immunoaffinity column containing a mouse anti-hIFN- $\alpha$ B antibody (LI-1) that is obtained as described in Stachelin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:1848-1852 (1981). LI-1 is immobilized on controlled pore glass by a modification of the method of Roy et al., *Journal of Chromatography*, 303: 225-228 (1984). The bound interferon is eluted from the column with 0.1 M citrate, pH 3.0, containing 20% (w/v) glycerol. The purified IFN is analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting, and is assayed for bioactivity by the hIFN-induced anti-viral assay as described herein.

Human IFN- $\alpha$ 2/1 hybrid molecule (IFN- $\alpha$ 2<sub>1-62</sub>/ $\alpha$ 4<sub>4-166</sub>) was obtained as described in Rehberg et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 11497-11502 (1992) or Horisberger and Marco, *Pharmac. Ther.*, 66: 507-534 (1995).

20

b. Immobilization of IFN- $\alpha$

The purified IFN- $\alpha$  can be attached to a suitable matrix such as agarose beads, acrylamide beads, glass beads, cellulose, various acrylic copolymers, hydroxyl methacrylate gels, polyacrylic and polymethacrylic copolymers, nylon, neutral and ionic carriers, and the like, for use in the affinity chromatographic separation of phage display clones. Attachment of the IFN- $\alpha$  protein to the matrix can be accomplished by the methods described in *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). A commonly employed technique for attaching protein ligands to polysaccharide matrices, e.g. agarose, dextran or cellulose, involves activation of the carrier with cyanogen halides and subsequent coupling of the peptide 30 ligand's primary aliphatic or aromatic amines to the activated matrix.

Alternatively, IFN- $\alpha$  can be used to coat the wells of adsorption plates, expressed on host cells affixed to adsorption plates or used in cell sorting, or conjugated to biotin for

WO 02/066649

PCT/US02/02709

capture with streptavidin-coated beads, or used in any other art-known method for panning phage display libraries.

c. Panning Procedures

5 The phage library samples are contacted with immobilized IFN- $\alpha$  under conditions suitable for binding of at least a portion of the phage particles with the adsorbent. Normally, the conditions, including pH, ionic strength, temperature and the like are selected to mimic physiological conditions. The phage bound to the solid phase are washed and then eluted by acid, e.g. as described in Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-10 7982 (1991), or by alkali, e.g. as described in Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), or by IFN- $\alpha$  antigen, e.g. in a procedure similar to the antigen competition method of Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Phage can be enriched 20-1,000-fold in a single round of selection. Moreover, the enriched phage can be grown in bacterial culture and subjected to further rounds of selection.

15 In a preferred embodiment, phage are serially incubated with various IFN- $\alpha$  subtypes immobilized in order to identify and further characterize phage clones that exhibit appreciable binding to a majority, preferably all, of IFN- $\alpha$  subtypes. In this method, phage are first incubated with one specific IFN- $\alpha$  subtype. The phage bound to this subtype are eluted and subjected to selection with another IFN- $\alpha$  subtype. The process of binding and 20 elution is thus repeated with all IFN- $\alpha$  subtypes. At the end, the procedure yields a population of phage displaying antibodies with broad reactivity against all IFN- $\alpha$  subtypes. These phage can then be tested against other IFN species, i.e. other than IFN- $\alpha$ , in order to 25 select those clones which do not show appreciable binding to other species of IFNs. Finally, the selected phage clones can be examined for their ability to neutralize biological activity, e.g. anti-viral activity, of various IFN- $\alpha$  subtypes, and clones representing antibodies with broad neutralization activity against a majority, preferably all, of IFN- $\alpha$  subtypes are finally selected.

The efficiency of selection depends on many factors, including the kinetics of 30 dissociation during washing, and whether multiple antibody fragments on a single phage can simultaneously engage with antigen. Antibodies with fast dissociation kinetics (and weak binding affinities) can be retained by use of short washes, multivalent phage display and high coating density of antigen in solid phase. The high density not only stabilizes the

WO 02/066649

PCT/US02/02709

phage through multivalent interactions, but favors rebinding of phage that has dissociated. The selection of antibodies with slow dissociation kinetics (and good binding affinities) can be promoted by use of long washes and monovalent phage display as described in Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) and in WO 92/09690, and a low coating density of antigen 5 as described in Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

It is possible to select between phage antibodies of different affinities, even with affinities that differ slightly, for IFN- $\alpha$ . However, random mutation of a selected antibody (e.g. as performed in some of the affinity maturation techniques described above) is likely to give rise to many mutants, most binding to antigen, and a few with higher affinity. With 10 limiting IFN- $\alpha$ , rare high affinity phage could be competed out. To retain all the higher affinity mutants, phage can be incubated with excess biotinylated IFN- $\alpha$ , but with the biotinylated IFN- $\alpha$  at a concentration of lower molarity than the target molar affinity constant for IFN- $\alpha$ . The high affinity-binding phage can then be captured by streptavidin-coated paramagnetic beads. Such "equilibrium capture" allows the antibodies to be selected 15 according to their affinities of binding, with sensitivity that permits isolation of mutant clones with as little as two-fold higher affinity from a great excess of phage with lower affinity. Conditions used in washing phage bound to a solid phase can also be manipulated to discriminate on the basis of dissociation kinetics.

In one embodiment, phage are serially incubated with various IFN- $\alpha$  subtypes 20 immobilized on a solid support, such as chromatographic polymer matrix beads described above. In this method, the phage are first incubated with one specific IFN- $\alpha$  subtype. The phage bound to this subtype are eluted from solid phase with a suitable eluent, such as any salt or acid buffer capable of releasing the bound phage into solution. Next, the eluted 25 phage clones are subjected to selection with another IFN- $\alpha$  subtype. In order to enrich the population for clones that compete with soluble IFNAR2 for binding to IFN- $\alpha$ , the phage clones recovered from the series of IFN- $\alpha$  subtype chromatographic separations are incubated with a complex of immobilized IFNAR2 preadsorbed to IFN- $\alpha$ , and the non-adsorbed phage clones are recovered from the incubation reaction mixture.

The selection procedures can be designed to utilize any suitable batch 30 chromatographic technique. In one embodiment, the phage clones are adsorbed to IFN- $\alpha$ -derivatized polymer matrix beads in suspension, the adsorbed beads are recovered by centrifugation, the recovered beads are resuspended and incubated in a suitable elution

WO 02/066649

PCT/US02/02709

buffer, such as any salt or acid buffer capable of releasing the bound phage into solution, the elution mixture is centrifuged, the eluted phage clones are recovered from the supernatant, and then the adsorption/elution procedure is repeated for every additional IFN- $\alpha$  subtype. In order to enrich the population for clones that compete with soluble IFNAR2 for binding to IFN- $\alpha$ , the phage clones recovered from the IFN- $\alpha$  subtype chromatographic separations are incubated with a suspension of IFNAR2-derivatized polymer matrix beads preadsorbed to IFN- $\alpha$ , the incubation mixture is centrifuged, and the non-adsorbed phage clones are recovered from the supernatant.

In another embodiment, the selection procedure is designed to enrich the phage population for the property of inhibiting IFN- $\alpha$  binding to IFNAR2 during each of the affinity chromatographic separations. In this method, the phage are serially incubated with each of the specific IFN- $\alpha$  subtypes immobilized on a solid support and then eluted from solid phase with an eluent comprising an excess of soluble IFNAR2, such as IFNAR2 ECD-IgG Fc, under conditions wherein soluble IFNAR2 is capable of displacing any phage clone that competes with IFNAR2 for binding to the immobilized IFN- $\alpha$ . The process of binding and elution is thus repeated with each of the specific IFN- $\alpha$  subtypes.

In another embodiment, the phage clones are adsorbed to IFN- $\alpha$ -derivatized polymer matrix beads in suspension, the adsorbed beads are recovered by centrifugation, the recovered beads are resuspended and incubated in a suitable elution buffer comprising an excess of soluble IFNAR2 (such as IFNAR2 ECD-IgG Fc) under conditions wherein the soluble IFNAR2 is capable of displacing any phage clone that competes with IFNAR2 for binding to the immobilized IFN- $\alpha$  and releasing the bound phage into solution, the elution mixture is centrifuged, the eluted phage clones are recovered from the supernatant, and then the adsorption/elution procedure is repeated for every additional IFN- $\alpha$  subtype.

At the end, the procedure yields a population of phage displaying antibodies with IFNAR2-binding inhibition activity against a broad range of IFN- $\alpha$  subtypes. These phage can then be tested against other IFN species (other than IFN- $\alpha$  species), such as IFN- $\beta$ , in order to select those clones which do not show appreciable binding to other species of IFNs. Finally, the selected phage clones can be examined for their ability to neutralize biological activity, e.g. anti-viral activity, of various IFN- $\alpha$  subtypes, and clones representing antibodies with broad neutralization activity against a majority, preferably all, of IFN- $\alpha$  subtypes are finally selected.

Activity Selection of Anti-IFN- $\alpha$  Clones

In one embodiment, the invention provides anti-IFN- $\alpha$  antibodies that bind to as well as neutralize the activity of a majority, preferably all, of IFN- $\alpha$  subtypes, but do not 5 significantly bind to or neutralize the activity of any other interferon species. For example, the ability of various phage clones to neutralize the anti-viral activities of various IFN- $\alpha$  subtypes can be tested, essentially in the same manner as described earlier for the antibodies.

## 10 4. Preparation of soluble IFNAR2-IgG

A cDNA encoding the human immunoglobulin fusion proteins (immunoadhesins) based on the extracellular domain (ECD) of the hIFNAR2 (pRK5 hIFNAR2-IgG clone) can be generated using methods similar to those described by Haak-Frendscho *et al.*, *Immunology* 79: 594-599 (1993) for the construction of a murine IFN- $\gamma$  receptor 15 immunoadhesin. Briefly, the plasmid pRKCD4<sub>2</sub>F<sub>c1</sub> is constructed as described in Example 4 of WO 89/02922 (PCT/US88/03414 published April 6, 1989). The cDNA coding sequence for the first 216 residues of the mature hIFNAR2 ECD is obtained from the published sequence (Novick *et al.*, *Cell*, 77: 391-400 [1994]). The CD4 coding sequence in the pRKCD4<sub>2</sub>F<sub>c1</sub> is replaced with the hIFNAR2 ECD encoding cDNA to form the 20 pRK5hIFNAR2-IgG clone. hIFNAR2-IgG is expressed in human embryonic kidney 293 cells by transient transfection using a calcium phosphate precipitation technique. The immunoadhesin is purified from serum-free cell culture supernatants in a single step by affinity chromatography on a protein A-sepharose column as described in Haak-Frendscho *et al.* (1993), *supra*. Bound hIFNAR2-IgG is eluted with 0.1 M citrate buffer, pH 3.0, 25 containing 20% (w/v) glycerol. The hIFNAR2-IgG purified is over 95% pure, as judged by SDS-PAGE.

5. Diagnostic uses of anti-IFN- $\alpha$  antibodies

The anti-IFN- $\alpha$  antibodies of the invention are unique research reagents in 30 diagnostic assays for IFN- $\alpha$  expression. As discussed earlier, IFN- $\alpha$  expression is increased in certain autoimmune diseases such as IDDM, SLE, and autoimmune thyroiditis. Increased expression of various IFN- $\alpha$  subtypes in such disorders can be detected and quantitated

WO 02/066649

PCT/US02/02709

using anti-IFN- $\alpha$  antibodies of the instant invention with broad reactivity against a majority of IFN- $\alpha$  subtypes. Anti-IFN- $\alpha$  antibodies are also useful for the affinity purification of various IFN- $\alpha$  subtypes from recombinant cell culture or natural sources.

Anti-IFN- $\alpha$  antibodies can be used for the detection of IFN- $\alpha$  in any one of a number of well known diagnostic assay methods. For example, a biological sample may be assayed for IFN- $\alpha$  by obtaining the sample from a desired source, admixing the sample with anti-IFN- $\alpha$  antibody to allow the antibody to form antibody/IFN- $\alpha$  complex with any IFN- $\alpha$  subtype present in the mixture, and detecting any antibody/IFN- $\alpha$  complex present in the mixture. The biological sample may be prepared for assay by methods known in the art which are suitable for the particular sample. The methods of admixing the sample with antibodies and the methods of detecting antibody/IFN- $\alpha$  complex are chosen according to the type of assay used. Such assays include competitive and sandwich assays, and steric inhibition assays. Competitive and sandwich methods employ a phase-separation step as an integral part of the method while steric inhibition assays are conducted in a single reaction mixture.

Analytical methods for IFN- $\alpha$  all use one or more of the following reagents: labeled IFN- $\alpha$  analogue, immobilized IFN- $\alpha$  analogue, labeled anti-IFN- $\alpha$  antibody, immobilized anti-IFN- $\alpha$  antibody and steric conjugates. The labeled reagents also are known as "tracers."

The label used is any detectable functionality that does not interfere with the binding of IFN- $\alpha$  and anti-IFN- $\alpha$  antibody. Numerous labels are known for use in immunoassay, examples including moieties that may be detected directly, such as fluorochrome, chemiluminescent, and radioactive labels, as well as moieties, such as enzymes, that must be reacted or derivatized to be detected. Examples of such labels include the radioisotopes  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , and  $^{131}\text{I}$ , fluorophores such as rare earth chelates or fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, dansyl, umbelliferone, luciferases, e.g., firefly luciferase and bacterial luciferase (U.S. Pat. No. 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydropthalazinediones, horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharide oxidases, e.g., glucose oxidase, galactose oxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase, heterocyclic oxidases such as uricase and xanthine oxidase, coupled with an enzyme that employs hydrogen

WO 02/066649

PCT/US02/02709

peroxide to oxidize a dye precursor such as HRP, lactoperoxidase, or microperoxidase, biotin/avidin, spin labels, bacteriophage labels, stable free radicals, and the like.

Conventional methods are available to bind these labels covalently to proteins or polypeptides. For instance, coupling agents such as dialdehydes, carbodiimides, 5 dimaleimides, bis-imides, bis-diazotized benzidine, and the like may be used to tag the antibodies with the above-described fluorescent, chemiluminescent, and enzyme labels. See, for example, U.S. Pat. Nos. 3,940,475 (fluorimetry) and 3,645,090 (enzymes); Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); and Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 10 30: 407-412 (1982). Preferred labels herein are enzymes such as horseradish peroxidase and alkaline phosphatase.

The conjugation of such label, including the enzymes, to the antibody is a standard manipulative procedure for one of ordinary skill in immunoassay techniques. See, for example, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates 15 for Use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

Immobilization of reagents is required for certain assay methods. Immobilization entails separating the anti-IFN- $\alpha$  antibody from any IFN- $\alpha$  that remains free in solution. This conventionally is accomplished by either insolubilizing the anti-IFN- $\alpha$  antibody or 20 IFN- $\alpha$  analogue before the assay procedure, as by adsorption to a water-insoluble matrix or surface (Bennich *et al.*, U.S. 3,720,760), by covalent coupling (for example, using glutaraldehyde cross-linking), or by insolubilizing the anti-IFN- $\alpha$  antibody or IFN- $\alpha$  analogue afterward, e.g., by immunoprecipitation.

Other assay methods, known as competitive or sandwich assays, are well 25 established and widely used in the commercial diagnostics industry.

Competitive assays rely on the ability of a tracer IFN- $\alpha$  analogue to compete with the test sample IFN- $\alpha$  for a limited number of anti-IFN- $\alpha$  antibody antigen-binding sites. The anti-IFN- $\alpha$  antibody generally is insolubilized before or after the competition and then 30 the tracer and IFN- $\alpha$  bound to the anti-IFN- $\alpha$  antibody are separated from the unbound tracer and IFN- $\alpha$ . This separation is accomplished by decanting (where the binding partner was pre-insolubilized) or by centrifuging (where the binding partner was precipitated after the competitive reaction). The amount of test sample IFN- $\alpha$  is inversely proportional to the

WO 02/066649

PCT/US02/02709

amount of bound tracer as measured by the amount of marker substance. Dose-response curves with known amounts of IFN- $\alpha$  are prepared and compared with the test results to quantitatively determine the amount of IFN- $\alpha$  present in the test sample. These assays are called ELISA systems when enzymes are used as the detectable markers.

5 Another species of competitive assay, called a "homogeneous" assay, does not require a phase separation. Here, a conjugate of an enzyme with the IFN- $\alpha$  is prepared and used such that when anti-IFN- $\alpha$  antibody binds to the IFN- $\alpha$  the presence of the anti-IFN- $\alpha$  antibody modifies the enzyme activity. In this case, the IFN- $\alpha$  or its immunologically active fragments are conjugated with a bifunctional organic bridge to an enzyme such as  
10 peroxidase. Conjugates are selected for use with anti-IFN- $\alpha$  antibody so that binding of the anti-IFN- $\alpha$  antibody inhibits or potentiates the enzyme activity of the label. This method *per se* is widely practiced under the name of EMIT.

Steric conjugates are used in steric hindrance methods for homogeneous assay. These conjugates are synthesized by covalently linking a low-molecular-weight hapten to a  
15 small IFN- $\alpha$  fragment so that antibody to hapten is substantially unable to bind the conjugate at the same time as anti-IFN- $\alpha$  antibody. Under this assay procedure the IFN- $\alpha$  present in the test sample will bind anti-IFN- $\alpha$  antibody, thereby allowing anti-hapten to bind the conjugate, resulting in a change in the character of the conjugate hapten, e.g., a change in fluorescence when the hapten is a fluorophore.

20 Sandwich assays particularly are useful for the determination of IFN- $\alpha$  or anti-IFN- $\alpha$  antibodies. In sequential sandwich assays an immobilized anti-IFN- $\alpha$  antibody is used to adsorb test sample IFN- $\alpha$ , the test sample is removed as by washing, the bound IFN- $\alpha$  is used to adsorb a second, labeled anti-IFN- $\alpha$  antibody and bound material is then separated from residual tracer. The amount of bound tracer is directly proportional to test sample  
25 IFN- $\alpha$ . In "simultaneous" sandwich assays the test sample is not separated before adding the labeled anti-IFN- $\alpha$ . A sequential sandwich assay using an anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibody as one antibody and a polyclonal anti-IFN- $\alpha$  antibody as the other is useful in testing samples for IFN- $\alpha$ .

The foregoing are merely exemplary diagnostic assays for IFN- $\alpha$ . Other methods  
30 now or hereafter developed that use anti-IFN- $\alpha$  antibody for the determination of IFN- $\alpha$  are included within the scope hereof, including the bioassays described above.

6. Therapeutic compositions and administration of anti-IFN- $\alpha$  antibodies

Therapeutic formulations of the anti-IFN- $\alpha$  antibodies of the invention are prepared for storage by mixing antibody having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients, or stabilizers (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition, Alfonso, R., ed, Mack Publishing Co. (Easton, PA: 1995)), in the form of lyophilized cake or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as Tween, Pluronics or polyethylene glycol (PEG).

The anti-IFN- $\alpha$  antibody to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to or following lyophilization and reconstitution. The anti-IFN- $\alpha$  antibody ordinarily will be stored in lyophilized form or in solution.

20 Therapeutic anti-IFN- $\alpha$  antibody compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

25 The route of anti-IFN- $\alpha$  antibody administration is in accord with known methods, e.g. injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, subcutaneous, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebrospinal, or intralesional routes, or by sustained release systems as noted below. Preferably the antibody is given systemically.

30 Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles, e.g. films, or microcapsules. Sustained release matrices include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. 3,773,919, EP 58,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poly (2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) and Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), ethylene vinyl

WO 02/066649

PCT/US02/02709

acetate (Langer *et al.*, *supra*) or poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988). Sustained-release anti-IFNAR2 antibody compositions also include liposomally entrapped antibody. Liposomes containing antibody are prepared by methods known *per se*: DE 3,218,121; Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, 5 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; Japanese patent application 83-118008; U.S. 4,485,045 and 4,544,545; and EP 102,324. Ordinarily the liposomes are of the small (about 200-800 Angstroms) unilamellar type in which the lipid content is greater than about 30 mol. % cholesterol, the selected proportion being adjusted for the optimal antibody therapy.

10 Anti-IFN- $\alpha$  antibody can also be administered by inhalation. Commercially available nebulizers for liquid formulations, including jet nebulizers and ultrasonic nebulizers are useful for administration. Liquid formulations can be directly nebulized and lyophilized powder can be nebulized after reconstitution. Alternatively, anti-IFN- $\alpha$  antibody can be aerosolized using a fluorocarbon formulation and a metered dose inhaler, 15 or inhaled as a lyophilized and milled powder.

An "effective amount" of anti-IFN- $\alpha$  antibody to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic objectives, the route of administration, the type of anti-IFN- $\alpha$  antibody employed, and the condition of the patient. Accordingly, it will be necessary for the therapist to tier the dosage and modify the route of administration as 20 required to obtain the optimal therapeutic effect. Typically, the clinician will administer the anti-IFN- $\alpha$  antibody until a dosage is reached that achieves the desired effect. The progress of this therapy is easily monitored by conventional assays.

The patients to be treated with the anti-IFN- $\alpha$  antibody of the invention include preclinical patients or those with recent onset of immune-mediated disorders, and 25 particularly autoimmune disorders. Patients are candidates for therapy in accord with this invention until such point as no healthy tissue remains to be protected from immune-mediated destruction. For example, a patient suffering from insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) can benefit from therapy with an anti-IFN- $\alpha$  antibody of the invention until the patient's pancreatic islet cells are no longer viable. It is desirable to administer an 30 anti-IFN- $\alpha$  antibody as early as possible in the development of the immune-mediated or autoimmune disorder, and to continue treatment for as long as is necessary for the protection of healthy tissue from destruction by the patient's immune system. For example,

WO 02/066649

PCT/US02/02709

the IDDM patient is treated until insulin monitoring demonstrates adequate islet response and other indicia of islet necrosis diminish (e.g. reduction in anti-islet antibody titers), after which the patient can be withdrawn from anti-IFN- $\alpha$  antibody treatment for a trial period during which insulin response and the level of anti-islet antibodies are monitored for

5 relapse.

In the treatment and prevention of an immune-mediated or autoimmune disorder by an anti-IFN- $\alpha$  antibody, the antibody composition will be formulated, dosed, and administered in a fashion consistent with good medical practice. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being 10 treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the antibody, the particular type of antibody, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners. The "therapeutically effective amount" of antibody to be administered will be governed by such 15 considerations, and is the minimum amount necessary to prevent, ameliorate, or treat the disorder, including treating chronic autoimmune conditions and immunosuppression maintenance in transplant recipients. Such amount is preferably below the amount that is toxic to the host or renders the host significantly more susceptible to infections.

As a general proposition, the initial pharmaceutically effective amount of the antibody administered parenterally will be in the range of about 0.1 to 50 mg/kg of patient 20 body weight per day, with the typical initial range of antibody used being 0.3 to 20 mg/kg/day, more preferably 0.3 to 15 mg/kg/day. The desired dosage can be delivered by a single bolus administration, by multiple bolus administrations, or by continuous infusion administration of antibody, depending on the pattern of pharmacokinetic decay that the practitioner wishes to achieve.

25 As noted above, however, these suggested amounts of antibody are subject to a great deal of therapeutic discretion. The key factor in selecting an appropriate dose and scheduling is the result obtained, as indicated above.

The antibody need not be, but is optionally formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the immune-mediated or autoimmune disorder in question. 30 For example, in rheumatoid arthritis, the antibody may be given in conjunction with a glucocorticosteroid. The effective amount of such other agents depends on the amount of anti-IFN- $\alpha$  antibody present in the formulation, the type of disorder or treatment, and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with

WO 02/066649

PCT/US02/02709

administration routes as used hereinbefore or about from 1 to 99% of the heretofore employed dosages.

Further details of the invention can be found in the following example, which further defines the scope of the invention. All references cited throughout the specification, 5 and the references cited therein, are hereby expressly incorporated by reference in their entirety.

10

#### EXAMPLES

The following examples are offered by way of illustration and not by way of limitation. The examples are provided so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of how to make and use the compounds, 15 compositions, and methods of the invention and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their invention. Efforts have been made to insure accuracy with respect to numbers used (e.g. amounts, temperature, etc.) but some experimental errors and deviation should be accounted for. Unless indicated otherwise, parts are parts by weight, temperature is in degrees C, and pressure is at or near atmospheric. The disclosures of all 20 citations in the specification are expressly incorporated herein by reference.

Example 1. Generation and characterization of a broad reactive mouse anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibody

25 Materials and Methods

*A murine monoclonal antibody with broad reactivity against IFN- $\alpha$  subtypes*

A pan-IFN- $\alpha$  neutralizing antibody was developed by sequentially immunizing mice with the mixture of human IFN- $\alpha$  subtypes, generating a large number of candidate mAbs, and then screening for binding and activity. In particular, Balb/c mice were immunized into 30 each hind footpad 9 times (at two week intervals) with 2.5  $\mu$ g of lymphoblastoid hIFN- $\gamma$  (Product No. I-9887 of Sigma, St. Louis, MO) resuspended in MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Inc., Hamilton, MT). Three days after the final boost, popliteal

WO 02/066649

PCT/US02/02709

lymph node cells were fused with murine myeloma cells P3X63Ag8.U.1 (ATCC CRL1597), using 35% polyethylene glycol. Hybridomas were selected in HAT medium. Ten days after the fusion, hybridoma culture supernatants were first screened for mAbs binding to the various species of hIFN- $\alpha$  in an ELISA. The selected hybridoma culture supernatants were then tested for their ability to inhibit the anti-viral cytopathic effect of IFN on human lung carcinoma cell line A549 cells as described below. As indicated in Fig. 1, three mAbs obtained from 1794 fusion wells were able to neutralize a diverse set of IFN- $\alpha$  subtypes. These three mAbs were subcloned and re-analyzed.

10 *Neutralization of antiviral activity of IFN- $\alpha$*

The ability of a candidate antibody to neutralize the antiviral activity of IFN- $\alpha$  was assayed as described by Yousefi, S., et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 83: 735-740 (1985). Briefly, the assay was performed using human lung carcinoma A549 cells challenged with encephalomyocarditis (EMC) virus. Serial dilutions of mAbs were incubated with various 15 units of type I interferons for one hour at 37°C in a total volume of 100 :l. These mixtures were then incubated with  $5 \times 10^5$  A549 cells in 100 :l of cell culture medium for 24 hours. Cells were then challenged with  $2 \times 10^5$  pfu of EMC virus for an additional 24 hours. At the end of the incubation, cell viability was determined by visual microscopic examination or crystal violet staining. The neutralizing antibody titer (EC50) was defined as the 20 concentration of antibody which neutralizes 50% of the anti-viral cytopathic effect by 100 units/ml of type I IFNs. The units of type I IFNs used in this study were determined using NIH reference recombinant human IFN- $\gamma$ 2 as a standard. The specific activities of the various type I IFNs tested were as follows: IFN- $\gamma$ 2/- $\gamma$ 1 (IFN- $\gamma$ 2 residues 1-62/- $\gamma$ 1 residues 64-166) ( $2 \times 10^7$  IU/mg), IFN- $\gamma$ 1 ( $3 \times 10^7$  IU/mg), IFN- $\gamma$ 2 ( $2 \times 10^7$  IU/mg), IFN- $\gamma$ 5 25 ( $8 \times 10^7$  IU/mg), IFN- $\gamma$ 8 ( $19 \times 10^7$  IU/mg), and IFN- $\gamma$ 10 ( $1.5 \times 10^5$  IU/mg). The leukocyte IFN tested was Sigma Product No. I-2396. The lymphoblastoid IFN tested was NIH reference standard Ga23-901-532. The data shown in Fig. 3B was obtained using the above-described assay format in experiments performed by Access Biomedical (San Diego, CA) at the behest of applicant.

30

WO 02/066649

PCT/US02/02709

*Electrophoretic mobility shift assay*

Most of the immediate actions of IFN have been linked to activation of latent cytoplasmic signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins to produce a multiprotein complex, interferon-stimulated gene factor-3 (ISGF3), which induces transcription from target promoter interferon-stimulated response element (ISRE). ISGF3 is composed of three protein subunits: STAT1, STAT2 and p48/ISGF3 $\gamma$ . The p48 protein belongs to the interferon regulatory factor (IRF) family, and is a DNA-binding protein that directly interacts with ISRE. Thus, monitoring ISRE specific cellular DNA-binding complex in response to IFN treatment provides a simple, rapid and convenient method to assess the effect of IFN on target cells. One of the convenient formats to carry out such an analysis is electrophoretic mobility shift assay (EMSA), wherein the induction of an ISRE-binding activity by IFN treatment results in the shift in the electrophoretic mobility of a radiolabeled double-stranded oligonucleotide probe corresponding to the consensus sequence of ISRE.

The assay was carried out essentially as described by Kurabayashi *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 15: 6386 (1995). Briefly, 5 ng of a specific IFN- $\alpha$  subtype plus various concentrations (5-100  $\mu$ g/ml) of anti-IFN- $\alpha$  mAbs were incubated with  $5 \times 10^5$  HeLa cells in 200  $\mu$ l of DMEM for 30 minutes at 37°C. Cells were preincubated with antibody for 15 minutes at 4°C before the addition of the hIFN- $\alpha$ . Cells were washed in PBS and resuspended in 125  $\mu$ l buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM ETDA, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin). After a 15 minute incubation on ice, cells were lysed by the addition of 0.025% NP40. The nuclear pellet was obtained by centrifugation and was resuspended in 50  $\mu$ l buffer B (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin) and kept on ice for 30 min. The nuclear fraction was cleared by centrifugation and the supernatant stored at -70°C until use. Double-stranded probes were prepared from single-stranded oligonucleotides (ISG15 top : 5'-GATCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCC-3' [SEQ ID NO. 13], ISG15 bottom: 5'-GATCGGCTTCAGTTCGGTTCCCTTC CC-3' [SEQ ID NO. 14]) utilizing a DNA polymerase I Klenow filling reaction with  $^{32}$ P- dATP (3,000 Ci/mM, Amersham). Labeled oligonucleotides were purified from unincorporated radioactive nucleotides using BIO-Spin 30 columns (Bio-Rad). Binding reactions

WO 02/066649

PCT/US02/02709

containing 5  $\mu$ l nuclear extract, 25,000 cpm of labeled probe and 2  $\mu$ g of non-specific competitor poly (dI-dC)-poly (dI-dC) in 15  $\mu$ l binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 15% glycerol) were incubated at RT for 30 minutes. DNA-protein complexes were resolved in 5 6% non-denaturing polyacrylamide gels and analyzed by autoradiograph. The specificity of the assay was determined by the addition of 350 ng of unlabeled ISG15 probe in separate reaction mixtures. Formation of an ISGF3 specific complex was confirmed by a super shift assay with anti-STAT1 antibody.

10 *Cloning of a gene encoding 9F3 anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibody*

The murine anti-human IFN- $\alpha$  mAb 9F3 was generated, cloned and sequenced. The plasmid pEMX1 used for expression and mutagenesis of F(ab)s in *E. coli* has been described previously (Werther *et al.*, *J. Immunol.* 157: 4986-4995 [1996]). Briefly, the plasmid contains a DNA fragment encoding a consensus human  $\kappa$  subgroup 1 light chain 15 (VL $\kappa$ 1-CL) and a consensus human subgroup III heavy chain (VHIII-CH1) and an alkaline phosphatase promoter. The use of the consensus sequences for VL and VH has been described previously (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289 [1992]).

Results

20 We have previously shown that there is a wide spectrum of IFN- $\alpha$  subtypes expressed by the islets of patients with IDDM (Huang *et al.*, *Diabetes* 44: 658-664 [1995]). We also demonstrated that there is no obvious association between IDDM and the expression of either IFN- $\beta$  or IFN- $\gamma$  (Huang *et al.*, [1995] *supra*). While the specific IFN- $\alpha$  subtypes expressed as part of the SLE pathology have not been defined, as with IDDM, 25 the association is with IFN- $\alpha$  and not with either of IFN- $\beta$  or IFN- $\gamma$  (Hooks, *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 25: 396-400 [1982]; Kim, *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 70: 562-569 [1987]; Lacki, *et al.*, *J. Med.* 28: 99-107 [1997]; Robak, *et al.*, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 46: 375-380 [1998]; Shiozawa, *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 35: 417-422 [1992]; von Wussow, *et al.*, *Rheumatology International* 8: 225-230 [1988]). 30 These observations led us to propose that a candidate antibody for therapeutic intervention in IDDM or SLE would need to neutralize a majority of the IFN- $\alpha$  subtypes while leaving

WO 02/066649

PCT/US02/02709

intact the activities of other interferons ( $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\omega$ ) and interleukins that may be required for host defense.

One of them (9F3) was able to neutralize a wide spectrum of recombinant interferon  $\alpha$  subtypes and was further characterized. As shown in Fig. 2A, 9F3 was able to neutralize 5 the anti-viral activity of seven recombinant interferons, IFN- $\alpha$  - 2, 4, 5, 8 and 10 (Fig. 2) and IFN- $\alpha$  1 and 21 (Table 2 and Fig. 6). These IFN- $\alpha$  subtypes cover the full spectrum of sequences as projected in a type I interferon sequence dendrogram. More importantly, the 9F3 mAb that neutralized the IFN- $\alpha$  subtypes was unable to neutralize IFN- $\beta$  (Fig. 2, Table 2) or IFN- $\gamma$ . The small increase in activity shown in Fig. 2 for IFN- $\beta$  was not reproducible 10 in other assays and appears to be the result of assay variation.

Other mAbs that are neutralizing toward IFN- $\alpha$  have been developed (Tsukui *et al.*, *Microbiol. Immunol.* 30: 1129-1139 [1986]; Berg, *J. Interferon Res.* 4: 481-491 [1984]; Meager and Berg, *J. Interferon Res.* 6:729-736 [1986]; US Patent No. 4,902,618; and EP publication No. 0,139,676 B1). However, these antibodies neutralize only a limited number 15 of recombinant IFN- $\alpha$  subtypes and are unable to neutralize a wide spectrum of IFN- $\alpha$  subtypes such as those produced by activated leukocytes. In contrast, 9F3 Mab was able to neutralize at least 95% of the anti-viral activity in the heterogeneous collection of IFN- $\alpha$  subtypes produced by activated leukocytes (Fig. 3A). Similarly, 9F3 mAb was also able to block the anti-viral activity of an independent preparation of lymphoblastoid IFN (NIH 20 reference standard) as determined in an independent experiment (Fig. 3B).

The ability of 9F3 mAb to neutralize IFN- $\alpha$  was also tested using an alternative bioassay. The assay was based on the ability of IFN- $\alpha$  to activate the binding of the signaling molecule, interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF3), to an oligonucleotide derived from the interferon-stimulated response element (ISRE) in a DNA binding assay 25 known as electrophoretic mobility shift assay (Horvath *et al.*, *Genes Dev.* 9: 984-994 [1995]). The transduction of type I interferon signals to the nucleus relies on activation of a protein complex, ISGF3, involving two signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins, STAT1 and STAT2, and the interferon regulatory factor (IRF) protein, p48/ISGF3 $\gamma$  (Wathelet *et al.*, *Mol. Cell* 1: 507-518 [1998]). The latter is a DNA sequence 30 recognition subunit of ISGF3 and directly interacts with ISRE (McKendry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11455-11459 [1991]; John *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11: 4189-4195 [1991]). The treatment of COS cells with either IFN- $\alpha$  or IFN- $\beta$  led to the appearance of a

WO 02/066649

PCT/US02/02709

complex corresponding to the binding of ISGF3 to the ISRE derived probe. The appearance of the IFN- $\alpha$ -induced but not the IFN- $\beta$ -induced complex was blocked by 9F3 mAb (Fig. 4). Furthermore, 9F3 mAb was able to neutralize the activity of six recombinant IFN- $\alpha$  subtypes that were tested in this assay (Table 2).

5

Table 2

Inhibition of ISGF3 formation induced by type I IFNs by mAb 9F3

mAb	IFN- $\alpha$ 2/1	IFN- $\alpha$ 1	IFN- $\alpha$ 2	IFN- $\alpha$ 5	IFN- $\alpha$ 8	IFN- $\alpha$ 21	IFN- $\beta$
9F3.18.5	+++	+++	+++	+	+++	+++	-
IgG1	-	-	-	-	-	-	-

10 The extent of inhibition of the IFN induced complex by 9F3 is indicated where - indicates that the induced band was not altered; + indicates that the band was partially lost and +++ indicates that the induced band was largely abolished. mAb was used at 10  $\mu$ g/ml; IFN- $\alpha$  was used at 25 ng/ml

15 Having established that 9F3 was able to neutralize both a wide variety of recombinant IFN- $\alpha$  subtypes and the mixture of IFN- $\alpha$  subtypes produced by activated leukocytes, we cloned and sequenced the cDNAs encoding both the heavy and light chains of 9F3 mAb. The heavy and light chains were purified and the N terminal amino acid sequences derived were used to design degenerate 5' primers corresponding to the N terminus, and the 3' primers were designed corresponding to the constant domain of mouse  $\kappa$  light chain and IgG2 heavy chain. The corresponding cDNAs were cloned using conventional PCR technique and the nucleotide sequence of the inserts was determined. Figure 5 shows sequence alignment of VL (5A) and VH (5B) domains of a murine 9F3 monoclonal antibody, a humanized version (V13) and consensus sequence of the human 20 heavy chain subgroup III and the human  $\kappa$  light chain subgroup III. In order to ensure that the cDNAs that were cloned encoded the correct Mab reflecting the specificity and characteristics of 9F3 mAb, recombinant chimeric proteins were generated that utilized the mouse cDNA sequences shown in Fig. 5 and a human CH1 domain. The resultant chimera (CH8-2) was able to fully neutralize various recombinant IFN- $\alpha$  subtypes (Fig. 6). The 25

WO 02/066649

PCT/US02/02709

amino acid sequences for the heavy and light chains were then used to generate a humanized antibody.

5 Example 2. Humanization of 9F3 pan-IFN- $\alpha$  neutralizing monoclonal antibody

**Materials and Methods**

*Construction of Humanized F(ab)s*

To construct the first F(ab) variant of humanized 9F3, site-directed mutagenesis (Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492 [1985]) was performed on a deoxyuridine-containing template of pEMX1. The six CDRs were changed to the murine 9F3 sequence (Fig. 5); the residues included in each CDR were from the sequence-based CDR definitions (Kabat *et al.*, (1991) *supra*). F-1 therefore consisted of a complete human framework (VL  $\kappa$  subgroup 1 and VH subgroup III) with the six complete murine CDR sequences. Plasmids for all other F(ab) variants were constructed from the plasmid template of F-1. Plasmids were transformed into *E. coli* strain XL-1 Blue (Stratagene, San Diego, CA) for preparation of double- and single-stranded DNA using commercial kits (Qiagen, Valencia, CA). For each variant, DNA coding for light and heavy chains was completely sequenced using the dideoxynucleotide chain termination method (Sequenase, U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH). Plasmids were transformed into *E. coli* strain 16C9, a derivative of MM294, plated onto Luria broth plates containing 50  $\mu$ g/ml carbenicillin, and a single colony selected for protein expression. The single colony was grown in 5 ml Luria broth-100  $\mu$ g/ml carbenicillin for 5-8 h at 37°C. The 5 ml culture was added to 500 ml AP5 medium containing 50  $\mu$ g/ml carbenicillin and allowed to grow for 20 h in a 4 L baffled shake flask at 30°C. AP5 medium consists of: 1.5 g glucose, 11.0 g Hycase SF, 0.6 g yeast extract (certified), 0.19 g MgSO<sub>4</sub> (anhydrous), 1.07 g NH<sub>4</sub>Cl, 3.73 g KCl, 1.2 g NaCl, 120 ml 1 M triethanolamine, pH 7.4, to 1 L water and then sterile filtered through 0.1  $\mu$ m Sealkeen filter. Cells were harvested by centrifugation in a 1 L centrifuge bottle at 3000xg and the supernatant removed. After freezing for 1 h, the pellet was resuspended in 25 ml cold 10 mM Tris-1 mM EDTA-20% sucrose, pH 7.5, 250  $\mu$ l of 0.1 M benzamidine (Sigma, St. Louis, MO) was added to inhibit proteolysis. After gentle stirring on ice for 3 h, the sample was centrifuged at 40,000xg for 15 min. The supernatant

WO 02/066649

PCT/US02/02709

was then applied to a Protein G-Sepharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) column (0.5 ml bed volume) equilibrated with 10 mM Tris-1 mM EDTA, pH 7.5. The column was washed with 10 ml of 10 mM Tris-1 mM EDTA, pH 7.5, and eluted with 3 ml 0.3 M glycine, pH 3.0, into 1.25 ml 1 M Tris, pH 8.0. The F(ab) was then buffer exchanged into 5 PBS using a Centricon-30 (Amicon, Beverly, MA) and concentrated to a final volume of 0.5 ml. SDS-PAGE gels of all F(ab)s were run to ascertain purity and the molecular weight of each variant was verified by electrospray mass spectrometry. F(ab) concentrations were determined using quantitative amino acid analysis.

10 *Construction of Chimeric and Humanized IgG*

For generation of human IgG2 versions of chimeric and humanized 9F3, the appropriate murine or humanized VL and VH (F-13, Table 3) domains were subcloned into separate previously described pRK vectors (Eaton *et al.*, *Biochemistry* 25: 8343-8347 [1986]) that contained DNA coding for human IgG2 CH1-Fc or human light chain CL 15 domain. The DNA coding for the entire light and the entire heavy chain of each variant was verified by dideoxynucleotide sequencing. The chimeric IgG consists of the entire murine 9F3 VH domain fused to a human CH1 domain at amino acid SerH113 and the entire murine 9F3 VL domain fused to a human CL domain at amino acid LysL 107.

Heavy and light chain plasmids were co-transfected into an adenovirus-transformed 20 human embryonic kidney cell line, 293 (Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36: 59-74 [1977]), using a high efficiency procedure (Gorman *et al.*, *DNA Prot. Eng. Tech.* 2: 3-10 [1990]). Media was changed to serum-free and harvested daily for up to five days. Antibodies were purified from the pooled supernatants using Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia). The eluted antibody was buffer exchanged into PBS using a Centricon-30 (Amicon), 25 concentrated to 0.5 ml, sterile filtered using a Millex-GV (Millipore, Bedford, MA) and stored at 4°C. IgG2 concentrations were determined using quantitative amino acid analysis.

*IFN- $\alpha$  Binding Assay*

In the ELISA, 96 well microtiter plates (Nunc) were coated by adding 50  $\mu$ l of 0.1 30  $\mu$ g/ml IFN- $\alpha$  in PBS to each well and incubated at 4°C overnight. The plates were then washed three times with wash buffer (PBS plus 0.05% Tween 20). The wells in microtiter plates were then blocked with 200  $\mu$ l of SuperBlock (Pierce) and incubated at room

WO 02/066649

PCT/US02/02709

temperature for 1 hour. The plates were then washed again three times with wash buffer. After washing step, 100  $\mu$ l of serial dilutions of humanized mAb starting at 10  $\mu$ g/ml were added to designated wells. The plates were incubated at room temperature for 1 hour on a shaker apparatus and then washed three times with wash buffer. Next, 100  $\mu$ l of 5 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human Fab specific (Cappel), diluted at 1:1000 in assay buffer (0.5% bovine serum albumin, 0.05% Tween 20 in PBS), was added to each well. The plates were incubated at room temperature on a shaker apparatus and then washed three times with wash buffer, followed by addition of 100  $\mu$ l of substrate (TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; Kirkegaard & Perry) to each well and incubated at room 10 temperature for 10 minutes. The reaction was stopped by adding 100  $\mu$ l of stop solution (from Kirkegaard & Perry) to each well, and absorbance at 450 nm was read in an automated microtiter plate reader.

*BIAcore™ Biosensor Assay*

15 IFN- $\alpha$  binding of the humanized F(ab)s, chimeric and humanized IgG2 antibodies were measured using a BIAcore™ biosensor (Karlsson *et al.*, *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 6: 97-108 [1994]). The IFN- $\alpha$  was immobilized on the sensor chip at 60  $\mu$ g/ml in 50 mM MES buffer, pH 6.3. Antibodies were exposed to the chip at 75  $\mu$ g/ml (500 nM) in phosphate-buffered saline/1% Tween-20. The antibody on-rate ( $k_{on}$ ) 20 was measured.

*Computer Graphics Models of Murine and Humanized F(ab)s*

Sequences of the VL and VH domains (Fig. 5A and B) were used to construct a 25 computer graphics model of the murine 9F3 VL-VH domains (Fig. 7). This model was used to determine which framework residues should be incorporated into the humanized antibody. A model of the humanized F(ab) was also constructed to verify correct selection of murine framework residues. Construction of models was performed as described previously (Carter *et al.*, [1992] *supra*; Werther *et al.*, [1996] *supra*).

WO 02/066649

PCT/US02/02709

Results

The consensus sequence for the human heavy chain subgroup III and the light chain subgroup I were used as the framework for the humanization as shown in Fig. 5 (Kabat *et al.*, (1991), *supra*). This framework has been successfully used in the humanization of other 5 murine antibodies (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289 [1992]; Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2623-2632 [1993]; Eigenbrot *et al.*, *Proteins* 18: 49-62 [1994]; Werther *et al.*, *J. Immunol.* 157: 4986-4995 [1996]). All humanized variants were initially made and screened for binding as F(ab)s expressed in *E. coli*. Typical yields from 500 ml shake flasks were 0.1-0.4 mg F(ab).

10 The complementarity determining region (CDR) residues have been defined either based on sequence hypervariability (Kabat *et al.*, (1991) *supra*) or crystal structure of F(ab)-antigen complexes (Chothia *et al.*, *Nature* 342: 877-883 [1989]). Although the sequence-based CDRs are larger than the structure-based CDRs, the two definitions are generally in agreement except for CDR-H1. According to the sequence-based definition, CDR-H1 15 includes residues H31-H35, whereas the structure-based system defines residues H26-H32 as CDR-H1 (light chain residue numbers are prefixed with L; heavy chain residue numbers are prefixed with H). For the present study, CDR-H1 was defined as a combination of the two, i.e. including residues H26-H35. The other CDRs were defined using the sequence-based definition (Kabat *et al.*, (1991) *supra*).

20 In the initial variant, F-1, the CDR residues were transferred from the murine antibody to the human framework. In addition, F(ab)s which consisted of the chimeric heavy chain with F-1 light chain (Ch-1) and F-1 heavy chain with chimeric light chain (Ch-2) were generated and tested for binding. F-1 bound IFN- $\alpha$  poorly (Table 3). Comparing the binding affinities of Ch-1 and Ch-2 (Table 3) suggested that framework residues in the 25 F-1 VH domain needed to be altered in order to increase binding.

Table 3

Humanized Anti-IFN- $\alpha$  Versions

Version	Template	Changes <sup>a</sup>	OD <sub>450nm</sub> at 10 $\mu$ g/ml		
			Mean	SD	N
Ch-1	F-1 VL/ Murine VH		1.45	0.11	3
Ch-2	Murine VL/ F-2 VH		.024	0.04	3
F-1	Human FR/ CDR swap		0.06	0.00	3
F-2	F-1	ArgH71 <b>Leu</b> ; AsnH73 <b>Lys</b>	0.08	0.01	3
F-3	F-2	PheH67 <b>A1a</b> ; IleH69 <b>Leu</b> ; LeuH78 <b>A1a</b>	0.14	0.02	3
F-4	F-3	ArgH94 <b>Ser</b>	0.495	0.02	3
F-5	F-4	AlaH24 <b>Thr</b>	0.545	0.03	3
F-6	F-5	ValH48 <b>Ile</b> ; AlaH49 <b>G1y</b>	0.527	0.02	2
F-7	F-5	<i>AlaH78Leu</i>	0.259	0.02	2
F-8	F-5	<i>LeuH69Ile</i>	0.523	0.05	3
F-9	F-5	<i>AlaH67Phe</i>	0.675	0.09	3
F-10	F-9	<i>LeuH69Ile</i>	0.690	0.03	3
F-11	F-10	LysH75 <b>Ser</b>	0.642	0.06	3
F-12	F-10	AsnH76 <b>Arg</b>	0.912	0.05	3
F-13	F-12	LeuL46 <b>Val</b> TyrL49 <b>Ser</b>	1.050	0.16	3
F-14	F-13	<i>LeuH71Arg</i>	0.472	0.06	3
F-15	F-13	<i>LysH73Asn</i>	0.868	0.32	3

<sup>a</sup>Murine residues are in bold; residue numbers are according to Kabat *et al.* (1991). Standard text indicates a change from a human framework residue to mouse. Italic text indicates a change from a mouse framework residue to human. Fab binding to IFN- $\alpha$  was assayed by ELISA and results are provided as OD<sub>450 nm</sub> at 10  $\mu$ g/ml. SD, standard deviation; n, number of experimental replicates.

- Previous humanizations (Xiang *et al.*, *J. Mol. Biol.* 253: 385-390 [1995]; Werther *et al.*, [1996] *supra*) as well as studies of F(ab)-antigen crystal structures (Chothia *et al.*, [1989] *supra*; Tramontano *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 175-182 [1990]) have shown that residues H71 and H73 can have a profound effect on binding, possibly by influencing the conformations of CDR-H1 and CDR-H2. Changing the human residues at positions H71 and H73 to their murine counterparts improved binding only slightly (version F-2, Table 3). Further simultaneous changes at positions H67, H69 and H78 (version F-3) followed by changes ArgH94Ser (version F-4) and AlaH24Thr (version F-5) significantly improved binding (Table 3). Since positions H67, H69 and H78 had been changed simultaneously, each was individually altered back to the human consensus framework residue; versions F-7, F-8, F-9, and F-10 show that the human residue is preferred at position H67, position H69 does not show any preference for the human or murine residue, and the murine residue is preferred at position H78.
- 15 We have found during previous humanizations that residues in a framework loop, FR-3 (Kabat *et al.*, (1991) *supra*), adjacent to CDR-H1 and CDR-H2 can affect binding (Eigenbrot *et al.*, (1994) *supra*). Accordingly, two residues in this loop were changed to their murine counterparts: LysH75 to murine Ser (version F-11) and AsnH76 to murine Arg (version F-12). Only the AsnH76Arg change effected an improvement in binding (Table 3).
- 20 Inspection of the models of the murine and humanized F(ab)s suggested that residue L46, buried at the VL-VH interface and interacting with CDR-H3, might also play a role either in determining the conformation of CDR-H3 and/or affecting the interactions between the VL and VH domains. Similarly, L49 position which is adjacent to CDR-L2 differs between the human consensus (Tyr) and the 9F3 (Ser) sequence. Therefore,
- 25 LeuL46Val and TyrL49Ser residues were simultaneously substituted, which resulted in a variant (F-13) with further improvement in the binding (Table 3). Based on its best binding among all the variants generated, F-13 was chosen as the final humanized version.

A humanized recombinant anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibody (V13IgG2) was generated by fusing VH and VL domains derived from F-13 to human IgG2 CH1-Fc and human CL domains respectively. The  $K_{on}$  rates and  $K_d$  values of V13IgG2 were then compared with a chimeric IgG2 or murine 9F3. BIACore™ measurement of V13IgG2 and 5 chimeric IgG2 binding to immobilized IFN- $\alpha$  showed that their  $K_{on}$  rates were similar (Table 4). Affinity measurement using Kinexa™ technology showed that the affinity of V13IgG2 for IFN $\alpha$  was reduced by 2-fold compared to the parental murine 9F3 antibody (Table 4).

10

**Table 4**

BIACore™ and Kinexa™ Data for Anti-IFN $\alpha$ Antibodies			
Antibody <sup>a</sup>	$K_{on}$ ( $\mu$ M/sec)	$K_d$ (nM) <sup>b</sup>	Method
ChIgG2	3.9	0.14	BIACore™
V13IgG2	3.3		BIACore™
V13Fab		4.1	BIACore™
Antibody <sup>a</sup>	$K_d$ (pM)		
murine 9F3	1.5		Kinexa™
V13Fab	3.4		Kinexa™

<sup>a</sup>V13IgG2 is F-13 VH domain joined to human IgG2 CH1-Fc and F-13 VL domain joined to a human CL domain; ChIgG2 is mouse 9F3 VH domain joined to human IgG2 CH1-Fc and mouse 9F3 VL domain joined to human CL domain. <sup>b</sup>Koff/Kon.

**Deposit of Material**

The following materials have been deposited with the American Type Culture 15 Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

WO 02/066649

PCT/US02/02709

<u>Material</u>	<u>ATCC Dep. No.</u>	<u>Deposit Date</u>
1. A hybridoma cell line secreting 9F3 murine anti-IFN- $\alpha$ monoclonal antibodies (Id. Ref.: 9F3.18.5)	PTA-2917	January 18, 2001
2. pRK-based vector for the expression of heavy chain of chimeric CH8-2 full-length IgG (Id. Ref.: XAIFN-ChHpDR2)	PTA-2883	January 9, 2001
3. pRK-based vector for the expression of light chain of chimeric CH8-2 full-length IgG (Id. Ref.: XAIFN-ChLpDR1)	PTA-2880	January 9, 2001
4. pRK-based vector for the expression of heavy chain of humanized V13 full-length IgG <sub>2</sub> (Id. Ref.: VHV30-IgG2)	PTA-2881	January 9, 2001
5. pRK-based vector for the expression of light chain of humanized V13 full-length IgG <sub>2</sub> (Id. Ref.: VLV30-IgG)	PTA-2882	January 9, 2001

This deposit was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent 5 Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the 10 pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto

WO 02/066649

PCT/US02/02709

according to 35 U.S.C. § 122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 C.F.R. § 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the 5 materials will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one 10 skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct deposited, since the deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable 15 the practice of any aspect of the invention, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibody which binds to and neutralizes a biological activity of at least IFN- $\alpha$  subtypes, IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\alpha$ 4, IFN- $\alpha$ 5, IFN- $\alpha$ 8, IFN- $\alpha$ 10, and IFN- $\alpha$ 21.
- 5 2. The antibody of claim 1 which is a murine antibody.
3. The antibody of claim 1 which is a humanized antibody.
4. The antibody of claim 1 which is a human antibody.
5. The antibody of claim 1 wherein said biological activity is antiviral activity.
6. The antibody of claim 5 wherein said antibody is capable of neutralizing at
- 10 least 70% of the antiviral activity of said IFN- $\alpha$  subtypes.
7. The antibody of claim 5 wherein said antibody is capable of neutralizing at least 80% of the antiviral activity of said IFN- $\alpha$  subtypes.
8. The antibody of claim 5 wherein said antibody is capable of neutralizing at least 90% of the antiviral activity of said IFN- $\alpha$  subtypes.
- 15 9. The antibody of claim 5 wherein said antibody is capable of neutralizing at least 99% of the antiviral activity of said IFN- $\alpha$  subtypes.
10. The antibody of claim 1 which binds essentially the same IFN- $\alpha$  epitope as murine anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody 9F3 or a humanized or chimeric form thereof.
- 20 11. The antibody of claim 1 which is murine anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody 9F3 or a humanized or chimeric form thereof.
12. The antibody of claim 11 which is humanized anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibody 9F3 version 13 (V13).
13. The antibody of claim 1 which binds essentially the same IFN- $\alpha$  epitope as
- 25 the anti-IFN- $\alpha$  antibody produced by the hybridoma cell line deposited with ATCC on January 18, 2001 and having accession No. PTA-2917.
14. The antibody of claim 1 which is of the IgG class.
15. The antibody of claim 14 which has an IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, or IgG<sub>4</sub> isotype.
16. The antibody of claim 1 which is an antibody fragment.
- 30 17. The antibody of claim 16 which is a Fab fragment.
18. The antibody of claim 16 which is a F(ab')<sub>2</sub> fragment.
19. The antibody of claim 16 which is a Fab' fragment.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

20. An anti-IFN- $\alpha$  antibody light chain or a fragment thereof, comprising the following CDR's:

- (a) L1 of the formula RASQSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO: 7);
- (b) L2 of the formula YASNLES (SEQ ID NO: 8); and
- (c) L3 of the formula QHSGWGPRTF (SEQ ID NO: 9).

5 21. The anti-IFN- $\alpha$  antibody light chain fragment of claim 20 which is the light chain variable domain.

22. An anti-IFN- $\alpha$  antibody heavy chain or a fragment thereof, comprising the following CDR's:

- 10 (a) H1 of the formula GYTFTEYIIH (SEQ ID NO: 10);  
(b) H2 of the formula SINPDYDITNYNQRFKG (SEQ ID NO: 11); and  
(c) H3 of the formula WISDFFDY (SEQ ID NO: 12).

23. The anti-IFN- $\alpha$  antibody heavy chain fragment of claim 22 which is the heavy chain variable domain.

15 24. An anti-IFN- $\alpha$  antibody comprising

(A) at least one light chain or a fragment thereof, comprising the following CDR's:  
(a) L1 of the formula RASQSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO: 7);  
(b) L2 of the formula YASNLES (SEQ ID NO: 8); and  
(c) L3 of the formula QHSGWGPRTF (SEQ ID NO: 9); and

20 (B) at least one heavy chain or a fragment thereof, comprising the following CDR's:

- (a) H1 of the formula GYTFTEYIIH (SEQ ID NO: 10);
- (b) H2 of the formula SINPDYDITNYNQRFKG (SEQ ID NO: 11); and
- (c) H3 of the formula WISDFFDY (SEQ ID NO: 12).

25 25. The antibody of claim 24 having a homo-tetrameric structure composed of two disulfide-bonded antibody heavy chain-light chain pairs.

26. The antibody of claim 24 which is a linear antibody.

27. The antibody of claim 24 which is a murine antibody.

28. The antibody of claim 24 which is a chimeric antibody.

29. The antibody of claim 24 which is a humanized antibody.

30. 30. The antibody of claim 24 which is a human antibody.

31. An isolated nucleic acid molecule encoding an antibody of claim 1.

32. An isolated nucleic acid molecule encoding an antibody of claim 11.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

33. An isolated nucleic acid molecule encoding an antibody of claim 12.
34. An isolated nucleic acid molecule encoding an antibody of claim 24.
35. An isolated nucleic acid molecule encoding an antibody light chain or light chain fragment of claim 20.
- 5 36. An isolated nucleic acid molecule encoding an antibody heavy chain or heavy chain fragment of claim 22.
37. An isolated nucleic acid molecule comprising the light chain polypeptide - encoding nucleic acid sequence of the vector deposited with ATCC on January 9, 2001 and having accession No. PTA-2882.
- 10 38. An isolated nucleic acid molecule comprising the heavy chain polypeptide- encoding nucleic acid sequence of the vector deposited with ATCC on January 9, 2001 and having accession No. PTA-2881.
39. A vector comprising a nucleic acid molecule according to any one of claims 31 to 38.
- 15 40. A host cell transformed with a nucleic acid molecule according to any one of claims 31 to 38.
41. A method of producing the antibody of any one of claims 1, 11, 12 and 24 comprising culturing a host cell comprising a nucleic acid sequence encoding the antibody under conditions wherein the nucleic acid sequence is expressed to produce the antibody.
- 20 42. A hybridoma cell line comprising a nucleic acid molecule according to any one of claims 31 to 38.
43. A hybridoma cell line deposited with ATCC on January 18, 2001 and having accession No. PTA-2917.
- 25 44. An antibody produced by the hybridoma cell line of claim 42.
45. A pharmaceutical composition comprising an effective amount of the antibody of claim 1 in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.
46. A pharmaceutical composition comprising an effective amount of the antibody of claim 11 in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.
- 30 47. A pharmaceutical composition comprising an effective amount of the antibody of claim 12 in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.
48. A pharmaceutical composition comprising an effective amount of the antibody of claim 24 in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/066649

PCT/US02/02709

49. A method for diagnosing a condition associated with the expression of IFN- $\alpha$  in a cell, comprising contacting said cell with an anti-IFN- $\alpha$  antibody of claim 1, and detecting the presence of IFN- $\alpha$ .

50. A method for the treatment of a disease or condition associated with the expression of IFN- $\alpha$  in a patient, comprising administering to said patient an effective amount of an anti-IFN- $\alpha$  antibody of claim 1.

51. The method of claim 50 wherein said patient is a mammalian patient.

52. The method of claim 51 wherein said patient is human.

53. The method of claim 52 wherein said disease is an autoimmune disease.

10 54. The method of claim 53 wherein said disease is selected from the group consisting of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM); systemic lupus erythematosus (SLE); and autoimmune thyroiditis.

15

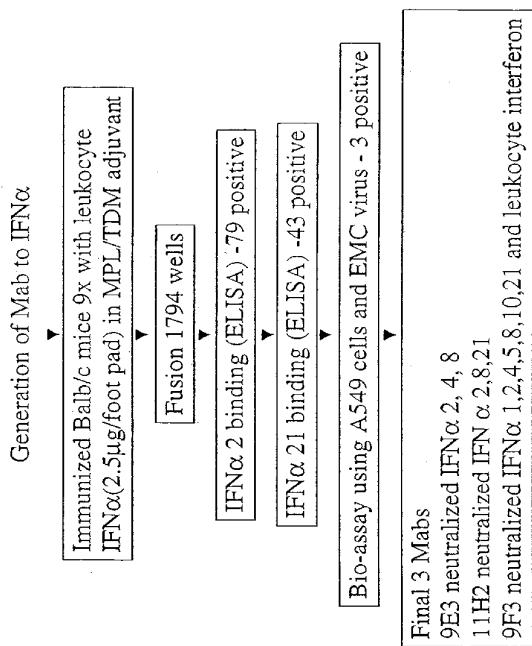


FIGURE 1

## Neutralization of IFN-alpha activities by mAb 9F3

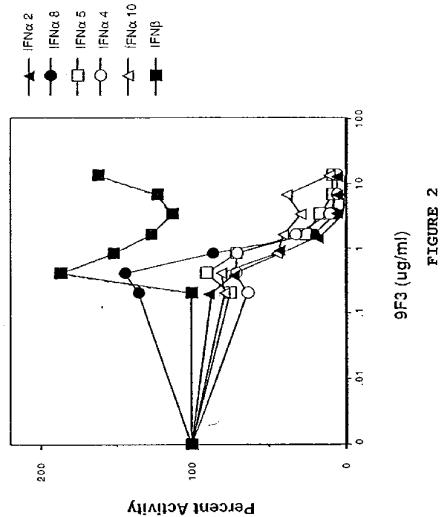


FIGURE 2

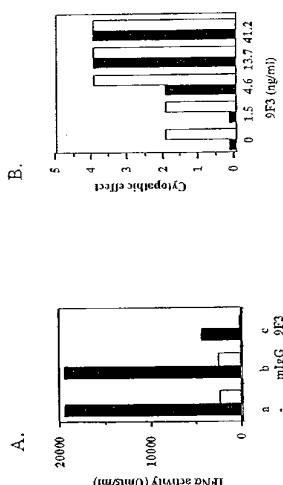


FIGURE 3

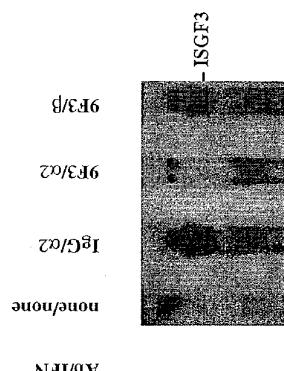


FIGURE 4

Figure 5A

## Variable Light Domain

	1	10	20	30	abcd	40	
murine	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSSYMHWYQQKPGQPPKVLIS						**
	**	*	**	*	*	*	
V13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSSSYMHWYQQKPGKAPKVLIS						*****
							*
hukI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIISN---YLAWYQQKPGKAPKLLIY						*
							-----
	50	60	70	80	90		
murine	YASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEGDTATYFCQHSGWGIPTF						
	*	*	*	*****	*	*	
V13	YASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSGWGIPTF						*****
	*	*					*
hukI	AASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSLPWTF						-----
							-----
	100						
murine	GAGTKLELRRAV						
	*	*	**	*			
V13	GQGTTKVEIKRTV						
hukI	GQGTTKVEIKRTV						

WO 02/066649

PCT/US02/02709

6/8

Figure 5B

### Variable Heavy Domain

	1	10	20	30	40	
murine	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEIYIHWVKQGHGRSLIEWI	***	***	***	***	***
V13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATGTYGFTFTEIYIHWVRQAPGKGLEWVA	***	***	***	***	***
huIII	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVA	-----			
	50	60	70	80	abc	90
murine	SINPDYDITNQNQRFKGKATLTDKSSRTAYLELRSLTSEDSAVYYCAS	***	***	*	***	*
V13	SINPDYDITNQNQRFKGRTFISLDKSKRTAYLQMNNSLRAEDTAVYYCAS	***	***	*	***	*
huIII	VISGDDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNNSLRAEDTAVYYCAR	-----				
	100					
murine	WISDFFDYWGQQTTLVMSAAS	***	*			
V13	WISDFFDYWGQQTTLVTVSSAS	*****				
huIII	GRVGYYYDYGQQTTLVTVSSAS					

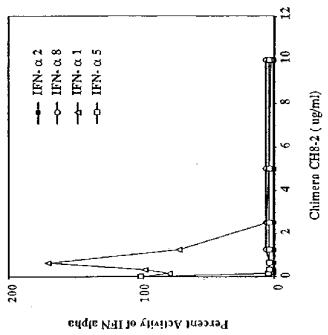
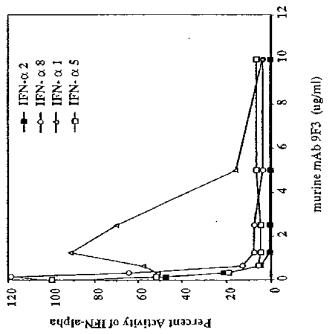


FIGURE 6



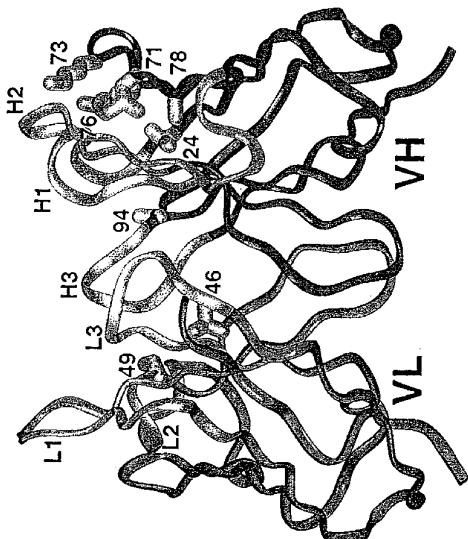


FIGURE 7

WO 02/066649

PCT/US02/02709

## SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.  
 Chuntharapai, Anan  
 Kim, Jin K.  
 Stewart, Timothy  
 Presta, Leonard G.

&lt;120&gt; ANTI-INTERFERON-ALPHA ANTIBODIES

&lt;130&gt; GENENT.074VPC

<150> 60/270775  
<151> 2001-02-22

&lt;160&gt; 14

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Murine

<400> 1  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Val Leu Ile Ser Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Glu Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Ser Trp  
 85 90 95  
 Gly Ile Pro Arg Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg  
 100 105 110  
 Ala Val

<210> 2  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Murine

<400> 2  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30  
 Ile Ile His Trp Val Lys Gln Gly His Gly Arg Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

WO 02/066649

PCT/US02/02709

Gly Ser Ile Asn Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Leu Met Val Ser Ala Ala Ser  
 115

<210> 3  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> This sequence represents a humanized chimeric  
 antibody comprising human and non-human sequences.

<400> 3  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 35 40 45  
 Lys Val Leu Ile Ser Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp  
 85 90 95  
 Gly Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Thr Val

<210> 4  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp

WO 02/066649

PCT/US02/02709

```

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> This sequence represents a humanized chimeric
      antibody comprising human and non-human sequences.

<400> 5
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
      1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
      20      25      30
Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Ser Ile Asn Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Lys Ser Lys Arg Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ser Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100      105      110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
      115

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
      1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20      25      30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100      105      110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
      115

```

WO 02/066649

PCT/US02/02709

<210> 7  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Tyr Ser Tyr Met His  
1 5 10 15

<210> 8  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1 5

<210> 9  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
Gln His Ser Trp Gly Ile Pro Arg Thr Phe  
1 5 10

<210> 10  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 10  
Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His  
1 5 10

<210> 11  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
Ser Ile Asn Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 12  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

WO 02/066649

PCT/US02/02709

<400> 12  
Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 13  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
gatcggaaaa gggaaaccga aactgaagcc 30

<210> 14  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
gatcggcttc agtttcggtt tccctttccc 30

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/066649 A2(51) International Patent Classification<sup>5</sup>: C12N 15/13, C07K 1/624, C12N 5/20, A61K 39/395, G01N 33/577, 33/68, A61P 37/06

(72) Inventors and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CHUNTARAPAI, Anan [US/US]; 826 Ellis Drive, Colma, CA 94015 (US); KIM, Jia, K. [US/US]; 22830 San Juan Road, Cupertino, CA 95014 (US); PRESTA, Leonard, G. [US/US]; 1900 Gough Street #106, San Francisco, CA 94109 (US); STEWART, Timothy [US/US]; 465 Douglas Street, San Francisco, CA 94114 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/02709

(74) Agent: DELANEY, Karoline, A.; Knobbe, Martens, Olson &amp; Bear, LLP; 620 Newport Center Drive, Sixteenth Floor, Newport Beach, CA 92660 (US).

(22) International Filing Date: 29 January 2002 (29.01.2002)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DL, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE, EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, IIR, IJU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ.

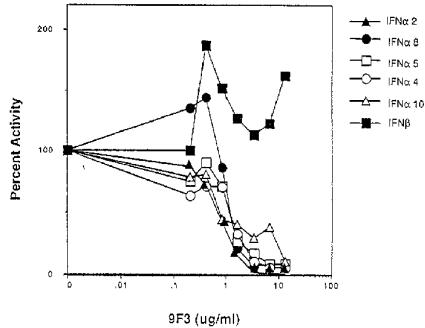
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

*[Continued on next page]*

(30) Priority Data: 60/270,775 22 February 2001 (22.02.2001) US 10/044,896 9 January 2002 (09.01.2002) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(54) Title: ANTI-INTERFERON- $\alpha$  ANTIBODIESNeutralization of IFN- $\alpha$  activities by mAb 9F3

WO 02/066649 A2

(57) Abstract: The present invention relates generally to the generation and characterization of neutralizing anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibodies with broad reactivity against various IFN- $\alpha$  subtypes. The invention further relates to the use of such anti-IFN- $\alpha$  antibodies in the diagnosis and treatment of disorders associated with increased expression of IFN- $\alpha$ , in particular, autoimmune disorders such as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and systemic lupus erythematosus (SLE).

## WO 02/066649 A2



OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN, TR, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**Published:**  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(48) Date of publication of this corrected version:  
17 October 2002

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR); OAPI patent (BJ, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NF, SN, TD, TG).

(15) Information about Correction:  
see PCT Gazette No. 42/2002 of 17 October 2002, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/066649 A3(51) International Patent Classification<sup>5</sup>: C12N 15/13,  
C07K 16/24, C12N 5/20, A61K 39/395, G01N 33/577,  
53/68, A61P 37/06KIM, Jin, K. [US/US]; 22830 San Juan Road, Cupertino,  
CA 95014 (US). PRESTA, Leonard, G. [US/US];  
1900 Gough Street #106, San Francisco, CA 94109 (US).  
STEWART, Timothy [US/US]; 465 Douglas Street, San  
Francisco, CA 94114 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/02709

(22) International Filing Date: 29 January 2002 (29.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/270,775 22 February 2001 (22.02.2001) US  
10/044,896 9 January 2002 (09.01.2002) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

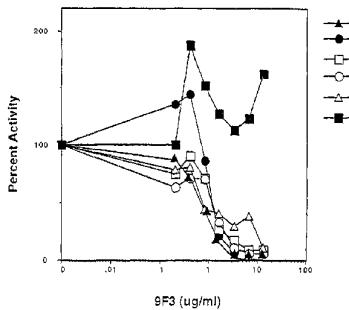
(75) Inventors/Applicants (for US only): CHUNTARAPAI, Anan [US/US]; 826 Ellis Drive, Colma, CA 94015 (US).

(74) Agent: DELANEY, Karoline, A.; Knobbe, Martens, Olson &amp; Bear, LLP; 620 Newport Center Drive, Sixteenth Floor, Newport Beach, CA 92660 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DF (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EB (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[Continued on next page]

(54) Title: ANTI-INTERFERON- $\alpha$  ANTIBODIESNeutralization of IFN- $\alpha$  activities by mAb 9F3(57) Abstract: The present invention relates generally to the generation and characterization of neutralizing anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibodies with broad reactivity against various IFN- $\alpha$  subtypes. The invention further relates to the use of such anti-IFN- $\alpha$  antibodies in the diagnosis and treatment of disorders associated with increased expression of IFN- $\alpha$ , in particular, autoimmune disorders such as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and systemic lupus erythematosus (SLE).

WO 02/066649 A3

---

**WO 02/066649 A3**

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

**Published:**  
with international search report

**(88) Date of publication of the international search report:**  
3 April 2003

**(15) Information about Correction:**  
**Previous Correction:**  
see PCT Gazette No. 42/2002 of 17 October 2002, Section II

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

[CORRECTED VERSION]

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/066649 A3(51) International Patent Classification<sup>5</sup>: C12N 15/13,  
C07K 16/24, C12N 5/20, A61K 39/395, G01N 33/577,  
33/68, A61P 37/06KIM, Jin, K. [US/US]; 22830 San Juan Road, Cupertino,  
CA 95014 (US); PRESTA, Leonard, G. [US/US];  
1900 Gough Street #106, San Francisco, CA 94109 (US);  
STEWART, Timothy [US/US]; 465 Douglas Street, San  
Francisco, CA 94114 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/02709

(22) International Filing Date: 29 January 2002 (29.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/270,775 22 February 2001 (22.02.2001) US  
10/044,896 9 January 2002 (09.01.2002) US

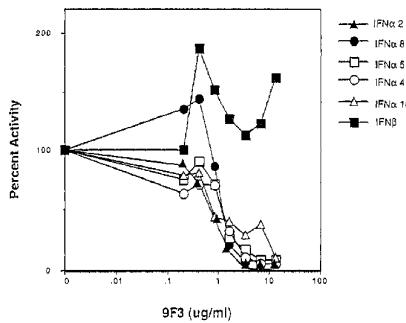
(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CHUNTARAPAI, Anan [US/US]; 826 Ellis Drive, Colma, CA 94015 (US).

(74) Agent: DAIGNAULT, Ronald, A.; Merchant & Gould  
PC, P.O. Box 2903, Minneapolis, MN 55402-0903 (US).(81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU,  
CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility  
model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI  
(utility model), FI, GB, GD, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM,  
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model),  
SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW).

[Continued on next page]

(54) Title: ANTI-INTERFERON- $\alpha$  ANTIBODIESNeutralization of IFN- $\alpha$  activities by mAb 9F3

WO 02/066649 A3

(57) Abstract: The present invention relates generally to the generation and characterization of neutralizing anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibodies with broad reactivity against various IFN- $\alpha$  subtypes. The invention further relates to the use of such anti-IFN- $\alpha$  antibodies in the diagnosis and treatment of disorders associated with increased expression of IFN- $\alpha$ , in particular, autoimmune disorders such as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and systemic lupus erythematosus (SLE).

---

**WO 02/066649 A3**

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

**Published:**  
— with international search report

**(88) Date of publication of the international search report:**  
3 April 2003

**(48) Date of publication of this corrected version:**  
6 November 2003

**(15) Information about Corrections:**  
see PCT Gazette No. 45/2003 of 6 November 2003, Section II  
**Previous Correction:**  
see PCT Gazette No. 42/2002 of 17 October 2002, Section II

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/US 02/02709						
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/13 C07K16/24 C12N5/20 A61K39/35 G01N33/577 G01N33/68 A61P37/06								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, PAJ								
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 4 885 166 A (GRUETTER MARKUS G ET AL) 5 December 1989 (1989-12-05) column 16, line 48-column 17, line 6; column 18, lines 12-23; column 19, lines 10-3; examples --- US 4 902 618 A (BERG KURT F) 20 February 1990 (1990-02-20) column 3, line 64-column 4, line 49; examples --- -/-</td> <td>1-54</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 4 885 166 A (GRUETTER MARKUS G ET AL) 5 December 1989 (1989-12-05) column 16, line 48-column 17, line 6; column 18, lines 12-23; column 19, lines 10-3; examples --- US 4 902 618 A (BERG KURT F) 20 February 1990 (1990-02-20) column 3, line 64-column 4, line 49; examples --- -/-	1-54
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	US 4 885 166 A (GRUETTER MARKUS G ET AL) 5 December 1989 (1989-12-05) column 16, line 48-column 17, line 6; column 18, lines 12-23; column 19, lines 10-3; examples --- US 4 902 618 A (BERG KURT F) 20 February 1990 (1990-02-20) column 3, line 64-column 4, line 49; examples --- -/-	1-54						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the priority date of another document as a special reference(s) specified *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other specific documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family								
Date of the actual completion of the international search  26 November 2002	Date of mailing of the international search report  11/12/2002							
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer  Renggli, J							

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In nat Application No PCT/US 02/02709
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE BIOSIS 'Online' BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; March 1999 (1999-03) SEIFARTH C ET AL: "Augmented immune response to islet cell antigens and development of diabetes mellitus under treatment with interferon-alpha in chronic hepatitis C." Database accession no. PREV199900278161 XPO02222364 abstract & ZEITSCHRIFT FUER GASTROENTEROLOGIE, vol. 37, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 235-239, ISSN: 0044-2771 ---	1-54
Y	DATABASE BIOSIS 'Online' BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 OKANOUE TAKESHI ET AL: "Side effects of high-dose interferon therapy for chronic hepatitis C." Database accession no. PREV199699251234 XPO02222368 abstract & JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 25, no. 3, 1996, pages 283-291, ISSN: 0168-8278 ---	1-54
Y	DATABASE MEDLINE 'Online' February 1998 (1998-02) JONES T H ET AL: "Endocrine-mediated mechanisms of fatigue during treatment with interferon-alpha." Database accession no. NLM9482541 XPO02222365 abstract & SEMINARS IN ONCOLOGY. UNITED STATES FEB 1998, vol. 25, no. 1 Suppl 1, February 1998 (1998-02), pages 54-63, ISSN: 0093-7754 ---	1-54
Y	US 6 180 370 B1 (QUEEN CARY L ET AL) 30 January 2001 (2001-01-30) the whole document ---	1-54
Y	WO 96 34096 A (CELL GENESYS INC) 31 October 1996 (1996-10-31) the whole document ---	1-54
		-/-

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/US 02/02709
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LITTLE M ET AL: "Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 364-370, XP004215163 ISSN: 0167-5699 the whole document ----</p>	1-54
A	<p>ANONYMOUS: "Human interferon alpha subtypes" DIAGNOSTIC RESEARCH INC., 'Online! February 1999 (1999-02), XP002222363 Retrieved from the Internet: &lt;URL:<a href="http://www.researchd.com/cytokines/ifnasubt.htm">http://www.researchd.com/cytokines/ifnasubt.htm</a>&gt; 'retrieved on 2002-11-25! the whole document ----</p>	1-54

Form PCT/SA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		National application No. PCT/US 02/02709
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>		
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort, justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li> <li>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims. It is covered by claims Nos.:</li> </ol>		
<b>Remark on Protest</b>		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/US 02 A2709

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/US/ 210

## Continuation of Box I.1

Although claim 49 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 50-54 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l	nsi Application No
PCT/US 02/02709	

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4885166	A	05-12-1989	AT 78262 T AU 598196 B2 AU 5849986 A CA 1285507 A1 CY 1842 A DE 3685996 D1 DE 3685996 T2 DK 168794 B1 EP 0205404 A2 ES 555863 D0 ES 8801384 A1 FI 862461 A ,B, GR 861497 A1 HK 99895 A HU 41846 A2 IE 57865 B1 IL 79085 A JP 1931151 C JP 6055759 B JP 6200600 A JP 2006845 C JP 5308973 A JP 7036757 B KR 9202267 B1 NO 862313 A ,B, NZ 216485 A NZ 227372 A PH 24858 A PT 82736 A ,B SG 25195 G US 5071761 A ZA 8604342 A	15-08-1992 21-06-1990 18-12-1986 02-07-1991 08-03-1996 20-08-1992 14-01-1993 13-06-1994 17-12-1986 01-01-1988 01-03-1988 12-12-1986 10-10-1986 30-06-1995 28-05-1987 05-05-1993 29-03-1992 12-05-1995 27-07-1994 12-01-1987 11-01-1996 22-11-1993 26-04-1995 20-03-1992 12-12-1986 25-06-1991 25-06-1991 26-12-1990 01-07-1986 18-08-1995 10-12-1991 28-01-1987
US 4902618	A	20-02-1990	CA 1306961 A1 EP 0139676 A1 JP 60500864 T WO 8403106 A1 DE 3485994 D1 DE 3485994 T2	01-09-1992 08-05-1985 06-06-1985 16-08-1984 07-01-1993 09-06-1993
US 6180370	B1	30-01-2001	US 5530101 A AU 7548196 A AU 671949 B2 AU 9172691 A CA 2098404 A1 EP 0566647 A1 JP 6503963 T JP 3276369 B2 KR 231090 B1 WO 9211018 A1 US 5693761 A US 5585089 A US 5693762 A AT 133452 T AT 183753 T AU 647383 B2 AU 5153290 A BG 61095 B2	25-06-1996 20-02-1997 19-09-1996 22-07-1992 20-06-1992 27-10-1993 12-05-1994 22-04-2002 15-11-1999 09-07-1992 02-12-1997 17-12-1996 02-12-1997 15-02-1996 15-09-1999 24-03-1994 13-08-1990 31-10-1996

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor Application No  
PCT/US 02/02709

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6180370	B1	CA 2006865 A1 CA 2328851 A1 CN 1043875 A, B CZ 9104186 A3 DE 10075005 11 DE 68925536 D1 DE 68925536 T2 DE 68929061 D1 DE 68929061 T2 DK 94198 A DK 119191 A EP 0451216 A1 EP 0682040 A1 EP 0939127 A2 ES 2081974 T3 ES 2136760 T3 FI 108797 B1 HK 1014718 A1 HR 920500 A1 HU 9500236 A3 JP 11004694 A JP 2828340 B2 KR 178385 B1 LU 90411 A9 LU 90528 A9 LU 90676 A9 MC 2146 A NO 912385 A NZ 231984 A NZ 314793 A	28-06-1990 28-06-1990 18-07-1990 13-10-1993 23-11-2000 07-03-1996 20-06-1996 30-09-1999 27-04-2000 16-07-1998 19-06-1991 16-10-1991 15-11-1995 01-09-1999 16-03-1996 01-12-1999 28-03-2002 14-07-2000 30-04-1996 28-09-1995 12-01-1999 25-11-1998 01-04-1999 02-09-1999 11-04-2000 05-02-2001 18-02-1992 19-06-1991 24-06-1997 29-11-1999
WO 9634096	A 31-10-1996	CA 2219486 A1 WO 9634096 A1 AU 2466895 A EP 0823941 A1 JP 11505107 T	31-10-1996 31-10-1996 18-11-1996 18-02-1998 18-05-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 16/24	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 15/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	P
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	Z T D C
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P,L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 キム,ジン,ケイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95014, クパチーノ, サン ジュアン ロード 22  
830

(72)発明者 プレスター,レオナード,ジー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94109, サン フランシスコ, ゴフ ストリート 1  
900 106号

(72)発明者 スチュワート,ティモシー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94114, サン フランシスコ, ダグラス ストリート  
465

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA57 BA61 CA02 CA07 DA03 DA06 GA11  
HA03 HA13 HA14  
4B064 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC01 CC24 CE12 DA01 DA13  
4B065 AA26X AA58X AA72X AA87X AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AB05  
AC14 BA02 BB01 BC03 BC26 BD01 BD14 CA25 CA43 CA44  
CA46  
4C085 AA14 BB17 BB36 BB43 BB44 DD62 EE01 GG01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50  
FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	抗干扰素α抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004533217A</a>	公开(公告)日	2004-11-04
申请号	JP2002566354	申请日	2002-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	チュンサラパイアン キムジンケイ プレスター・オナード・ジー スチュワート・ティモシー		
发明人	チュンサラパイ、アン キム、ジン、ケイ。 プレスター、レオナード、ジー。 スチュワート、ティモシー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/50 A61P17/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/24 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/16 C12N5/20 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/13 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/50 A61P7/06 A61P17/00 A61P19/04 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/249 C07K2317/24 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/00 G01N33/564 G01N33/6866 G01N2333/56 G01N2800/042 G01N2800/24		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.U A61P3/10 A61P5/14 A61P5/50 A61P17/00 A61P37/02 C07K16/24 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 G01N33/53.P C12N15/00.ZTD.C C12N5/00.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA57 4B024/BA61 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024 /DA03 4B024/DA06 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA13 4B024/HA14 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064 /DA13 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065 /AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB01 4B065/BC03 4B065/BC26 4B065/BD01 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085 /AA14 4C085/BB17 4C085/BB36 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045 /DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/270775 2001-02-22 US 10/044896 2002-01-09 US		
其他公开文献	JP4384853B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**

本发明一般涉及对各种IFN-γ亚型具有广泛反应性的中和抗IFN-γ单克隆抗体的产生和表征。本发明还涉及这种抗IFN-γ抗体在诊断和治疗与IFN-γ表达增加有关的疾病中的用途，特别是自身免疫疾病如胰岛素依赖性糖尿病 ( IDDM ) 和系统性红斑狼疮。 ( SLE ) 。

### Neutralization of IFN-alpha activities by mAb 9F3

