

(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2016-518330
(P2016-518330A)

(43) 公表日 平成28年6月23日 (2016. 6. 23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24 Z N A	4 B O 6 4
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
A61P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 H O 4 5
A61P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A61P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-501946 (P2016-501946)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月13日 (2014. 3. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年10月23日 (2015. 10. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/025701
 (87) 国際公開番号 W02014/151422
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014. 9. 25)
 (31) 優先権主張番号 61/788, 302
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

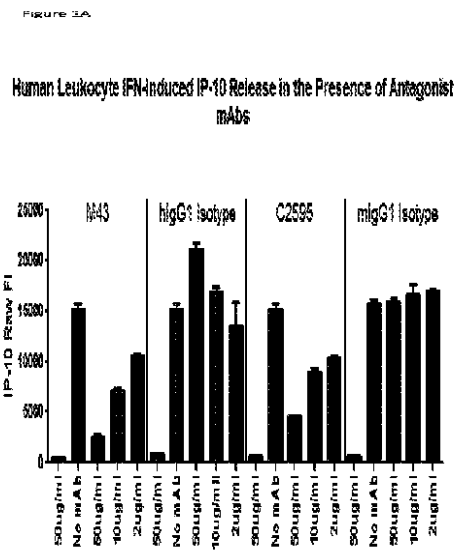
(71) 出願人 509087759
 ヤンセン バイオテック, インコーポレー
 テッド
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 4
 4 ホーシャム・リッジビュードライブ 8 0
 0 / 8 5 0
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100093676
 弁理士 小林 純子
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100153693
 弁理士 岩田 耕一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターフェロンアルファ及びオメガ抗体アンタゴニスト

(57) 【要約】

広域中和性のインターフェロン - 及びインターフェロン - 抗体アンタゴニスト、それらの抗体又はフラグメントをコードするポリヌクレオチド、及びそれらの作製方法並びに使用方法は、I F N 及び I F N の産生増加に関連する疾患の治療に有用である。I 型 I F N は、遍在的に発現するヘテロ二量体受容体 (I F N A R) を介して全てのシグナルが抗ウイルス、抗増殖、及び免疫調節作用に至るサイトカインのファミリーである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) ヒトインターフェロンオメガ (IFN ω)、及び (b) 少なくとも 4、5、6、7、8、9、又は 10 個のヒトインターフェロンアルファ (IFN α) サブタイプと結合し、それらの活性を中和する、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記抗体が、ヒト IFN α サブタイプ IFN α B2、IFN α F、IFN α G 及び IFN α J1 と結合し、それらの活性を中和する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体が、ヒト IFN α サブタイプ IFN α B2、IFN α C、IFN α F、IFN α G 及び IFN α J1 と結合し、それらの活性を中和する、請求項 1 に記載の抗体。 10

【請求項 4】

前記抗体が、ヒト IFN α サブタイプ IFN α B2、IFN α C、IFN α F、IFN α G、IFN α J1 及び IFN α A と結合し、それらの活性を中和する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体が、ヒト IFN α サブタイプ IFN α B2、IFN α C、IFN α F、IFN α G、IFN α J1、IFN α A 及び IFN α H2 と結合し、それらの活性を中和する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体が、ヒト IFN α サブタイプ IFN α B2、IFN α C、IFN α F、IFN α G、IFN α J1、IFN α A、IFN α H2 及び IFN α K と結合し、それらの活性を中和する、請求項 1 に記載の抗体。 20

【請求項 7】

前記抗体が、ヒト IFN α サブタイプ IFN α B2、IFN α C、IFN α F、IFN α G、IFN α J1、IFN α A、IFN α H2、IFN α K 及び IFN α WA と結合し、それらの活性を中和する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体が、ヒト IFN α サブタイプ IFN α B2、IFN α C、IFN α F、IFN α G、IFN α J1、IFN α A、IFN α H2、IFN α K、IFN α WA 及び IFN α 4a と結合し、それらの活性を中和する、請求項 1 に記載の抗体。 30

【請求項 9】

前記ヒト IFN α 及びヒト IFN α サブタイプの活性が、転写因子 2 (STAT2)、インターフェロン調節因子 9 (IRF9)、並びに分泌胚アルカリホスファターゼ (SEAP) のシグナル伝達因子及び活性化因子を安定に発現する HEK293 細胞における、インターフェロン誘導性 ISG54 プロモーター下での SEAP の阻害である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体が、実施例 3 における「親和性の測定」の項で定義した条件下で、約 5×10^{-8} M 未満、約 1×10^{-8} M 未満、約 1×10^{-9} M 未満、約 1×10^{-10} M 未満、約 1×10^{-11} M 未満、又は約 1×10^{-12} M 未満の IC₅₀ 値でヒト IFN α の活性を阻害し、且つ、 5×10^{-8} M 未満、約 1×10^{-8} M 未満、約 1×10^{-9} M 未満、約 1×10^{-10} M 未満、約 1×10^{-11} M 未満、又は約 1×10^{-12} M 未満の IC₅₀ 値で IFN α サブタイプ IFN α B2、IFN α F、IFN α G 又は IFN α J1 の活性を阻害する、請求項 9 に記載の抗体。 40

【請求項 11】

前記抗体が、実施例 3 における「親和性の測定」の項で定義した条件下で、約 5×10^{-9} M 未満、約 1×10^{-9} M 未満、約 5×10^{-10} M 未満、約 1×10^{-10} M 未満、約 5×10^{-11} M 未満、約 1×10^{-11} M 未満、約 5×10^{-12} M 未満又は約 5×10^{-12} M 未満の解離定数 (K_D) のヒト IFN α と結合し、約 5×10^{-9} M 未満、約 1×10^{-9} M 未満、約 50

5×10^{-10} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 5×10^{-11} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 5×10^{-12} M未満、又は約 5×10^{-12} M未満の K_D のヒト IFN サブタイプ IFN B 2、IFN F、IFN G 又は IFN J 1 と結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 1 2】

前記抗体が、ヒト IFN 、並びにヒト IFN サブタイプ IFN B 2、IFN F、IFN G 及び / 又は IFN J 1 との結合のために、

a) 重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列 (配列番号 2 3)、及び軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列 (配列番号 2 4)、又は、

b) VH アミノ酸配列 (配列番号 2 7)、及び VL アミノ酸配列 (配列番号 2 8)

を含む単離抗体と競合する、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 1 3】

前記抗体が、配列番号 1 の残基 F 2 7、L 3 0、及び R 3 3 の 1 つ以上で IFN と結合する、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

前記抗体が、配列番号 1 の残基 F 2 7、L 3 0、及び R 3 3 で IFN と結合する、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

前記抗体が、配列番号 1 の残基 P 2 6、K 3 1、及び R 3 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つの IFN 残基と更に結合する、請求項 1 3 に記載の抗体。

20

【請求項 1 6】

前記抗体が、配列番号 1 の残基 R 2 2、R 2 3、I 2 4、S 2 5、P 2 6、K 3 1、D 3 2、R 3 4、D 3 5、Q 4 0、K 1 3 4、M 1 4 6、E 1 4 7、M 1 4 9、K 1 5 0、F 1 5 3 及び L 1 5 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つの IFN 残基と更に結合する、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

前記抗体が、配列番号 1 9 の残基 F 2 7、L 3 0、及び R 3 3 の 1 つ以上で IFN 4 a と結合する、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

前記抗体が、配列番号 1 9 の残基 F 2 7、L 3 0、及び R 3 3 で IFN 4 a と結合する、請求項 1 7 に記載の抗体。

30

【請求項 1 9】

前記抗体が、配列番号 1 9 の残基 H 2 6、K 3 1、及び R 3 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つの IFN 4 a 残基と更に結合する、請求項 1 7 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

前記抗体が、配列番号 1 9 の残基 A 1 9、G 2 2、R 2 3、I 2 4、S 2 5、H 2 6、C 2 9、K 3 1、D 3 2、H 3 4、D 3 5、V 1 4 3、A 1 4 6、E 1 4 7、M 1 4 9、R 1 5 0 及び S 1 5 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの IFN 4 a 残基と更に結合する、請求項 1 6 に記載の抗体。

【請求項 2 1】

前記抗体がウイルス誘導性白血球インターフェロンの活性を阻害する、請求項 1 2 に記載の抗体。

40

【請求項 2 2】

前記ウイルス誘導性白血球インターフェロンの活性が、100 U / mL のインターフェロンによって誘導された全血中の IP - 1 0 の放出である、請求項 2 1 に記載の抗体。

【請求項 2 3】

前記活性が、50 μ g / mL の抗体の存在下で 50 % 超阻害される、請求項 2 2 に記載の抗体。

【請求項 2 4】

前記抗体が、全身性エリテマトーデス (SLE) 免疫複合体によって誘導される IFN

50

の活性を阻害する、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 2 5】

前記活性が、約 5 0 % 超阻害される、請求項 2 4 に記載の抗体。

【請求項 2 6】

a) 重鎖可変領域 (V H) アミノ酸配列 (配列番号 2 3)、及び軽鎖可変領域 (V L) アミノ酸配列 (配列番号 2 4)、又は、

b) 重鎖可変領域 (V H) アミノ酸配列 (配列番号 2 7)、及び軽鎖可変領域 (V L) アミノ酸配列 (配列番号 2 8)

を含む、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 2 7】

前記抗体がヒトインターフェロン - (I F N) と結合せず、中和しない、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 2 8】

前記抗体がヒト I F N D と結合せず、中和しない、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 2 9】

前記抗体が、ヒト、ヒト化、又はヒト適応型である、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 3 0】

前記抗体が、 I g G 1 型、 I g G 2 型、 I g G 3 型、又は I g G 4 型アイソタイプである、請求項 2 9 に記載の抗体。

【請求項 3 1】

前記抗体が二重特異性である、請求項 2 9 に記載の抗体。

【請求項 3 2】

前記抗体が、 B L y s、 C D 4 0 L、 I L - 6、 C D 2 7、 B D C A 2、又は I L - 1 2 若しくは I L - 2 3 の p 4 0 サブユニットと結合する、請求項 3 1 に記載の抗体。

【請求項 3 3】

請求項 1 又は請求項 1 2 に記載の抗体と、製薬上許容された担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項 3 4】

I F N 及び I F N の産生の増加に関連する疾病を治療又は予防する方法であって、請求項 1 2 に記載の単離された抗体の治療上の有効量を、それを必要とする患者に、その疾病の治療又は予防のために十分な時間にわたって投与することを含む、前記方法。

【請求項 3 5】

前記疾患が免疫媒介炎症性疾患である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記免疫媒介炎症性疾患が全身性エリテマトーデス (S L E)、I 型糖尿病、乾癬、原発性シェーグレン病、全身性硬化症、又は関節リウマチである、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記患者が I 型インターフェロンシグネチャを示す、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 8】

請求項 1 2 に記載の抗体が、二重特異性抗体である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記二重特異性抗体が、 B L y s、 C D 4 0 L、 I L - 6、 C D 2 7、 B D C A 2、又は I L - 1 2 若しくは I L - 2 3 の p 4 0 サブユニットと結合する、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

I F N、並びに I F N サブタイプ I F N B 2、I F N C、I F N F、I F N G 及び / 又は I F N J 1 と、I F N A R との相互作用を阻害する方法であって、これを必要とする患者において、I F N、並びに I F N サブタイプ I F N B 2、I F N C、I F N F、I F N G 及び / 又は I F N J 1 と、I F N A R との相互作用を防

10

20

30

40

50

ぐために十分な時間をかけて、請求項 1 2 に記載の単離された抗体を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 4 1】

前記患者が免疫媒介炎症性疾患を有する、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記免疫媒介炎症性疾患が、S L E、I 型糖尿病、乾癬、原発性シェーグレン病、全身性硬化症、又は関節リウマチである、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記患者が I 型インターフェロンシグネチャを示す、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記抗体が、二重特異性抗体である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記二重特異性抗体が、B L y s、C D 4 0 L、I L - 6、C D 2 7、B D C A 2、又は I L - 1 2 若しくは I L - 2 3 の p 4 0 サブユニット、あるいは B D C A 2 と結合する、請求項 4 4 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、広域中和インターフェロン 抗体アンタゴニスト及びインターフェロン 抗体アンタゴニスト、並びにそれらの抗体又はフラグメントをコードしたポリヌクレオチド、及び上記を製造及び使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

I 型 I F N は、遍在的に発現するヘテロ二量体受容体 (I F N A R) を介して全てのシグナルが抗ウイルス、抗増殖、及び免疫調節作用に至るサイトカインのファミリーである。ヒトにおいては、I 型 I F N は、少なくとも 1 2 の I F N タンパク質サブタイプと、I F N 、 I F N 、 I F N 、及び I F N のそれぞれの 1 つのサブタイプとで構成されている。I 型 I F N の誘導は、無菌リガンド及び微生物リガンドの両方に応答して生じる。I 型 I F N の抗ウイルス及び抗増殖作用は、感染症及び腫瘍学的適応症のために診療所で利用されてきたが、I 型 I F N のアンタゴニストが、免疫媒介炎症性適応症のために開発されている。

【0 0 0 3】

S L E、I 型糖尿病、乾癬、原発性シェーグレン病、全身性硬化症及び慢性関節リウマチなどの複数の免疫媒介性炎症性疾患は、全血及び / 又は組織中に存在する一般に I F N シグネチャと呼ばれる I F N 誘導性の遺伝子転写物の過剰によって決定される様々な程度の上昇型 I F N の証拠を呈する。

【0 0 0 4】

ループスのために現在臨床開発中の I 型 I F N アンタゴニストのアプローチとしては、I F N サブタイプを中和する複数のアプローチが含まれ、抗 I F N 抗体が用いられるその他の I 型 I F N (、 、) は含まれない (例えば、米国特許第 7 , 0 8 7 , 7 2 6 号、同第 8 , 0 2 5 , 8 8 2 号、及び米国特許出願公開第 U S 2 0 0 8 / 0 1 6 0 0 3 0 号に記載されているものなど)。臨床試験のデータは、抗 I F N 抗体で治療した患者における I 型 I F N シグネチャの部分的低減 (M e r r i l l ら、A n n R h e u m D i s 7 0 : 1 9 0 5 ~ 1 9 1 3 , 2 0 1 1 ; Y a o ら、A r t h r i t i s R h e u m 6 0 : 1 7 8 5 ~ 1 7 9 6 , 2 0 0 9) 及び、インターフェロンシグネチャメトリック (I S M) の軽度及び中程度から重度の活性なループスの被験者の予め特定したバイオマーカー定義群において 2 4 週に S L E、フレア率、並びにステロイド負担の兆候及び症状の改善を示している。高 I S M として予め定義された患者には効能は認められなかった (K a l u n i a n ら、2 0 1 2 A C R / A R H P A n n u a l M e e t i n g ; A b s t r a c t # 2 6 2 2 , 2 0 1 2) 。

10

20

30

40

50

【0005】

抗IFNAR1抗体は、ループスの治療の代替手段である(Wangら、2013; Clinical Pharmacology & Therapeutics accepted article preview 14 February 2013; doi:10.1038/clpt.2013.35)。IFNを含む全てのI型IFNによって誘導されるIFNシグナル伝達を中止するために、IFNAR1の遮断が予測される。遺伝子をコードするIFNの特異的欠失は、機能的IFNを有する同様に曝露されたマウスと比較すると、ウイルス宿主の実質的な感受性を被るので、IFNは、抗ウイルス防衛においてより重要な役割を果たすことができる(Lazearら、J Virol 85:7186~7194, 2011; Deonarainら、J Virol 74:3404~340, 2000; Deonarainら、Circulation 110:3540~3543, 2004; Gerlachら、J Virol 80:3438~3444, 2006)。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、ループス及び他の免疫媒介炎症性疾患の治療のための追加的な抗体が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の一態様は、ヒトインターフェロンオメガ(IFN ω)及び少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10のヒトインターフェロンアルファ(IFN α)サブタイプと結合し、それらの活性を中和する、単離されたモノクローナル抗体である。

20

【0008】

本発明の他の態様において、単離された抗体は、ヒトIFN α 及びヒトIFN α サブタイプIFN α B2、IFN α F、IFN α G及び/又はIFN α J1との結合のために、重鎖可変領域(VH)アミノ酸配列(配列番号23)、及び軽鎖可変領域(VL)アミノ酸配列(配列番号24)、又は、

VHアミノ酸配列(配列番号27)、及びVLアミノ酸配列(配列番号28)を含む単離抗体と競合する。

30

【0009】

本発明の更なる態様において、単離された抗体は、配列番号1の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN α と結合し、単離された抗体は、配列番号19の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN α 4aと結合し、単離された抗体は、全身性エリテマトーデス(SLE)免疫複合体で誘導されたIFNの活性を阻害する。

【0010】

本発明の追加の態様は、本発明の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチド、及び本発明の抗体と医薬的に許容される担体とを含む医薬組成物である。

【0011】

本発明の更なる態様は、治療上の有効量の本発明の単離された抗体を、それらを必要とする患者に、その疾病の治療又は予防のために十分な時間にわたって投与することを含む、IFN α 及びIFN α の産生の増加に関連する疾病の治療方法又は予防方法である。本発明の追加の態様において、IFN α 及びIFN α の産生の増加に関連する疾病は、全身性エリテマトーデス(SLE)である。

40

【0012】

本発明の別の態様は、IFN α 及びIFN α サブタイプIFN α B2、IFN α F、IFN α G及び/又はIFN α J1とIFNARの相互作用を阻害する方法を、それを必要とする患者において行う方法であって、IFN α 及びIFN α サブタイプIFN α B2、IFN α C、IFN α F、IFN α G及び/又はIFN α J1とIFNARとの相互作用を防ぐために十分な時間にかけて、本発明の単離された抗体を患者に投与することを含む

50

。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1A) 100 U/mlの内因性白血球IFN(ウイルス誘発した)又は図1B) 特定濃度の250 U/mlの組換えヒトIFN によって誘導した全血中に放出されたIP-10の阻害を示す。

【図2】示されているように、様々な抗体による全身性エリテマトーデス(SLE)患者由来の免疫複合体により誘導されたI型IFNの阻害を示す。抗IFN 1と抗IFN 抗体単独と比較してより顕著な阻害をもたらす。広域中和抗IFN / IFN 抗体(M43)は、総活性の更なる抑制を示した。

【図3】抗IFN 抗体、又はそれら2つの組み合わせによる、上昇SLE遺伝子シグネチャの阻害率(%)を示す。抗体治療の非存在下でのベースライン上昇IFN誘導性遺伝子発現は100%に正規化した。

【図4】IFN / FabM43複合体の全体分子構造を示す。Hの標識はVH、Lの標識はVL、左上はIFN である。

【図5】図5A) IFN 4A / Fab357複合体及び図5B) IFN / Fab357複合体の全体分子構造を示す。Fabについては、Fv部分だけが示されている。Fab537はC2595のFabである。

【図6】6A) IFN 4A / FabM88複合体の全体分子構造を示す。図6B) 抗原結合部位中のエピトープ領域の部分の周りの代表的な電子密度(1.5 Åで2mF_o-D_FC)。Hの標識はVH、Lの標識はVL、左上はIFN 4Aである。

【図7】IFN 4Aの構造及びIFN 並びにIFN との比較を示す。図7A) IFN 4A。5つの主要なヘリックスが標識されている。長い接続ループABもまた、短いヘリカルセグメントの隣で標識されている。図7B) IFN (pdbコード3se4) 及び図7C) IFN (pdb id 1au1)。図7D) IFN との構造比較。ABヘリカルセグメントの周りの主な違いを楕円により示す。

【図8】M88による中和モード。IFN / IFNAR1 / IFNAR2構造(pdb id 3se4) 及びM88 / IFN 4をIFNの上に重ね合わせた。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書に引用される特許及び特許出願を含む(ただしそれらに限定されない)全ての刊行物は、参照により恰もそれらの全体が記載されているものと同様にして、本明細書に援用するものである。

【0015】

本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を記載する目的でのみ使用され、限定を意図するものではないと理解すべきである。特に断らないかぎり、本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

【0016】

本明細書に記載されているものと同様又は同等の任意の方法及び材料を、本発明の試験を実施するために使用できるが、例示となる材料及び方法を本明細書に記載する。本発明を説明及び特許請求するうえで以下の用語が用いられる。

【0017】

用語「特異的結合」又は「特異的結合する」又は「結合する」とは、本明細書で使用されるとき、抗体が所定の抗原と、他の抗原とよりも高い親和性で結合することを指す。典型的には、抗体は、 1×10^{-7} M未満、例えば 1×10^{-8} M未満、 1×10^{-9} M未満、 1×10^{-10} M未満、 1×10^{-11} M未満、又は 1×10^{-12} M未満の解離定数(K_D)で既定の抗原に結合し、非特異的抗原又はエピトープ(例えばBSAカゼイン)への結合に関しては、典型的には、その K_D より少なくとも10倍小さい K_D で結合する。解離定数は標準

10

20

30

40

50

的手法を用いて測定することができる。しかし、所定の抗原と特異的結合する抗体は、他の関連抗原、例えばヒト又はサル、例えばカニクイザル (*cynomolgus*) 又は *Pan troglodytes* (チンパンジー) などの他の種から得た同様の所定の抗原 (ホモログ) と交差反応性を示す可能性もある。既定の抗原と特異的結合する抗体は、更に、例えばインターフェロナルファ (IFN α) 及びインターフェロンオメガ (IFN ω) のような2つ以上の異なる抗原間で共有されるエピトープに結合することができる、すなわち、抗体はIFN α 及びIFN ω と交差反応する。

【0018】

本明細書で使用する用語「中和」又は「中和する」又は「中和抗体」又は「抗体アンタゴニスト」とは、任意の機構によって、インターフェロナルファ (IFN α) 及び/又はインターフェロンオメガ (IFN ω) の生物活性を部分的に又は完全に阻害する抗体又は抗体フラグメントを指す。中和抗体は、以下のようにIFN α 及び/又はIFN ω の生物活性のアッセイを用いて同定することができる。IFN α 及び/又はIFN ω 中和抗体は、測定されるIFN α 及び/又はIFN ω の生物活性を20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%阻害することが可能である。

10

【0019】

本明細書で使用する用語「インターフェロン α 」(IFN α) は、ヒトアルファインターフェロンの全てのネイティブのサブタイプを指す。ネイティブのIFN α は、構造的相同性の高い別個の遺伝子によってコードされた23以上の密接に関連するタンパク質のサブタイプで構成されている (Weissmann及びWeber, *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 33:251, 1986; Robertsら, *J. Interferon Cytokine Res.* 18:805~816, 1998)。ヒトIFN α サブタイプは、少なくとも、IFN α A (IFN α 2) (配列番号5)、IFN α B2 (IFN α 8) (配列番号6)、IFN α C (IFN α 10) (配列番号7)、IFN α D (IFN α 1) (配列番号8)、IFN α F (IFN α 21) (配列番号9)、IFN α G (IFN α 5) (配列番号10)、及びIFN α H (IFN α 14) (配列番号11)、P34H置換基を伴うIFN α I (IFN α 17) (配列番号12)、IFN α J1 (IFN α 7) (配列番号13)、IFN α K (IFN α 6) (配列番号14)、IFN α 4b (IFN α 4) (配列番号15)、及びIFN α WA (IFN α 6) (配列番号16)である。ヒトインターフェロンの命名法は、http://www.genenames.org/gene_families/_IFNに見出される。

20

30

【0020】

本明細書で使用する用語IFN α は、ヒトIFN α であって、配列番号1に示されるアミノ酸配列及びUniProtアクセッション番号P05000を有するものを指す。

【0021】

用語「I型インターフェロン」は、ヒトインターフェロンの全てのサブタイプ及びインターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、及びインターフェロン δ の1つのサブタイプを指し、共通インターフェロン受容体IFNARに結合する。

【0022】

本明細書で使用する用語「INFAR」は、ヘテロダイマーまたはIFNAR1及びIFNAR2である周知のインターフェロン受容体を指す。IFNAR1及びIFNAR2のタンパク質配列は、配列番号31及び32にそれぞれ示される。INFAR1の成熟細胞外ドメインは、配列番号31の残基28~436の範囲であり、INFAR2の成熟細胞外ドメインは、配列番号32の残基27~243の範囲である。

40

【0023】

本明細書で使われるとき、「抗体」という用語は、広義で意図され、ポリクローナル抗体、マウス、ヒト、ヒト適合性、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体、抗体フラグメント、少なくとも2つの無傷の抗体若しくは抗体フラグメント又は二量体の、四量体の若しくは多量体の抗体から形成される二重特異性抗体又は多重特

50

異性抗体、並びに一本鎖抗体を含む、免疫グロブリン分子を含む。

【0024】

免疫グロブリンは、重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じてIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つの大きなクラスに分類することができる。IgA及びIgGは、更に、アイソタイプIgA₁、IgA₂、IgG₁、IgG₂、IgG₃及びIgG₄に下位分類される。あらゆる脊椎動物種の抗体の軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて2つの明確に異なるタイプ、すなわちカッパ()及びラムダ()のうちの1つに分類することができる。

【0025】

用語「抗体フラグメント」とは、重鎖及び/又は軽鎖抗原結合部位、例えば、重鎖相補性決定領域(HCDR)1、2及び3、軽鎖相補性決定領域(LCDR)1、2及び3、重鎖可変領域(VH)、又は軽鎖可変領域(VL)を保有する免疫グロブリン分子の一部を指す。抗体フラグメントとしては、周知のFab、F(ab')₂、Fd及びFvのフラグメント、並びに1つのVHドメインからなるドメイン抗体(dAb)が挙げられる。VHドメイン及びVLドメインは、互いに合成リンカーを介して結合することで様々なタイプの一本鎖抗体設計を形成する可能性があり、VHドメイン及びVLドメインが別々の一本鎖抗体構築物で発現される場合は、VH/VLドメインが分子内又は分子間で対を成して、一本鎖Fv(scFv)又はダイアボディなどの一価の抗原結合部位を形成する(これらは、例えば国際特許出願公開第WO1998/44001号、国際特許出願公開第WO1988/01649号、国際特許出願公開第WO1994/13804号、国際特許出願公開第WO1992/01047号に記載されている)。

【0026】

抗体可変領域は、3つの「抗原結合部位」で遮られた「フレームワーク」領域からなる。抗原結合部位は、様々な用語を使用して定義される:(i)配列可変性に基づく相補性決定領域(CDR)が、VH内に3つ(HCDR1、HCDR2、HCDR3)及びVL内に3つ(LCDR1、LCDR2、LCDR3)存在する(Wu and Kabat, J. Exp. Med. 132:211~50, 1970; Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)。(ii)「高頻度可変領域」すなわち「HVR」又は「HV」が、VH内に3つ(H1、H2、H3)及びVL内に3つ(L1、L2、L3)存在する。この領域は、抗体可変ドメインであり、Chothia and Lesk(Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901~17, 1987)により定義される構造中で、高頻度可変性を示す。他の用語には、「IMGT-CDR」(Lefrancら著、Dev. Comparat. Immunol. 第27巻、55~77頁、2003年)及び「特異性決定残基使用」(SDRU)(Almagro著、Mol. Recognit., 第17巻、132~143頁、2004年)が含まれる。International Immunogenetics(IMGT)データベース([http://www_imgt.org](http://www.imgt.org))は、抗原結合部位の標準化ナンバリング及び定義を規定する。各CDR、HV及びIMGTの表記の間の対応についてはLefrancら著、Dev. Comparat. Immunol. 第27巻、55~77頁、2003年に述べられている。

【0027】

本明細書で使用されるとき、「Chothia残基」は、Al-Lazikani(Al-Lazikaniら著、J. Mol. Biol., 第273巻、927~948頁、1997年)に従ってナンバリングされた抗体VL残基及びVH残基である。

【0028】

「フレームワーク」又は「フレームワーク配列」は、抗原結合部位として定義されたものを除く、可変領域の残りの配列である。抗原結合部位は上記に述べたような様々な用語によって定義され得るため、フレームワークの正確なアミノ酸配列は抗原結合部位がどの

10

20

30

40

50

ように定義されるかによって決まる。

【0029】

「ヒト抗体」又は「完全ヒト抗体」とは、ヒト免疫グロブリン配列に由来する可変領域の配列と定常領域の配列とを含む抗体を指す。本発明のヒト抗体は置換を包含する可能性があるため、当該ヒト抗体は、発現した免疫グロブリン又は生殖細胞系列遺伝子配列の正確な複製物でない場合がある。ただし、抗原結合部位がヒト以外の種から得られる抗体は、「ヒト抗体」の定義には包含されない。

【0030】

「ヒト適応」抗体又は「ヒトフレームワーク適応(HFA)」抗体は、米国特許公開第US2009/0118127号に記載されている方法に従って適応された抗体を指し、また、ヒト以外の種に由来する抗原結合部位配列がヒトフレームワークにグラフトされた抗体も指す。

【0031】

「ヒト化抗体」とは、抗原結合部位がヒト以外の種に由来しかつ可変領域フレームワークがヒト免疫グロブリン配列に由来する、抗体を指す。ヒト化抗体はフレームワーク領域内に置換を含む可能性があることから、当該フレームワークは、発現したヒト免疫グロブリン又は生殖細胞系列遺伝子配列の完全な複製物でなくてもよい。

【0032】

本明細書で使用するとき、「モノクローナル抗体」という用語は、単一分子組成物の抗体分子の調製物を意味する。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープの単一の結合特異性及び親和性を示す。

【0033】

「実質的に同一の」という表現は、本明細書で使用されるとき、比較される2つの抗体可変領域のアミノ酸配列が同一であるか又は「ごく僅かな差異」があるということの意味する。ごく僅かな差異とは、抗体特性に悪影響を及ぼさない、抗体又は抗体可変領域の配列における1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個又は11個のアミノ酸の置換である。本明細書に開示される可変領域の配列と実質上同一のアミノ酸配列は、本出願の範囲に属する。一部の実施形態では、配列の同一性は、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれよりも高い可能性がある。同一性(%)は、例えば、Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA)のAlignXモジュールの初期設定を使用するペアワイズアライメントによって決定することができる。本発明のタンパク質配列を問い合わせ配列として使用することで、例えば、近縁配列を確認するために公開データベース又は特許データベースでの検索を実行することができる。かかる検索を実行するために使用されるプログラム例は、初期設定を使用する、XBLAST若しくはBLASTPプログラム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、又はGenomeQuest(商標)(GenomeQuest, Westborough, MA)スイートである。

【0034】

用語「エピトープ」とは、本明細書で使用されるとき、抗体が特異的結合する抗原の一部を意味する。エピトープは通常、アミノ酸又は多糖類側鎖のような部位の化学的に活性な(極性、非極性又は疎水性など)表面基からなり、特定の3次元構造特性及び特定の電荷特性を有する。エピトープは、立体配座空間単位を形成する連続した及び/又は連続していないアミノ酸から成り得る。連続していないエピトープについて、抗原の直鎖配列の異なる部分からのアミノ酸は、タンパク質分子の折り畳みを通じて、3次元空間において近接する。

【0035】

本明細書で使用されるとき、「パラトープ」という用語は、抗原が特異的結合する抗体の一部を意味する。パラトープは元来線状であっても又は不連続であってもよく、一つながりの線状のアミノ酸よりも、抗体の隣接していないアミノ酸同士の空間関係によって

10

20

30

40

50

形成されてよい。「軽鎖パラトープ」及び「重鎖パラトープ」又は「軽鎖パラトープのアミノ酸残基」及び「重鎖パラトープのアミノ酸残基」はそれぞれ、抗原と接触する抗体の軽鎖残基及び重鎖残基を指す。

【0036】

本明細書で使用される時、「二重特異性」とは、2種の異なる抗原と結合する抗体、又は抗原内の2種の異なるエピトープと結合する抗体を指す。二重特異性抗体は、二重特異性抗体がIFN 及びIFN と交差反応する場合に、2つ以上の異なる抗原に結合することができる。

【0037】

本明細書で使用される時、「単一特異性」とは、1つの抗原又は1つのエピトープと結合する抗体を指す。単一特異性抗体は、単一特異性抗体がIFN 及びIFN と交差反応する場合に、2つ以上の異なる抗原に結合することができる。

10

【0038】

用語「～と組み合わせて」は、本明細書で使用される時、記述の対象である薬剤が、混合物として一緒に、又はそれぞれ単独薬剤として同時に、又はそれぞれ単独薬剤として順次に任意の順序で、動物に投与され得ることを意味する。

【0039】

本明細書で使用するとき、用語「IFN の生物活性及びIFN の生物活性」は、IFN 及びIFN が、それぞれに対応する受容体IFNARと結合した結果として生じる任意の活性を指す。1つのIFN 及びIFN の生物活性は、標準的な方法を用いて、IFN 及びIFN が、HEK293細胞においてISG54などのインターフェロン誘導性プロモーター下で分泌胚アルカリホスファターゼ(SEAP)の発現を誘導して、安定的に、転写因子2(STAT2)のシグナル伝達因子及び活性化因子、インターフェロン調節因子9(IRF9)、並びにSEAPを発現する能力である。別のIFN 及びIFN の生物活性は、本明細書に記載のような、末梢血単核細胞(PBMC)又は全血からのケモカインIP-10(CXCL10)の産生の誘導である。

20

【0040】

【表1】

表1.

アミノ酸	3文字コード	1文字コード
アラニン	ala	A
アルギニン	arg	R
アスパラギン	asn	N
アスパラギン酸	asp	D
システイン	cys	C
グルタミン酸	glu	E
グルタミン	gln	Q
グリシン	gly	G
ヒスチジン	his	H
イソロイシン	ile	I
ロイシン	leu	L
リシン	lys	K
メチオニン	met	M
フェニルアラニン	phe	F
プロリン	pro	P
セリン	ser	S
トレオニン	thr	T
トリプトファン	trp	W
チロシン	tyr	Y
バリン	val	V

30

40

50

【0041】

「ベクター」なる用語は、生物系内で複製されうる、又はこうした系間を移動しうるポリヌクレオチドを意味する。ベクターポリヌクレオチドは一般的に、生物系内でこれらのポリヌクレオチドの複製又は維持を促進するように機能する複製起点、ポリアデニル化シグナル又は選択マーカーなどの要素を含んでいる。このような生物系の例としては、細胞、ウイルス、動物、植物、及びベクターを複製することができる生物学的成分を利用して再構成された生物系を挙げることができる。ベクターを構成するポリヌクレオチドは、DNA若しくはRNA分子又はこれらのハイブリッド分子であってもよい。

【0042】

用語「発現ベクター」は、生体系又は再構成された生体系において、その発現ベクター中に存在するポリヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチドの翻訳を指示するために使用することができるベクターを意味する。

10

【0043】

「ポリヌクレオチド」なる用語は、糖-リン酸骨格又は他の同等の共有結合化学により共有結合を介して連結されたヌクレオチド鎖からなる分子を意味する。二本鎖及び一本鎖のDNA及びRNAが、ポリヌクレオチドの典型例である。

【0044】

「ポリペプチド」又は「タンパク質」という用語は、ペプチド結合により連結されてポリペプチドを生成する少なくとも2つのアミノ酸残基を含む分子を意味する。50個未満のアミノ酸からなる小さいポリペプチドは「ペプチド」と呼ばれる場合もある。

20

【0045】

本明細書では表1に示すような従来の1文字及び3文字のアミノ酸コードを用いる。

【0046】

発明の構成

本発明は、ヒトインターフェロンオメガ (IFN ω) 及び複数のヒトインターフェロン (IFN) のサブタイプ (IFN / 抗体) と結合し、その活性を中和するモノクローナル抗体を提供する。本発明は、少なくとも部分的に、本発明のIFN / 抗体が結合する、IFN ω と、IFN サブタイプと、が共有する最小限の中和性のエピトープの同定に基づく。本発明のIFN / 抗体は、IFN サブタイプを中和するがIFN ω を中和しない抗体よりも、I型IFN及びIFNシグネチャのSLE関連の調製物の中和においてより強力であり、したがって、IFN ω 及びIFNの産生の増加に関連する例えば免疫媒介炎症性疾患のような任意の疾患の治療において、より効能が優れている可能性がある。本発明のIFN / 抗体はIFN ω を中和しないので、全てのI型IFNを遮断することが予測される抗IFNAR療法と比較して、より好ましい安全性及びPK特性を有する可能性がある。本明細書で使用する時、「IFN / 抗体は、本明細書に例示するINF ω 及び複数のIFN サブタイプと結合し、中和する抗体を指す。

30

【0047】

本発明の一実施形態は、ヒトインターフェロン (IFN) 及び少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10のヒトインターフェロン (IFN) サブタイプと結合し、それらの活性を中和する、モノクローナル抗体である。

40

【0048】

本発明の抗体は、IFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G及びIFN J1を中和し得る。本発明の抗体は、IFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G及びIFN J1を中和し得る。本発明の抗体は、IFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J1及びIFN Aを中和し得る。本発明の抗体は、IFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J1、IFN A及びIFN H2を中和し得る。本発明の抗体は、IFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J1、IFN A、IFN H2及びIFN Kを中和し得る。本発明の抗体は、IFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J

50

1、IFN A、IFN H2、IFN K及びIFN WAを中和し得る。本発明の抗体は、IFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J1、IFN A、IFN H2、IFN K、IFN WA及びIFN 4aを中和し得る。

【0049】

本発明の抗体がIFN 及びIFN を中和する能力は、インターフェロン応答性プロモーター下でレポーター遺伝子を発現する細胞株を使用して種々のIFN サブタイプ及び/又はIFN で細胞を刺激するレポーター遺伝子アッセイにおいて、試験することができる。例えば、完全に活性なI型IFNシグナル伝達経路を発現する(STAT2及びIRF9を安定に発現する)ように設計され、IFN / 誘導性ISG54プロモーターの制御下でSEAPレポーター遺伝子でトランスフェクトされたHEK-Blue(商標)IFN- / 細胞(InvivoGen(カリフォルニア州San Diego))を、本明細書に記載したように使用することができる。周知の試薬を用いてアルカリホスファターゼからのシグナルを検出することが可能であり、そのシグナルを分光光度計で読み取ることが可能であり、標準的な方法を用いて阻害に関するIC₅₀を計算することが可能である。

【0050】

一実施形態において、本発明の抗体は、それらのヒトIFN 及びヒトIFN サブタイプの活性が、転写因子2(STAT2)、インターフェロン調節因子9(IRF9)、及びSEAPのシグナル伝達因子及び活性化因子を安定に発現するHEK293細胞におけるインターフェロン誘導性ISG54プロモーター下で分泌された胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)の発現の阻害であるときに、約 5×10^{-8} M未満、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、又は約 1×10^{-12} M未満のIC₅₀値でIFN の活性を阻害し、且つ、約 5×10^{-8} M未満、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、又は約 1×10^{-12} M未満のIC₅₀値でIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G又はIFN J1を阻害する。本発明の抗体は、本明細書で実施例3に記載したような「ISREレポーター遺伝子アッセイ」においてIC₅₀値が約 5×10^{-8} M未満、例えば 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満又は約 1×10^{-12} M未満であるときに、IFN 及び/又は任意のIFN サブタイプを「中和する」。

【0051】

本発明の抗体はまた、IFNで誘導性末梢血単核細胞(PBMC)又は全血からのIP-10の放出のようなIFN誘導性のサイトカインの放出を阻害するそれらの能力を評価することによって、それらのIFN 及びIFN 中和能力について試験することができる。例えば、PBMCは、試験されるIFN及び抗体の予め形成された複合体で処置した標準的なプロトコルを使用して健康なボランティアからのヘパリン化全血から単離され、IP-10の放出は、Milliplexサイトカイン/ケモカインキット(Millipore、Premixed 39 plex)のような標準的な方法を使用して測定される。IFN 及びIFN を中和する抗体は、抗体の非存在下でのIFN誘導性のIP-10の放出と比較したとき、IP-10の放出を少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、又は100%阻害することができる。

【0052】

本発明の抗体は、IFN を中和することに加えて、少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10のIFN サブタイプと結合し、中和することができる。これらのIFN サブタイプ及びIFN は、標準的な方法を使用して組換え発現によって産生することができる。分泌を指示するために使用できる例示的なシグナル配列は、配列番号17~21に示される。

【0053】

10

20

30

40

50

本発明の抗体は、約 5×10^{-9} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 5×10^{-10} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 5×10^{-11} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 5×10^{-12} M未満、又は約 1×10^{-12} M未満の解離定数 (K_D) のヒトIFN と結合し、約 5×10^{-9} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 5×10^{-10} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 5×10^{-11} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 5×10^{-12} M未満、又は約 1×10^{-12} M未満の K_D のヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G又はIFN J1と結合する。

【0054】

IFN 又はIFN に対する抗体の親和性は、任意の好適な方法を使用して実験により測定することができる。こうした方法では、ProteOn XPR36、Biacore 3000又はKinExA装置、ELISA、若しくは当業者には周知である競合的結合アッセイを使用することができる。特定の抗原/IFN 又はIFN サブタイプの相互作用の測定された親和力は、異なる条件(例えば、容量オスモル濃度、pH)下で測定したときに様々であり得る。したがって、親和性及びその他の結合パラメータ(例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off})の測定は、好ましくは標準的な条件及び例えば本明細書に記載の緩衝液などの標準化緩衝液を用いて行われる。例えばBiacore 3000又はProteOnを用いた親和性測定での内部エラー(標準偏差(SD)として測定されるもの)は典型的に、典型的な検出範囲内で測定した場合、5~33%の範囲内であり得ることが当業者には分かるであろう。したがって、用語「約」は、アッセイにおける典型的な標準偏差を表す。例えば、 K_D が 1×10^{-9} Mの場合の典型的なSDは、 $+0.33 \times 10^{-9}$ M以下である。

【0055】

ヒトIFN 及びIFN と所望の親和性及び中和特性で結合する抗体は、ヒトIFN 及びIFN サブタイプでパニングすることによって、及び所望により更なる抗体親和性成熟によって、変異体又はフラグメントのライブラリから選択され得る。例示のパニングキャンペーンにおいて、ファージライブラリを順にパニングしてもよく、あるいは、チンパンジーIFN と、ヒトIFN サブタイプIFN 2、IFN 1、IFN H2、IFN G及びIFN Fとの混合物を用いてパニングしてもよい。あるいは、本発明の抗体は、チンパンジー及びカニクイザル(cynomolgus)IFN 、ヒトIFN サブタイプIFN D、IFN J1、IFN C、IFN B2、IFN H2、IFN A、IFN 4a、IFN G、IFN F、IFN WA及びIFN Iでマウスを免疫し、標準的な方法を用いてそのハイブリオームをスクリーニングすることによって作ることができる。

【0056】

抗体は、任意の適当な方法及び本発明に記載の方法を用い、IFN 及びIFN の生物活性の阻害に基づいて同定することができる。

【0057】

本発明の一実施形態は、ヒトインターフェロンオメガ(IFN)及び少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10のヒトインターフェロンアルファ(IFN)サブタイプと結合しそれらの活性を中和する単離されたモノクローナル抗体であり、その抗体は、ヒトIFN 及びヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G又はIFN J1との結合のために、単離された抗体と競合するものであって、以下を含む。

【0058】

重鎖可変領域(VH)アミノ酸配列(配列番号23)、及び軽鎖可変領域(VL)アミノ酸配列(配列番号24)、又は、

VHアミノ酸配列(配列番号27)、及びVLアミノ酸配列(配列番号28)。

【0059】

ヒトIFN 及びヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G及び/又はIFN J1への特異的結合と、特定のVH及びVLを含む本発明の抗体との間の

競合は、周知の方法を用いてインビトロでアッセイすることができる。例えば、非標識抗体の存在下におけるMSD Sulfo-Tag (商標) NHSエステル標識抗体とヒトIFN γ 及びヒトIFN γ サブタイプIFN γ B2、IFN γ F、IFN γ G又はIFN γ J1との結合を、ELISA又はBioacore解析によって評価してもよく、あるいは、フローサイトメトリーを用いて、本発明の抗体との競合を実証してもよい。あるいは、Octet (カリフォルニア州Menlo Park) を用いてリアルタイム無標識競合結合アッセイを、本明細書に記載したように使用してもよい。配列番号23のVH及び配列番号24のVL、又は配列番号27のVH及び配列番号28のVLを含む抗体が、ヒトIFN γ 及びヒトIFN γ サブタイプIFN γ B2、IFN γ F、IFN γ G及び/又はIFN γ J1と結合するのを阻害する試験抗体の能力は、試験抗体がこれらの抗体と競合してヒトIFN γ 及びヒトIFN γ サブタイプIFN γ B2、IFN γ F、IFN γ G及び/又はIFN γ J1と結合することを実証している。

10

【0060】

別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号1の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN γ と結合する。

【0061】

別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号19の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN γ 4aと結合する。

【0062】

IFN γ 及びIFN γ 4aの両方の残基F27、L30、及びR33は、本発明のIFN γ / 抗体の広域中和活性に必要とされる最小のエピトープを画定する。いくつかの抗体/IFN γ 複合体又は抗体/IFN γ 複合体の結晶構造は、それら3つの残基が抗体結合に主に寄与することを明らかに示している。ヒトIFN γ 4aは、他のヒトIFN γ と少なくとも83%アイデンティティを共有し、ヒトIFN γ と59%アイデンティティを共有している。F27残基はIFN γ D(1)を除く全てのヒトIFN γ に保存される。F27は、ヒトIFN γ にも保存される。L30及びR33はどちらも全てのヒトIFN γ 及びヒトIFN γ に保存される。

20

【0063】

本発明の別の実施形態において、ヒトインターフェロン (IFN γ) 及び少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10のヒトインターフェロンアルファ (IFN α) サブタイプと結合し、それらの活性を中和する本発明のモノクローナル抗体は、IFN γ Dと結合せず、中和しない。

30

【0064】

特異的にIFN γ 及びIFN γ 残基と結合する本発明の抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を発現するマウスを免疫することによって (Lonbergら、Nature 368: 856~9、1994; Fishwildら、Nature Biotechnology 14: 845~51、1996; Mendezら、Nature Genetics 15: 146~56、1997、米国特許第5,770,429号、同第7,041,870号、及び同第5,939,598号)、又はエピトープ接触残基を含むペプチド、例えばIFN γ のABループ (配列番号1のIFN γ のアミノ酸残基22~34) 又はIFN γ 4aのABループ (配列番号19のIFN γ 4aのアミノ酸残基22~34) のアミノ酸配列を有するペプチド、若しくは本明細書に記載のようなIFN γ とIFN γ サブタイプの混合物でBalb/cマウスを免疫し、Balb/cマウスを免疫し、Kohlerら (Nature 256: 495~97、1975) のハイブリドーマ法を用いることによって、作ることができる。得られた抗体が、配列番号23のVH及び配列番号24のVLを有する抗体のような本発明の抗体と競合する能力を試験し、標準の方法を使用して、そのエピトープへのそれらの結合を試験する。例えば、両方の個別の構成成分の構造が知られている場合、インシリコでタンパク質-タンパク質ドッキングを行って、適合性のある相互作用部位を特定することができる。抗原抗体複合体を用いて水素-重水素 (H/D) 交換を行うことによって、抗体が結合し得る抗原の領域をマッピングするこ

40

50

とができる。抗原のセグメント及び点変異誘導を用いることにより、抗体の結合に重要なアミノ酸の位置を特定することができる。抗体-抗原複合体の共結晶構造を使用して、エピトープ及びパラトープに寄与する残基を同定することができる。特定されたmAbは更に、Queenら著、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、第86巻、10029~32頁、1989年及びHodgsonら著、Bio/Technology、9:421、1991で開示されている技術等の技術によって、変化したフレームワーク支持残基を組み込むことによって結合親和性を保存するように修飾することができる。

【0065】

別の実施形態において、本発明の抗体は、残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN と結合し、更に、配列番号1の残基P26、K31、及びR34からなる群から選択される少なくとも1つのIFN 残基と結合する。

10

【0066】

別の実施形態において、本発明の抗体は、残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN と結合し、更に、配列番号1の残基R22、R23、I24、S25、P26、K31、D32、R34、D35、Q40、K134、M146、E147、M149、K150、F153及びL154からなる群から選択される少なくとも1つのIFN 残基と結合する。

【0067】

別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の残基R22、P26、F27、L30、K31、D32、R33、R34、D35、Q40、K134、M146、E147、M149、K150、F153及びL154で配列番号1のIFN と結合する。

20

【0068】

別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の残基R23、I24、S25、P26、F27、L30、K31、R33、R34、M146、E147、M149及びK150で配列番号1のIFN と結合する。

【0069】

別の実施形態において、本発明の抗体は、残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN 4aと結合し、更に、配列番号19の残基P26、K31、及びR34からなる群から選択される少なくとも1つのIFN 4a残基と結合する。

30

【0070】

別の実施形態において、本発明の抗体は、残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN 4aと結合し、更に、配列番号19の残基A19、H26、F27、L30、K31、D32、R33、H34、D35、V143、A146、E147、M149、R150及びS153からなる群から選択される少なくとも1つのIFN 4aの残基と結合する。

【0071】

別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号19の1つ以上の残基A19、H26、F27、L30、K31、D32、R33、H34、D35、V143、A146、E147、M149、R150及びS153でIFN 4aと結合する。

40

【0072】

別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号19の1つ以上の残基G22、R23、I24、S25、H26、F27、C29、L30、K31、R33、H34、V143、A146、E147及びR150及びS153でIFN 4aと結合する。

【0073】

別の実施形態において、本発明の抗体は、ウイルス誘導性白血球インターフェロンの活性を阻害する。

【0074】

いくつかの実施形態では、ウイルス誘導性白血球インターフェロンの活性は、100U/mLのインターフェロンによって誘導された全血中のIP-10の放出である。

50

【0075】

本発明の抗体は、本明細書に記載したように、100 U/mLのインターフェロンによって誘導された全血中のIP-10の放出を阻害するそれらの能力によって評価されるように、活性化された白血球によって生成されたインターフェロンを中和することが可能である。本発明の抗体は、活性化された白血球により生成されたインターフェロンの作用を、50 µg/mLの抗体の存在下において、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%中和することが可能である。

【0076】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、50 µg/mLの抗体の存在において、全血中のIP-10の放出を50%超阻害する。

10

【0077】

別の実施形態において、本発明の抗体は、SLE免疫複合体誘導性のIFN産生を阻害する。SLE免疫複合体は、SLEに存在するI型IFN環境を代表する。IFN産生は、本明細書に記載のようにレポーター遺伝子アッセイを用いて測定することができる。

【0078】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、SLE免疫複合体誘導性のインターフェロンの産生を少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%阻害することができる。

20

【0079】

本発明の抗体は、ヒト、ヒト化、又はヒト適応型であり得る。

【0080】

本発明の抗体は、IgA型、IgD型、IgE型、IgG型又はIgM型であってもよい。本発明の抗体は、IgG1型、IgG2型、IgG3型、IgG4型であってもよい。

【0081】

本発明の別の実施形態は、

重鎖可変領域(VH)アミノ酸配列(配列番号23)、及び軽鎖可変領域(VL)アミノ酸配列(配列番号24)、

30

VHアミノ酸配列(配列番号25)、及びVLアミノ酸配列(配列番号26)、又は、

VHアミノ酸配列(配列番号27)、及びVLアミノ酸配列(配列番号28)を含む単離された抗体である。

【0082】

いかなる非ヒト配列も欠くヒトmAbは、例えば、Knappikら、J. Mol. Biol. 296:57~86, 2000、及びKrebsら、J. Immunol. Meth. 254:67~84 2001に参照される技術によって、ファージディスプレイライブラリから調製及び最適化することができる。例示の方法では、本発明の抗体は、バクテリオファージpIXコートタンパク質を有する融合タンパク質として、抗体重鎖及び軽鎖可変領域を発現するライブラリから単離される。抗体ライブラリをヒトIFN及びIFNの結合についてスクリーニングして、得られた陽性クローンの特性評価を更に行い、Fabはクローンライセートから単離して、全長IgGとして発現する。例示の抗体ライブラリ及びスクリーニング法は、Shiら、J. Mol. Biol. 397:385~96, 2010; 国際特許公開第WO2009/085462号、及び米国特許第12/546850号、米国特許第5,223,409号、同第5,969,108号、及び同第5,885,793号に記載されている。

40

【0083】

結果として得られたmAbは、それらのフレームワーク領域において、特定のフレームワーク残基をマッチングするヒト生殖細胞系列に存在する残基へと変更するように更に改変することができる。

50

【0084】

本発明の抗体の免疫エフェクター特性は、当業者には周知の技術により、Fc 改変によって強化又はサイレンシングすることも可能である。例えば、C1q 結合、補体依存性細胞傷害 (CDC)、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC)、貧食、細胞表面受容体 (例えば、B 細胞受容体 (BCR)) のダウンレギュレーション等の Fc エフェクター機能は、これら活性に關与する Fc の残基を改変することによって提供及び / 又は制御することができる。また、薬物動態特性は、抗体の半減期を延長する Fc ドメインの残基を変異させることによって強化することができる (Strohl Curr Opin Biotechnol、第 20 巻、685 ~ 91 頁、2009 年)。

【0085】

更に、本発明の抗体は、グリコシル化、異性化、又は脱グリコシル化等の反応によって、あるいはポリエチレングリコール部分の付加 (ペグ化) 及び脂質化等の自然界では生じない共有結合修飾等の反応によって翻訳後修飾してもよい。こうした修飾はインビボあるいはインビトロで行われ得る。例えば、本発明の抗体はポリエチレングリコールと接合する (ペギレート) することによって薬物動態的なプロファイルを向上させることができる。結合は、当業者に既知の方法によって行うことができる。治療用抗体と PEG との結合は、機能に干渉することなく薬力学を強化することが示されている (Knight 著、Platelets、第 15 巻、409 ~ 18 頁、2004 年、Leong 著、Cytokine、第 16 巻、106 ~ 19 頁、2001 年、Yang 著、Protein Eng、第 16 巻、761 ~ 70 頁、2003 年)。

【0086】

安定性、選択性、交差反応性、親和性、免疫原性、又は他の望ましい生物学的若しくは生物物理学的特性を改善するように修飾される、本発明の抗体又はそのフラグメントは発明の範囲内である。抗体の安定性は、分子内力及び分子間力の中でも特に (1) 固有の安定性に影響を及ぼす個々のドメインのコアパッキング、(2) HC と LC とのペアリングに影響するタンパク質 / タンパク質の界面相互作用、(3) 極性及び荷電残基の埋め込み、(4) 極性及び荷電残基の水素 (H) 結合ネットワーク、及び (5) 表面電荷及び極性残基の分布、などの多くの因子によって影響される (Worn 著、J Mol Biol、第 305 巻、989 ~ 1010 頁、2001 年)。構造を不安定化させる可能性のある残基は、抗体の結晶構造に基づいて、あるいは場合によっては分子モデリングによって特定することが可能であり、また、抗体の安定性に対するこれらの残基の影響は、特定された残基に変異を含む変異体を生成及び評価することにより試験することができる。抗体の安定性を高める方法の 1 つは、示差走査熱量測定法 (DSC) で測定する場合、熱転移中点温度 (Tm) を高くすることである。一般に、タンパク質の Tm は、その安定性と相関性を示すが、溶液中でのそのアンフォールディングし易さ及び変性し易さ、並びにそのタンパク質のアンフォールディングし易さに応じた分解プロセスとは負の相関性を示す (Remmel 著、Biopharm., 13: 36 ~ 46, 2000)。幾つかの研究からは、DSC により熱安定性として測定される製剤の物理的安定性の順位と他の方法によって測定される物理的安定性との間に相関性が見つかった (Gupta 著、AAPS PharmSci. 5E8、2003 年、Zhang 著、J. Pharm. Sci., 第 93 巻、3076 ~ 3089 頁、2004 年、Maar 著、Int. J. Pharm., 第 140 巻、155 ~ 168 頁、1996 年、Bedu-Addo 著、Pharm. Res., 第 21 巻、1353 ~ 1361 頁、2004 年、Remmel 著、Pharm Res., 第 15 巻、200 ~ 208 頁、1997 年)。これらの配合物の研究は、Fab の Tm が対応する mAb の長期の物理的安定性と密接な関係があることを示唆している。フレームワーク又は CDR 内のアミノ酸の差異は、Fab ドメインの熱安定性に有意な影響を及ぼし得る (Yasui 著、FEBS Lett., 第 353 巻、143 ~ 146 頁、1994 年)。

【0087】

本発明の IFN / 抗体は、二重特異性抗体へと操作することが可能であり、これら

10

20

30

40

50

もまた本発明の範囲に包含される。本発明の抗体のV L及び/又はV H領域は、公開されている方法を用いて、T a n d A b（登録商標）設計のような構造として一本鎖二重特異性抗体（国際特許公開第W O 1 9 9 9 / 5 7 1 5 0号、米国特許公開第2 0 1 1 / 0 2 0 6 6 7 2号）へと、あるいは、二重特異性s c F V（例えば、米国特許第5, 8 6 9, 6 2 0号、国際特許公開第W O 1 9 9 5 / 1 5 3 8 8 A号、国際特許公開第W O 1 9 9 7 / 1 4 7 1 9号、又は国際特許公開第W O 2 0 1 1 / 0 3 6 4 6 0号に記載されているような構造として）へと操作することができる。

【0088】

本発明の抗体のV L領域及び/又はV H領域は、二重特異性全長抗体へと改変することも可能であり、当該抗体の結合手はそれぞれ特徴的な抗原又はエピトープに結合する。そのような二重特異性抗体は、典型的には、2つの抗体重鎖間のC H 3相互作用を調節して、次に列挙する特許に記載されているような技術を用いて二重特異性抗体を形成することによって作られる（米国特許第7, 6 9 5, 9 3 6号、国際特許公開第W O 0 4 / 1 1 1 2 3 3号、米国特許公開第U S 2 0 1 0 / 0 0 1 5 1 3 3号、米国特許公開第U S 2 0 0 7 / 0 2 8 7 1 7 0号、国際特許公開第W O 2 0 0 8 / 1 1 9 3 5 3号、米国特許公開第U S 2 0 0 9 / 0 1 8 2 1 2 7号、米国特許公開第U S 2 0 1 0 / 0 2 8 6 3 7 4号、米国特許公開第U S 2 0 1 1 / 0 1 2 3 5 3 2号、国際特許公開第W O 2 0 1 1 / 1 3 1 7 4 6号、国際特許公開第W O 2 0 1 1 / 1 4 3 5 4 5号、又は米国特許公開第U S 2 0 1 2 / 0 1 4 9 8 7 6号）。本発明の抗体のV L及び/又はV H領域が組み込まれる追加の二重特異性構造は、例えば、デュアル可変ドメイン免疫グロブリン（国際特許公開第W O 2 0 0 9 / 1 3 4 7 7 6号）、又は2つの結合手を異なる特異性と接続する、ロイシンジッパー又はコラーゲン二量体化ドメインのような様々な二量体化ドメインを含む構造（国際特許公開第W O 2 0 1 2 / 0 2 2 8 1 1号、米国特許第5, 9 3 2, 4 4 8号、米国特許第6, 8 3 3, 4 4 1号）である。

【0089】

本発明の別の態様は、本発明の抗体重鎖可変領域若しくは抗体軽鎖可変領域又はそれらのフラグメントあるいはそれらの相補体のいずれかをコードする単離されたポリヌクレオチドである。遺伝コードの縮重又は所与の発現系におけるコドンの選好性を考慮すると、本発明の抗体アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドもまた本発明の範囲内に含まれる。

【0090】

本発明の別の実施形態は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターである。かかるベクターは、プラスミドベクター、ウイルスベクター、バキュロウイルス発現ベクター、トランスポゾンに基づいたベクター、又は任意の手段によって特定の生物又は遺伝子的バックグラウンドに本発明のポリヌクレオチドを導入するのに適した他の任意のベクターであってよい。

【0091】

本発明の別の実施形態は、本発明のベクターを含む宿主細胞である。かかる宿主細胞は、真核細胞、細菌細胞、植物細胞又は古細菌細胞であってよい。例示的な真核細胞は、哺乳動物、昆虫、鳥類又は他の動物由来のものでよい。哺乳動物の真核細胞としては、ハイブリドーマ細胞株又は骨髓腫細胞株などの不死化細胞株、例えばS P 2 / 0（A T C C（American Type Culture Collection）、M a n a s s a、V A、C R L - 1 5 8 1）、N S 0（E C A C C（European Collection of Cell Cultures）、S a l i s b u r y、W i l t s h i r e、U K、E C A C C 番号8 5 1 1 0 5 0 3）、F O（A T C C C R L - 1 6 4 6）及びA g 6 5 3（A T C C C R L - 1 5 8 0）マウス細胞株が挙げられる。ヒト骨髓腫細胞株の一例は、U 2 6 6（A T T C C R L - T I B - 1 9 6）である。他の有用な細胞株としては、C H O - K 1 S V（L o n z a B i o l o g i c s、W a l k e r s v i l l e、M D）、C H O - K 1（A T C C C R L - 6 1）、又はD G 4 4などの、チャイニーズハムスターの卵巣（C H O）細胞に由来するものが挙げられる。

【0092】

本発明の別の実施形態は、本発明の宿主細胞を培養することと、前記宿主細胞によって産生された抗体を回収することを含む、本発明の抗体の製造方法である。抗体を製造して精製する方法は当該技術分野では周知のものである。

【0093】

本発明の別の実施形態は、IFN 及びIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G及び/又はIFN J1と、IFNARとの相互作用を、それを必要とする患者において阻害する方法であり、この方法は、ヒトIFN とヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G及び/又はIFN J1と結合するために、配列番号23の重鎖可変領域(VH)並びに配列番号24の軽鎖可変領域(VL)、又は配列番号27のVH並びに配列番号28のVLを含む単離された抗体と競合する単離された抗体を、IFN 及びIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G及び/又はIFN J1とIFNARとの相互作用を防ぐために十分な時間にかけて、患者に投与することを含む。抗体とIFNARとの競合は、標準的な方法及び例えば、IFNAR1(配列番号31)及びIFNAR2(配列番号32)又はそれらのFc融合タンパク質の細胞外部分を用いる本明細書に記載の方法を用いてアッセイすることが可能である。

10

【0094】

治療方法

本発明の / 抗体を使用して、IFN 及びIFN の産生の増加に関連する任意の疾病を治療又は予防することが可能である。本発明の方法において、本発明の任意のIFN / 抗体を使用することが可能である。あるいは、ヒトIFN 及びヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G及び/又はIFN J1と結合するために、配列番号23の重鎖可変領域(VH)アミノ酸配列並びに配列番号24の軽鎖可変領域(VL)アミノ酸配列、又は配列番号27のVHアミノ酸配列並びに配列番号28のアミノ酸配列を含む単離された抗体と競合する任意の抗体を使用してもよい。更に、配列番号1の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN IFN と結合し、配列番号19の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN 4aと結合する任意の抗体を使用してもよい。

20

【0095】

本発明の方法を用いて任意の分類に属する動物患者を治療することができる。このような動物の例としては、ヒト、齧歯類、イヌ、ネコ、及び家畜などの哺乳動物が挙げられる。例えば、本発明の抗体は、全身性エリテマトーデス(SLE)、I型糖尿病、乾癬、原発性シェーグレン病、全身性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患(IBD:クローン病、潰瘍性大腸炎、及びセリアック病を含む)、免疫媒介炎症性甲状腺炎、及び糸球体腎炎などの免疫媒介炎症性疾患の予防及び治療に有用である。更に、本発明の抗体組成物は、移植拒絶を阻害又は予防するため、又は移植片対宿主病(GVHD)の治療のために使用することができる。

30

【0096】

本発明の抗体はまた、かかる治療のための薬剤の調製においても有用であり、薬剤は、本明細書に定められる投薬量で投与するために調製される。

40

【0097】

いかなる特定の理論による束縛も意図しないが、免疫複合体SLEトリガが、IFN 及びIFN を含むがIFN を含まないI型IFNを引き起こすことが示唆されている。したがって、本発明のIFN / 抗体は、抗ウイルス防御においてより重要な役割を果たし得るIFNの機能を温存する一方でこれらの病原性のI型IFNを広域に阻害する、より有効なSLE治療を提供し得る。本発明において、広域中和性IFN / 抗体が生成され、IFN 及びIFN が抗原的に特異であるという示唆からの課題(Adolf、J Gen Virol 68:1669~1676、1987)にもかかわらず、IFN 及びIFN に存在する特異な中和性エピトープが同定された。

50

【0098】

IFN とSLEとの関係は、このサイトカインがSLE患者の血清中で上昇することが実証された1979年に最初に説明された(Hooksら、N Engl J Med 301:5~8、1979; Prebleら、Science 216:429~431、1982)。より最近では、I型IFN遺伝子シグネチャがSLE患者のサブセットにおいて広範に説明されており、IFNシグネチャの発現範囲が疾患の臨床的及び血清学的特徴の両方と正相関することが報告されている(Karageorgasら、J Biomed Biotechnol 273907、2011; Baechlerら、Proc Natl Acad Sci USA 100:2610~2615、2003; Bennettら、J Exp Med 197:711~723、2003; Dall'eraら、Ann Rheum Dis 64:1692~1697、2005; Ni
10 ewoldら、Genes Immun 8:492~502、2007)。いくつかの遺伝学関連の研究は、一部のループス患者の疾患を媒介するI型IFNの潜在的な役割を示している(Delgado-Vegaら、(Delgado-Vegaら、Arthritis Res Ther 12 Suppl 1 S2; Elkond and Stone; J Interferon Cytokine Res 11:803~812、2011)。更なる研究は、SLEの病原性機序に関わる一連の遺伝子産物の発現をIFNが調節することを明らかにしている。例えば、IFNは、BlySの重要なB細胞の生存因子の発現だけでなくBlysta(登録商標)(ベリムマブ)の標的もまた誘導することができる。SLE患者におけるI型IFNの活性と可溶性BlySのレベルには正相関が存在し(Ritterhouseら、Arthritis Rheum
20 63:3931~3941、2011)、SLE患者におけるIFNの遮断は、組織を採取したSLE患者の少数の皮膚病変の生検でBlySの遺伝子発現の減少をもたらした(Yaoら、Arthritis Rheum 60:1785~1796、2009)。IL-6と同様に、IFNもまた、Ig分泌形質細胞の生成のために重要であることが示された(Jegoら、Curr Dir Autoimmune 8:124-139、2005)。B細胞コンパートメントへの直接の影響のほかに、IFNはループス病因の他の重要なメディエータへの影響を呈する。Blancoらは、IFNが抗原提示DCへの単球の分化を誘導し得ることを実証した(Blancoら、Science 294:1540~1543、2001)。SLE血清検体中のIFNの中和は、DCへの単球の分化を誘導するSLE血清の能力を大幅に減少させ、一部のSLE患者にお
30 ける自己抗原に対する寛容性を減少させるこのサイトカインの重要な役割を実証した。感染性又は腫瘍学的適応症のためのIFN療法は、一部の患者において、治療中止後に治まるSLE様疾患を誘導することを示した(Burdickら、Expert Opin Drug Saf 8:459~472、2009; Biggioggeroら、Autoimmunity 43:248~254、2010)。

【0099】

IFNは、感染の制御を助けるために、ウイルスなどの感染性因子に応答して急速に生成される。核酸リガンドに結合した自己抗体は、SLEにおけるI型IFNの主な誘導物質であると考えられている。自己抗原のクリアランス障害と関連した自己抗体の圧倒的多数は、IFNの生産のフィードバックサイクルに至り、形質細胞様樹状細胞(pDC)への免疫複合体のFc受容体依存性の内在が、IFNの増量、及びしたがってIFNシグネチャの確立につながる。トール様受容体(TLR)7及びTLR9などの核酸受容体は、pDCのエンドソームコンパートメントにおいて濃縮され、I型IFN放出につながるカスケードを開始するこれらの核酸含有免疫複合体の主要なセンチネルであると考えられる。これに関して、TLR7及び9の複数の阻害剤が、SLEのために臨床開発中である。
40

【0100】

IFN及びIFNのどちらもSLEにおいて上昇し、同様の免疫調節作用を誘導し得る。合成リガンドを使用したTLR7及びTLR9のアゴニズム(Gibsonら、Cell Immunol 218:74~86、2002)又はSLE患者由来の免疫複合体(本明細書に記載した)はIFN及びIFNタンパク質のIFN転写物の両方
50

を誘導し (Hanら、Genes Immun 4:177~186、2003)、タンパク質 (データは表示せず) はSLE患者において上方調節される。

【0101】

I型IFNに対する自己抗体はまた、SLE患者にも見出され、これはおそらく、過度の体液性免疫応答と組み合わせられてこれらのSLE患者におけるIFNの上昇の結果である。IFNに対する自己抗体は、検査したSLEコホートにおいて、IFNに対する自己抗体よりも高頻度で見出されたが、一方、IFNに対する自己抗体はごくわずかな量で検出された (Slavikovaら、J Interferon Cytokine Res 23:143~147、2003)。IFNによって付与される一般的な活性はIFNの作用に似ており、SLE患者におけるIFNの上昇が疾患の病因に寄与し得ることを示唆している (Adolfら、J Biol Chem 265:9290~9295、1990; Adolf、Mult Scler 1 Suppl 1:S44~47、1995; Kubesら、J Interferon Res 14:57~59、1994; Tiefenthalerら、J Interferon Cytokine Res 17:327~329、1997)。SLEにおけるIFNの存在及び役割の確実性はより低い。SLE患者の血清を刺激として用いたIFNの特異的中和はI型IFNの活性を実質的に低下させたが、一方、試験した患者の血清検体を用いたIFNの中和はごくわずかな作用しかもたらさず、疾患の病因へのIFNの関与がごくわずかであることを示唆している (Huaら、Arthritis Rheum 54:1906~1916、2006)。

10

20

【0102】

臨床開発におけるI型IFNアンタゴニストの現在のアプローチは、インターフェロン受容体のIFNAR1鎖の中和に関して、IFNサブタイプのスペクトルの中和には注目しているが、他のI型IFN (、 、)、したがって、全てのI型IFNのシグナル伝達の遮断には注目していないか、又は、IFNに特異的ワクチン接種アプローチの利用に注目している (Merrillら、Ann Rheum Dis 70:1905~1913、2011; Zaguryら、Proc Natl Acad Sci USA 106:5294~5299、2009)。臨床試験において、SLE患者における抗IFN抗体は、IFNシグネチャを呈する患者におけるI型IFNの部分的低下、及び探索的分析でのわずかな作用を示した (Merrillら、Ann Rheum Dis 70:1905~1913、2011)。第2相試験において、免疫抑制剤の欠如下での抗INF治療に伴い、インターフェロンシグネチャメトリック (ISM) で低中程度から重度の活性なルーパス被験者の予め特定されたバイオマーカー定義群において、24週に、SLEの兆候及び症状、フレア率、及びステロイド負担が改善した。興味深いことに、高ISMとして予め定義された患者には効能は認められなかった (Kalunianら、2012 ACR/ARHP Annual Meeting; Abstract # 2622、2012)。

30

【0103】

IFNを含む全てのI型IFNによって誘導されるIFNシグナル伝達を中止するために、IFNAR1に対するモノクローナル抗体が予測される。SLEの病因におけるIFNの重要な役割を支持するデータの欠如にもかかわらず、IFNは抗ウイルス防御においてより重要な役割を果たす可能性がある。IFNをコードする遺伝子の特異的欠失は、機能性IFNを有する同じように曝露されたマウスと比較して、ウイルスの宿主への実質的な感受性を被る (Lazearら、J Virol 85:7186~94; Deonarainら、J Virol 74:3403~09、2000; Deonarainら、Circulation 110:3540~3543、2004; Gerlachら、J Virol 80:3438~3444、2006; Koernerら、J Virol 81:2025~2030、2007)。

40

【0104】

本発明の一実施形態は、IFN及びIFNの産生の増加に関連する疾患の治療又は

50

予防の方法であり、この方法は、治療的有効量の、ヒトインターフェロンオメガ（IFN ω ）及び少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10のヒトインターフェロンアルファ（IFN α ）サブタイプと結合しその活性を中和する単離された抗体、若しくは、ヒトIFN ω 及びヒトIFN α サブタイプIFN α B2、IFN α F、IFN α G又はIFN α J1と結合するために、配列番号23の重鎖可変領域（VH）アミノ酸配列及び配列番号24の軽鎖可変領域（VL）アミノ酸配列、又は配列番号27のVHアミノ酸配列、及び配列番号28のVLアミノ酸配列を含む単離された抗体と競合する抗体を、その疾患の治療又は予防のために十分な時間にかけて、それを必要とする患者に投与することを含む。

【0105】

本発明の別の実施形態は、IFN ω 及びIFN α サブタイプIFN α B2、IFN α F、IFN α G又はIFN α J1とIFNARとの相互作用を、この方法を必要とする患者において防ぐ方法であって、ヒトインターフェロンオメガ（IFN ω 及び少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10のヒトインターフェロンアルファ（IFN α ）サブタイプと結合しその活性を中和する単離された抗体、若しくは、ヒトIFN ω 及びヒトIFN α サブタイプIFN α B2、IFN α F、IFN α G及び/又はIFN α J1と結合するために、配列番号23の重鎖可変領域（VH）アミノ酸配列及び配列番号24の軽鎖可変領域（VL）アミノ酸配列、又は配列番号27のVHアミノ酸配列及び配列番号28のVLアミノ酸配列を含む単離された抗体と競合する抗体を、IFN ω 及びIFN α サブタイプIFN α B2、IFN α F、IFN α G及び/又はIFN α J1とIFNARとの相互作用を防ぐために十分な時間にかけて患者に投与することを含む。

【0106】

他の実施形態において、本発明の方法に使用可能な抗体としては、配列番号1の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN ω と結合し、配列番号19の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN ω 4aと結合する抗体が挙げられる。

【0107】

本発明の抗体は、ルーパス傾向マウス及び、種々の薬剤を用いてルーパス様の表現型を誘導又は加速したマウスの系統を含む、ルーパスの動物モデルにおけるその有効性について試験することができる（Perryら、J Biomed Biotechnol、2011：271694、2011）。例えば、NZB/NZW F1マウスは、糸球体腎炎を含むヒトルーパスのいくつかの特徴を有する時間依存型且つ雌バイアスの疾患を示す。ヒトと比較すると、複数の別個のIFN α サブタイプがマウスで生産されており（van Peschら、J Virol、78：8219～28、2004）、マウスにおけるIFN α 発現が欠如しているため、疾患関連細胞におけるインビトロ試験を疾患関連IFN α 製剤を用いて行い、本発明の抗体の有効性及び疾患改善能を評価することができる。そのようなインビトロアッセイは、例えば、全血中のSLE免疫複合体によって誘導されるIFN α 産生の阻害の評価、又は、本明細書に記載のような、IFN α シグネチャを低下する抗体の能力の評価である。

【0108】

本発明のIFN ω / 抗体のVH及びVLドメインは、本明細書に記載した二重特異性抗体及び分子に組み込むことができ、その二重特異性抗体は、IFN ω 及び少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10のヒトインターフェロンアルファ（IFN α ）サブタイプ、例えば、IFN α B2、IFN α F、IFN α G及びIFN α J1、並びに、Blys、CD40L、IL-6、CD27、BDCA2（CLEC4C、C型レクチンドメインファミリー4、メンバーC）、又はIL-12及びIL-23のp40サブユニットと、特異的に結合し、中和する。あるいは、ヒトIFN ω 及びヒトIFN α サブタイプIFN α B2、IFN α F、IFN α G及び/又はIFN α J1と結合するために、配列番号23の重鎖可変領域（VH）アミノ酸配列、及び配列番号24の軽鎖可変領域（VL）アミノ酸配列、若しくは配列番号27のVHアミノ酸配列及び配列番号28のVLアミノ酸配列を含む単離された抗体と競合する抗体を使用してもよい。更に、配列番

10

20

30

40

50

号1の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN と結合し、配列番号19の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN 4aと結合する任意の抗体のVH及びVLドメインを使用してもよい。

【0109】

Blys、CD40L、IL-6、CD27、BDCA2 (CLEC4C、C型レクチンドメインファミリー4、メンバーC)、又はIL-12及びIL-23のp40サブユニットは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を発現するマウス(Lonbergら、Nature 368:856~9、1994; Fishwildら、Nature Biotechnology 14:845~51、1996; Mendezら、Nature Genetics 15:146~56、1997、米国特許第5,770,429号、同第7,041,870号、及び同第5,939,598号)、又は対応するタンパク質若しくはタンパク質の細胞外ドメイン、あるいは本明細書に記載されるファージディスプレイライブラリを用いて、Balb/cマウスを免疫することによってなど、本明細書に記載した方法を用いて生成することができる。あるいは、Blys、CD40L、IL-6、CD27、BDCA2 (CLEC4C、C型レクチンドメインファミリー4、メンバーC)、又はIL-12及びIL-23のp40サブユニットを用いて、二重特異性分子を生成してもよい。

10

【0110】

投与/製薬学的組成物

IFN 及びIFN の産生の増加に関連する状態の処置に有効な本発明のIFN / 抗体の「治療的有効量」は、標準的な研究手法によって決定することができる。例えば、SLEのような免疫媒介炎症性疾患の処置において有効であろう本発明のIFN / 抗体は、当該技術分野で周知の関連する動物モデルにIFN / 抗体を投与することによって決定することができる。

20

【0111】

所望によりインビトロアッセイを用いて最適な用量範囲を特定することができる。特定の有効量の選択は、当業者であれば幾つかの因子の考慮に基づいて(例えば臨床試験によって)決定することができる。こうした要因には、治療又は予防しようとする疾患、疾患症状、患者の体重、患者の免疫状態、及び当業者には既知の他の要因が含まれる。製剤に用いられる正確な用量は、投与経路、及び疾患の重篤度にも依存し、医師の判断及び各患者の状況に基づいて決定されなければならない。有効量は、インビトロ又は動物モデル試験系から導出される用量反応曲線から推定することができる。本発明の抗体の有効性及び有効量について、本明細書に記載したモデルのいずれかを用いて試験することができる。

30

【0112】

本発明の抗体の治療上の使用のための投与方法は、薬剤を宿主に送達する任意の好適な経路であってよい。これらの抗体の医薬組成物は、例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、又は鼻腔内等の非経口投与に特に有用である。

【0113】

本発明の抗体は、有効量の薬剤を製薬上許容される担体中の有効成分として含有する医薬組成物として調製することができる。「担体」という用語は、活性化化合物と共に投与する希釈剤、補助剤、賦形剤又は溶媒のことを指す。こうした医薬用溶媒は、落花生油、大豆油、鉱物油、ゴマ油などの、石油、動物、植物又は合成物由来の水及び油などの液体であってよい。例えば、0.4%生理食塩水及び0.3%グリシンを用いることができる。これらの溶液は滅菌され、一般には粒子状物質を含まないものである。これらは、従来周知の滅菌技術(例えば、濾過)によって滅菌することができる。この組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる製薬上許容される補助物質、例えばpH調整剤及び緩衝剤、安定化剤、増粘剤、潤滑剤及び着色剤等を含むことができる。かかる医薬製剤中の本発明の抗体の濃度は幅広く変化してよく、すなわち約0.5重量%未満、通常は約1重量%又は少なくとも約1重量%か、最大で15又は20重量%までであってよく、また、

40

50

選択される特定の投与方法に従って、主として必要とされる用量、液体の体積、粘度等に基づいて選択される。

【0114】

したがって、筋肉内注射用の本発明の医薬組成物は、1 mLの滅菌済み緩衝水、及び約1 ng ~ 約100 mg、例えば約50 ng ~ 約30 mg、又はより好ましくは約5 mg ~ 約25 mgの本発明の抗体を含むように調製することができる。同様に、静脈内注射用の本発明の医薬組成物は、250 mLの滅菌リンゲル溶液、及び約1 mg ~ 約30 mg、好ましくは5 mg ~ 約25 mgの本発明の拮抗物質を含むように調製することができる。非経口投与可能な組成物を調製するための実際の方法は周知のものであり、例えば、「Remington's Pharmaceutical Science」, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PAにより詳細に述べられている。

10

【0115】

本発明の抗体は、保存のために凍結乾燥させ、使用前に好適な担体に溶解させることができる。この手法は、これまでに、従来免疫グロブリン及びタンパク製剤に有効であることが分かっており、当該技術分野において既知の凍結乾燥法及び再構成法を用いることができる。

【0116】

(詳細な説明)

以下に、本明細書の他の箇所に記載した開示にしたがった本発明の番号付けした更なる特定の実施形態を列挙する。上記の本発明の実施形態の特徴は、これらの番号付けされた更なる実施形態の各々及び全てにもまた関係する。

20

1) (a) ヒトインターフェロンオメガ (IFN) 及び少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又は10のヒトインターフェロンアルファ (IFN) サブタイプと結合し、それらの活性を中和する、単離されたモノクローナル抗体。

2) 抗体が、ヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G及びIFN J1と結合し、活性を中和する、実施形態1に記載の抗体。

3) 抗体が、ヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G及びIFN J1と結合し、活性を中和する、実施形態1又は2のいずれかに記載の抗体。

30

4) 抗体が、ヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J1及びIFN Aと結合し、活性を中和する、実施形態1~3のいずれか1つに記載の抗体。

5) 抗体が、ヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J1、IFN A及びIFN H2と結合し、活性を中和する、実施形態1~4のいずれか1つに記載の抗体。

6) 抗体が、ヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J1、IFN A、IFN H2及びIFN Kと結合し、活性を中和する、実施形態1~5のいずれか1つに記載の抗体。

7) 抗体が、ヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J1、IFN A、IFN H2、IFN K及びIFN WAと結合し、活性を中和する、実施形態1~6のいずれか1つに記載の抗体。

40

8) 抗体が、ヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN C、IFN F、IFN G、IFN J1、IFN A、IFN H2、IFN K、IFN WA及びIFN 4aと結合し、活性を中和する、実施形態1~7のいずれか1つに記載の抗体。

9) 前記ヒトIFN 及びヒトIFN サブタイプの活性が、転写因子2 (STAT2)、インターフェロン調節因子9 (IRF9)、並びに分泌胚アルカリホスファターゼ (SEAP) のシグナル伝達因子及び活性化因子を安定に発現するHEK293細胞におけるインターフェロン誘導性ISG54プロモーター下でのSEAPの阻害である、実施形態1~8のいずれか1つに記載の抗体。

50

10) 前記抗体が、実施例3における「親和性の測定」の項で定義した条件下で、約 5×10^{-8} M未満、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、又は約 1×10^{-12} M未満の IC_{50} 値でヒトIFN の活性を阻害し、且つ、 5×10^{-8} M未満、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、又は約 1×10^{-12} M未満の IC_{50} 値でIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G又はIFN J1の活性を阻害する、実施形態1~9のいずれか1つに記載の抗体。

11) 前記抗体が、約 5×10^{-9} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 5×10^{-10} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 5×10^{-11} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 5×10^{-12} M未満又は約 5×10^{-12} M未満の解離定数 (K_D) のヒトIFN と結合し、約 5×10^{-9} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 5×10^{-10} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 5×10^{-11} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 5×10^{-12} M未満、又は約 5×10^{-12} M未満の K_D のヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G又はIFN J1と結合する、実施形態1~10のいずれか1つに記載の抗体。

12) 前記抗体が、ヒトIFN 、並びにヒトIFN サブタイプIFN B2、IFN F、IFN G及び/又はIFN J1との結合のために、以下を含む単離抗体と競合する、実施形態1~11のいずれか1つに記載の抗体。

a) 重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列 (配列番号23)、及び軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列 (配列番号24)、又は、

b) VHアミノ酸配列 (配列番号27)、及びVLアミノ酸配列 (配列番号28) を含む単離された抗体である。

13) 前記抗体が、配列番号1の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN と結合する、実施形態1~12のいずれか1つに記載の抗体。

14) 前記抗体が、配列番号1の残基F27、L30、及びR33でIFN と結合する、実施形態1~13のいずれか1つに記載の抗体。

15) 前記抗体が、配列番号1の残基P26、K31、及びR34からなる群から選択される少なくとも1つのIFN 残基と更に結合する、実施形態1~14のいずれか1つに記載の抗体。

16) 前記抗体が、配列番号1の残基R22、R23、I24、S25、P26、K31、D32、R34、D35、Q40、K134、M146、E147、M149、K150、F153及びL154からなる群から選択される少なくとも1つのIFN 残基と更に結合する、実施形態14又は15のいずれか1つに記載の抗体。

17) 前記抗体が、配列番号19の残基F27、L30、及びR33の1つ以上でIFN 4aと結合する、実施形態1~16のいずれか1つに記載の抗体。

18) 前記抗体が、配列番号19の残基F27、L30、及びR33でIFN 4aと結合する、実施形態1~17のいずれか1つに記載の抗体。

19) 前記抗体が、配列番号19の残基H26、K31及びR34からなる群から選択される少なくとも1つのIFN 4a残基と更に結合する、実施形態17又は18のいずれか1つに記載の抗体。

20) 前記抗体が、配列番号19の残基A19、G22、R23、I24、S25、H26、C29、K31、D32、H34、D35、V143、A146、E147、M149、R150及びS153からなる群から選択される少なくとも1つのIFN 4a残基と更に結合する、実施形態17~19のいずれか1つに記載の抗体。

21) 前記抗体がウイルス誘導性白血球インターフェロンの活性を阻害する、実施形態1~20のいずれか1つに記載の抗体。

22) 前記ウイルス誘導性白血球インターフェロンの活性が、 100 U/mL のインターフェロンによって誘導された全血中におけるIP-10の放出である、請求項21に記載の抗体。

23) 前記活性が、 $50 \mu\text{g/mL}$ の抗体の存在下で50%超阻害される、請求項22に記載の抗体。

10

20

30

40

50

24) 前記抗体が、全身性エリテマトーデス (SLE) 免疫複合体によって誘導される IFN の活性を阻害する、実施形態 1 ~ 23 のいずれか 1 つに記載の抗体。

25) 前記活性が、約 50% 超阻害される、請求項 24 に記載の抗体。

26) 抗体であって、

a) 重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列 (配列番号 23)、及び軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列 (配列番号 24)、又は、

b) 重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列 (配列番号 27)、及び軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列 (配列番号 28) を含む、実施形態 1 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の抗体。

27) 前記抗体がヒトインターフェロン (IFN) と結合せず、中和しない、実施形態 1 ~ 26 のいずれか 1 つに記載の抗体。 10

28) 前記抗体が IFN D と結合せず、中和しない、実施形態 1 ~ 27 のいずれか 1 つに記載の抗体。

29) 前記抗体が、ヒト、ヒト化、又はヒト適応型である、実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の抗体。

30) 前記抗体が、IgG1 型、IgG2 型、IgG3 型、又は IgG4 型アイソタイプである、実施形態 1 ~ 29 のいずれか 1 つに記載の抗体。

31) 前記抗体がヒ二重特異性である、実施形態 1 ~ 30 のいずれか 1 つに記載の抗体。

32) 前記抗体が、Blys、CD40L、IL-6、CD27、BDCA2、又は IL-12 若しくは IL-23 の p40 サブユニットと結合する、実施形態 31 に記載の抗体。 20

33) 実施形態 1 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の抗体と、医薬的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

34) IFN 及び / 又は IFN の産生の増加に関連する疾患の治療又は予防に使用するための、実施形態 1 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の抗体、又は実施形態 33 に記載の医薬組成物。

35) IFN 及び / 又は IFN の産生の増加に関連する疾患が、免疫媒介炎症性疾患であり、所望により、前記免疫媒介炎症性疾患が、全身性エリテマトーデス (SLE)、I 型糖尿病、原発性シェーグレン病、全身性硬化症、又は関節リウマチである、実施形態 34 にしたがった使用のための、実施形態 1 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の抗体、又は実施形態 33 に記載の医薬組成物。 30

36) 患者が I 型インターフェロンシグネチャを呈する、実施形態 34 又は 35 にしたがった使用のための、実施形態 34 又は 35 のいずれか 1 つに記載の抗体、又は実施形態 33 に記載の医薬組成物。

37) 前記抗体が二重特異性抗体であり、前記二重特異性抗体が、Blys、CD40L、IL-6、CD27、BDCA2、又は IL-12 及び IL-23 の p40 サブユニットと結合する、実施形態 34 ~ 36 にしたがった使用のための、実施形態 1 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の抗体、又は実施形態 33 に記載の医薬組成物。

38) 患者における IFN 及び IFN サブタイプ IFN B2、IFN C、IFN F、IFN G 及び / 又は IFN J1 と IFNAR との相互作用の阻害における使用のための、実施形態 1 ~ 32 又は 37 のいずれか 1 つに記載の抗体、又は実施形態 33 に記載の医薬組成物。 40

39) 前記患者が免疫媒介炎症性疾患を有し、所望により、前記免疫媒介炎症性疾患が、全身性エリテマトーデス (SLE)、I 型糖尿病、乾癬、原発性シェーグレン病、全身性硬化症、又は関節リウマチである、実施形態 38 にしたがった使用のための抗体又は医薬組成物。

40) 患者が I 型インターフェロンシグネチャを呈する、実施形態 38 又は 39 にしたがった使用のための抗体又は医薬組成物。

41) 前記抗体が二重特異性抗体であり、前記二重特異性抗体が、Blys、CD40 50

L、IL-6、CD27、BDCA2、IL-12及びIL-23のp40サブユニット、又はBDCA2と結合する、実施形態38~40のいずれか1つにしたがった使用のための抗体又は医薬組成物。

【0117】

次に本発明を以下の具体的かつ非限定的な実施例を参照して説明する。

【実施例】

【0118】

実施例1．免疫付与、ファージパニング、抗体の特徴付け、及び結晶学研究に使用されるヒトI型IFN抗原の生成：

以下を含む、12の個別の組換えヒトI型IFN（A(2a)(配列番号5)、B2(8)(配列番号6)、C(10)(配列番号7)、D(1)(配列番号8)、F(21)(配列番号9)、G(5)(配列番号10)、H2(14)(配列番号11)、I(17)(配列番号12)、J1(7)(配列番号13)、K(6)(配列番号14)、4b(4)(配列番号15)、WA(16)(配列番号16)、及びチンパンジーIFN(chimp IFN)(配列番号3)を、配列番号17~21のようなシグナル配列を用い、標準的な方法を用いて、HEK293細胞において発現した。発現レベル及び可溶性を改善するために、ヒトIFNの80位のIFN-(T80E)で単一のアミノ酸変異体を生成し、HEK293細胞において発現した。T80E IFN変異体(配列番号2)は、野生型タンパク質と同等の活性を有していた。

10

20

【0119】

実施例2．IFN及びIFNと結合し中和する抗体の生成
マウスの接種

C2595の生成

ヒトIFN-、チンパンジーIFN-、及びカニクイザルIFN-の混合物をBALB/cマウスに複数回腹腔内接種した。0日目にマウスにチンパンジーIFN-を接種した。14日目に、同じマウスにチンパンジー及びカニクイザルのIFN-、IFN-D、IFN-J1、IFN-C、IFN-B2、IFN-H2、IFN-A、IFN-4a、IFN-G、IFN-F、IFN-WA及びIFN-Iの混合物を接種した。208日目に、同じマウスにカニクイザルIFN-、ヒトIFN-4b、IFN-A、IFN-D、及びIFN-Kの混合物を接種した。221日目に、同じマウスにカニクイザルIFN-、ヒトIFN-J、IFN-I、IFN-4a、IFN-A及びIFN-Fの混合物を接種した。接種後、特異的IgG力価を評価した。十分な力価が得られた直後に、脾細胞を単離してFO細胞と融合した。得られたハイブリドーマを96ウェルプレートに播種して10日間培養した。まず、チンパンジーIFN-の結合及びヒトIFN-A、IFN-H2、IFN-D、及びIFN-4aの混合物の結合に関して、ELISAを用いて一次スクリーンによって抗原特異性クローンを同定した。IFN-及び/又はIFN-へのハイブリドーマの結合は、Luminesx多重アッセイによって更にスクリーニングした。更なる研究のために、IFN-及びヒト並びにカニクイザルのIFN-のほとんどに広域結合するクローンを選定した。

30

40

【0120】

ファージディスプレイライブラリ

ヒトI型IFN結合性Fabは、de novo pIXファージディスプレイライブラリから選択した(Biol.397:385~396、2010；国際特許出願公開第WO2009/085462号、米国特許公開第US2010/0021477号、米国特許公開第US2012/0108795号)。

【0121】

IFWM43の選定

pIXファージディスプレイライブラリは、ヒト野生型IFN-配列C末端ポリヒスチジンタグの発現から生成され、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより精

50

製した、精製されたI型IFN A (IFN 2) に対してパニングした。3ラウンドのパニングを用いた。第1、第2、及び第3ラウンドのパニングに、それぞれ、100 nM、10 nM及び1 nMのビオチン化抗原を使用した。3ラウンドのパニング後に採取したファージミドクロン由来のモノクローナルFabについて、標準のELISAを用いて、それらが結合するチンパンジーIFN、ヒトIFN 2、IFN 1、IFN H2、IFN G、IFN F及びアビジンに関して一次スクリーニングした。ELISAにおいて、IFN 及びIFN- に特異的に結合したFabフラグメント (Fab) を配列決定し、それらが異なるV領域配列を有している場合には、一意のIFNバインダーとして同定した。それらのFabを、ヒトIgG1 mAbに変換し、抗炎症活性の同定と関係する細胞ベースの一連のアッセイにおいてそれらの中和活性を更に試験した後、IFNバインダーとして同定した。

10

【0122】

IFWM88の同定

pIXファージディスプレイライブラリは、ヒト野生型IFN- 配列C末端ポリヒスチジンタグの発現から生成され、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製した、精製されたI型IFN G (a5) に対してパニングした。3ラウンドのパニングを用いた。第1、第2、及び第3ラウンドのパニングに、それぞれ、100 nM、10 nM及び1 nMのビオチン化抗原を使用した。3ラウンドのパニング後に採取したファージミドクロン由来のモノクローナルFabについて、標準のELISAを用いて、それらが結合するチンパンジーIFN、ヒトIFN 2、IFN 1、IFN H2、IFN G、IFN F及びアビジンに関して一次スクリーニングした。ELISAにおいて、IFN 及びIFN- に特異的に結合したFabフラグメント (Fab) を配列決定し、それらが異なるV領域配列を有している場合には、一意のIFNバインダーとして同定した。それらのFabを、ヒトIgG1 mAbに変換し、抗炎症活性の同定と関係する細胞ベースの一連のアッセイにおいてそれらの中和活性を更に試験した後、IFNバインダーとして同定した。

20

【0123】

生成した抗体の可変領域のアミノ酸配列は以下の通り：IFWM43 VH：配列番号23；IFWM43 VL：配列番号24；IFWM88 VH：配列番号25；IFWM88 VL：配列番号26；C2595 VH：配列番号21；C2594 VL：配列番号28。C2595可変領域はヒトIgG1定常領域に移され、得られた抗体はM3239と命名した。IFWM43はM43とも呼ばれ、IFWM88はM88と呼ばれる。

30

【0124】

実施例3．IFN 及びIFN と結合し中和する抗体の特徴付け方法

親和性の測定

抗体の結合親和性は、Protein (Bio-Rad Hercules、カリフォルニア州) でSPR技術を用いて行われた。製造業者の推奨した標準NHS/EDC化学を用いて、ヤギの抗ヒトFc抗体 (製造) をGLCチップ (Bio-Rad Hercules、カリフォルニア州) にアミンカップリングした。次に、抗IFN mAbを、抗体とカップリングしたチップに30 µL/分の流量で2分間負荷した。50 µL/mLの流量で2分間、ランニング緩衝液 (緩衝液の組成) で洗浄した後、1：3希釈で100 nM～1.23 nMまでの範囲の5つの異なる濃度で、組換えIFN抗原を3分間会合させ、10分間解離させた (どちらも50 µL/mLの流量で)。チップは、異なる抗原の実行の間に各方向において100 mMのリン酸を用いて生成した。Proteinマネージャ (Bio-Rad Hercules、カリフォルニア州) を用いて、データ解析を行った。センサーグラムは、mAbによって分類した。(インタースポット又はブランクチャンネル基準のいずれかを使用して) 整列及び基準補正を適用した後、SPRデータを運動速度定数のラングミュアモデルにグローバルに適合させた ($K_D = k_{off} / k_{on}$ 、式中、K

40

50

D_0 = 平衡解離定数、 k_{on} = 会合速度定数、 k_{off} = 解離速度定数)。

【0125】

ISREレポーター遺伝子アッセイ(「ISREレポーター遺伝子アッセイ」)

完全に活性なI型IFNシグナル伝達経路を発現する(STAT2及びIRF9を安定に発現する)ように操作され、IFN / 誘導性ISG54プロモーターの制御下でSEAPレポーター遺伝子でトランスフェクトされた、HEK-Blue(商標)IFN / 細胞(In vivo Gen(カリフォルニア州San Diego))を使用した。細胞は、10%ウシ胎児血清、100ug/mLのプラストサイジン、及び30ug/mLのゼオシンでDulbeccoの改変イーグル培地中のコラーゲンI型コーティングされたT150フラスコにて、37、5%CO₂で増殖した。細胞を採取し、384ウェルプレートに、1mLにつき50,000個の細胞で、各ウェルに50μLを播種した。播種した細胞を37、5%CO₂で24時間インキュベートした。試験したインターフェロン試料は、調製し、使用済みのHEK ISRE無血清培地中で希釈し、IFN試料50μLを各ウェルに加えた。播種した細胞を37、5%CO₂で20時間インキュベートした。室温で20分間インキュベートした後、60μL/ウェルのQUANTI-Blue(商標)を濾過水中に再懸濁した20μLの播種した細胞上清から、アルカリホスファターゼが検出された。Biotek Synergyプレートリーダーで650nmで光密度を読み取った。

10

【0126】

いくつかのISREレポーター遺伝子アッセイは、以下のように96ウェルプレートで行った。HEK-Blue(商標)IFN / 細胞(In vivo Gen、カリフォルニア州San Diego)を、無選別培地(DMEM+Glutamax/10%FBS、Gibco)100μLに各ウェルに50,000個の細胞で播種し、37で一晩インキュベートした。翌日、I型IFN刺激因子を、別の96ウェルU底トランスファープレート(BD Falcon)において、I型IFN阻害剤あり又はなしで調製し(すなわち、組換えインターフェロン、白血球IFN、IC誘導したIFNプレップ、血清等)、10分間37で予め温めた。インキュベータから細胞プレートを取り出し、培地を取り除き、96ウェルU底トランスファープレートにおいて調製した100μLの適切処置物と交換した。細胞を再び37に24時間置いた。翌日、40μLの上清を、160μLのQUANTI-Blue(商標)SEAP基材(In vivo Gen)を含む96ウェル平底プレート(BD Falcon)に移した。プレートを約15分間発色させ、650nmの吸光度で分光計を使用して読み取った。

20

30

【0127】

IP-10放出アッセイ

健康なボランティアからのヘパリン化全血を、アイソタイプ対照と共に、いくつかの異なるI型IFN阻害剤を含有する96ウェルU底プレートに播種した。阻害剤及び適切なアイソタイプ対照を、10%FBSを用いたRPMI培地にて希釈した。IFN及び阻害剤又はアイソタイプ対照を、10%FBSを含有する体積30μLのRPMI培地中に希釈した。それらの試料を15~20分間予めインキュベートした後、その希釈液を含有するプレートにヘパリン化した全血240μLを加えて、270μLの最終体積を得た。試料を混合し、37で20~22時間インキュベートさせた。インキュベーション後、試料を400Xgで5分間遠心分離し、血漿を回収し、後の分析のために凍結した。IP-10プロファイリングは、Milliplexサイトカイン/ケモカインキット(Millipore、Premixed 39プレックスで行った。試料の調製及びアッセイは、BioRadモデル(Bioplex(商標)200)システム及びBioplexマネージャ(商標)ソフトウェア4.1を用いてデータを収集し、製造業者の推奨に従って行った。統計解析はGraphPad Prism V.5ソフトウェアにより行った。場合によっては、IP-10の定量化を、Qiagenの単一検体ELISAキットを用いて行った。

40

【0128】

50

SLE全血遺伝子シグネチャアッセイ

SLEドナーの全血をAsterandから市販により入手した。全血遺伝子発現解析は、IFN刺激遺伝子(ISG)が濃縮されたプライマー及びプローブを含有するカスタムTaqMan低密度アレイカードを用いて行った。アレイに含まれていた遺伝子は以下の通り。ACTB、IL6、IL10、IL13、FAS、IL15、IL21、IL17A、EIF2AK2、OASL、18S、STAT1、LY6E、PLSCR1、MX1、IFIT1、IFI44、IFI44L、IFI27、ISG15、RSAD2、CXCL10、LAG3、及びTNFSF10。製造業者の使用説明書に従って、ABI Prism 7900 HT Sequence Detectionシステム(Appplied Biosystems、米国カリフォルニア州)でRT-PCR増幅を行った。相対的発現値を、比較閾値サイクル(C_t)法を用いて算出した。端的に述べると、この手法は、 2^{-C_t} を用いて、校正群(健常な未処置の全血)に対して正規化した標的遺伝子の発現を算出する。ベータアクチン(ACTB)を内在性対照として選択した。閾値サイクル(C_t)は、その量の増幅した標的が一定の閾に達するサイクル数を示す。全てのインターフェロン誘導標的遺伝子及びACTBの C_t データを用いて、 C_t 値 [$C_t = C_t(\text{標的遺伝子}) - C_t(\text{ACTB})$]を得た。 C_t 値は、対照群(5人の健常な未処置の全血ドナー)の平均を各標的の C_t 値から減算して算出した。相対発現値は、等式 2^{-C_t} を用いて算出した。本実験の3人のSLEドナーは、低密度アレイの9つのISGに関して少なくとも対照群の2倍の高さの遺伝子発現を有していた。3人の全てのドナーに対するI型IFN阻害剤の作用を比較するために、最初に、あらゆる治療/阻害剤について以下の式を用いて阻害率(%)を決定した。

$(2^{-C_t \text{ SLE未処置血液}} - 2^{-C_t \text{ 阻害剤}}) / 2^{-C_t \text{ SLE未処置血液}} \times 100 = \text{阻害率}(\%)$ 。次に、3人の全てのドナーに対する各処置についてのベースライン(%)を以下の等式によって算出した。 $100 - \text{阻害率}(\%) = \text{ベースライン}(\%)$ 。

【0129】

次に、処置群による3人の全てのドナーの平均ベースライン(%)を、9つの遺伝子のそれぞれについて決定した。この群がベースラインから100%であることを示すために、未処置SLE群(「SLE血液のみ」)を100に設定した。ベースラインは、IFN誘導遺伝子発現が0%であることを示す。最後に、9つの全ての遺伝子に対する各治療群の平均及び標準偏差を決定し、プロットした。スチューデントのt検定を行うことによって、統計的有意性を決定した。

【0130】

SLE免疫複合体の調製

SLE患者の血漿をSCIPAC(Kent、イギリス)から入手した。ISREに基づくレポーター遺伝子アッセイによって、I型IFN活性を有する血漿試料を更にIgG精製に使用した。IgGは、製造業者(Thermo Scientific)の推奨するNAB(商標)タンパク質A/Gスピンカラムを用いて精製し、濃度を決定するためにタンパク質アッセイ(Pierce BCA)を実行した。1Xリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に 5×10^7 細胞/mLで懸濁したHEK293T細胞を用いて、自己抗原溶解物を調製した。HeK293-T細胞を破壊するために、 -80°C で少なくとも10分間(ただし最初の凍結は少なくとも30分間)凍結させてから 37°C で融解する凍結融解サイクルを4回行い、この凍結融解後、細胞の破片を遠心分離により除去し(5分間400g)、可溶性抗原の量をタンパク質アッセイによって定量した。1:1の比率で、精製したIgGと壊死細胞の溶解物とをいっしょに30分間RTでインキュベートして、免疫複合体を形成した。次いで、各ウェルにつき合計4mLのPBMC培地において、400 $\mu\text{g/mL}$ の最終濃度の免疫複合体を6ウェルプレートの3つのウェルに加えた。上述のように健康ドナーのIgGを精製及び「複合化」し、対照として使うためにPBMCを刺激するために用いた。これらの研究からの馴化培地をアリコートし、阻害実験のための内因性IFNのためのソースとして使用した。健康ボランティアから単離されたIgGから

調製した製剤では、IFN活性は認められなかった。

【0131】

結果

組換えI型IFNの親和性及び中和

表2は、個々の組換えヒトI型インターフェロン(IFN)に対する抗体M43、M88、及びM3239の解離定数(K_D)を示す。M43、M88、及びC2595は、少なくとも4つのIFN分子(アルファB2、アルファF、アルファG及びアルファJ1)を中和した。アルファDについては、結合は認められなかった。

【0132】

表3は、レポーター遺伝子アッセイで測定された個々の組換えヒトI型IFNに対する抗体M43、M88、及びM3239(C2595)の IC_{50} 値を示す。M43は、少なくとも10のIFN分子を阻害しており、広域中和性であった。M3239はサブ μ M IC_{50} でIFNを中和し、M43はnM範囲内の IC_{50} でIFNを中和した。M88は、その非常に弱い結合のために、この特定のアッセイではIFNに対する中和活性を示さなかった。しかしながら、親和性成熟後、M88由来の抗体は強いIFN中和活性を示す一方で、それらの広域のIFN中和活性を維持した(データは示されていない)。これらの抗体はいずれもIFNと結合せず、中和しなかった。

【0133】

【表2】

表2

抗原	抗体 K_D (nM)		
	M43	M88	M3239
IFN α A	0.1	14.9	NB
IFN α B2	0.9	0.3	32.2
IFN α C	0.4	3.2	1.3
IFN α D	NB	NB	NB
IFN α F	0.9	1	15.1
IFN α G	0.6	0.8	10.3
IFN α H2	0.6	5.5	61.6
IFN α J1	0.4	4.5	4.3
IFN α K	0.3	ND	NB
IFN α I	ND	ND	ND
IFN α WA	0.6	97.3	NB
IFN α 4a	1.7	23.3	NB
IFN β	8	NB	NB
IFN ω	0.3	53	4.5

NB=結合なし

ND=未試験

c2595由来のM3239ヒト/マウスキメラIgG1

【0134】

10

20

30

40

【表 3】

表 3

抗原	抗体IC ₅₀ (nM)		
	M43	M88	C2595
IFN α A	0.1	NA	NA
IFN α B2	25.9	25.2	11.1
IFN α C	14.9	136.1	1.5
IFN α D	NA	NA	NA
IFN α F	3.7	24.6	2.6
IFN α G	5.3	23.4	2.6
IFN α H2	51	PA	20.3
IFN α J1	1	21.9	1.4
IFN α K	10.4	NA	NA
IFN α I	ND	ND	ND
IFN α WA	9.2	NA	NA
IFN α 4a	8.1	218.6	NA
IFN β	NA	NA	NA
IFN ω	18.5	NA	0.9

NA: 中和活性なし

PA: 部分的中和活性

ND: 未試験

【0135】

内因性 I 型 IFN の中和

内因性 I 型 IFN を中和する抗体の能力は、内因性白血球 IFN (ウイルス誘導した) 又は組換え IFN で刺激したヒト全血からのケモカイン IP-10 (CXCL10) の放出を評価するアッセイで評価した。白血球 IFN (図 1A) 及び組換え IFN (図 1B) の両方の用量依存性阻害が、M43 及び C2595 に認められ、ウイルス誘導された白血球によって精製されるような広範なスペクトルの I 型の活性を中和する抗体の能力が示された。内因性白血球 IFN は Sigma (カタログ番号 I4784-1MU) から購入した。

【0136】

疾患関連 IFN ミリユーの中和

SLE に存在する I 型 IFN ミリユーをより正しく代表するために、刺激としての SLE 免疫複合体誘導した IFN を減少する抗体の能力について、抗体を試験した。SLE 免疫複合体誘導した IFN は、SLE 患者由来の免疫複合体でヒト PBMC を刺激することによって調製し、阻害剤 mAb 及び対照 mAb の存在下で I 型 IFN 誘導性のレポーター遺伝子のアッセイ (上記の ISRE レポーター遺伝子アッセイ) に、この条件付けした培地を使用した。選択的 IFN 中和性の mAb を 3 つの異なる IFN アンタゴニストとの組み合わせにおいて添加したところ、等量のアイソタイプ対照 mAb の存在下での抗 IFN mAb と比べて、免疫複合体誘導した IFN の総活性は更に低下した (図 2)。更に、抗 IFN / mAb M43 は、IFN 阻害剤 mAb と比べて、更なる活性の抑制を示し、IFN 及び IFN の両方の遮断が、IFN の中和のみの場合よりも総 IFN 活性を低下し得ることを示した (図 2)。

【0137】

SLE 関連 IFN ミリユーへの IFN の寄与

上述のように、9 つの IFN 誘導した遺伝子の組み合わせを用いて、SLE 遺伝子シグネチャのアッセイを開発した。遺伝子シグネチャを阻害する多様な抗体の能力を試験した

10

20

30

40

50

。IFN 特異性アンタゴニストmAb (抗-) は同等の濃度のアイソタイプ対照mAbと比べてIFNシグネチャを下方調節し、IFN- がSLEにおいてIFNシグネチャを誘導する活性のI型IFNミリューの一部であることを示した。IFN抗体とIFN抗体との組み合わせは、IFN又はIFN阻害剤単独よりも、これらの患者の血液中で永続するIFNシグネチャのより顕著な抑制をもたらした(図3)。

【0138】

実施例4競合的エピトープマッピング

エピトープ結合実験は、Octed (ForteBio、カリフォルニア州Menlo Park)を用いてリアルタイム無標識競合結合アッセイを使用して行った。イン・タンデムアッセイ形式及び古典的サンドイッチアッセイ形式の2つのアッセイ形式を使用した。

10

【0139】

イン・タンデムアッセイ形式では、リアルタイム運動シグナルを測定しながら、ストレプトアビジンバイオセンサーチップ (forteBio、カリフォルニア州Menlo Park)を5分間0.5µg/mLのピオチン化した組換えインターフェロンに浸漬した。次いで、それらのチップをmAbの第1セット(10µg/mL)に15分間浸漬した。その後、それらのチップをmAbの第2セット(10µg/mL)に更に10分又は15分間浸漬した。第2セットのmAbに浸漬したチップからの正の結合シグナルは、第1のmAbセットと異なるエピトープへのそれらの結合を示し、負のシグナルは、同じエピトープへのそれらの結合を示す。それらの2つのmAbセットの親和性の差による誤った結果を排除するために、その実験を逆順で、すなわち第2のmAbセットを最初に浸漬してから第1のmAbセットに浸漬して、反復した。全ての抗体及び抗原は、1mg/mLのBSA及び0.02%のTween 20を用いてPBS中に希釈した。

20

【0140】

古典的サンドイッチアッセイ形式では、製造業者 (forteBio、カリフォルニア州Menlo Park)のプロトコルに従って、第1のmAbセットを、標準的なNH₂/EDC媒介化学を用いたアミン反応性バイオセンサーチップに結合した。エタノールアミンにて5分間急冷した後、チップを組換えインターフェロン(2µg/mL)に10分間浸漬し、次いで、第2のmAbセット(15µg/mL)に10又は15分間浸漬した。カップリングmAbはMES緩衝液6.0中に希釈し、一方、ビニングmAb及び抗原は1mg/mLのBSA及び0.02%のTween 20を用いてPBS中に希釈した。

30

【0141】

3つのエピトープビニング実験を、以下の抗体を用いて両方のアッセイ形式を使用して行った。M43、M88、及びC2595(複数のIFNサブタイプ及びIFNの結合)、C2601及びM42(IFNと結合するが、IFNサブタイプとは弱く結合する)、並びにC2605(複数のIFNサブタイプと結合するがIFNとは結合せず)。様々なIFN-分子を競合アッセイ(ヒトIFNサブタイプIFN A、IFN B、IFN C、IFN F、IFN G、IFN H、IFN J、IFN 2、IFN 4a、及びチンパンジーIFN並びにヒトIFNAR2-Fc分子)で試験した。

40

【0142】

表4は、M43の存在下での競合の結果を示し、表5はIFNAR2-Rcの存在下での競合を示す。M43とM88は試験した全てのIFN分子及びチンパンジーIFNへの結合に関して互いに競合した。IFNに結合しないM42は、試験したM43を有するIFN-分子との結合に関して競合しなかった。M43は、IFN及び多様なIFN分子との結合に関してC2595及びIFNAR-Fcと競合した。C2605は、ほとんどのIFNに対して、M43と結合を競合せず、これら2つの抗体が異なるエピトープに結合することを示した。強いIFNバインダーだが弱いIFNバインダーであるC2601はM43を有するIFNとの結合に関してM43と結合せず、これら2

50

つの抗体が別個のエピトープと結合することを示した。C2601又はC2605ではなく、C2595は、チンパンジーIFN及び/又はIFNとの結合に関してIFNAR2-Fcと競合しなかった。IFN及び複数のIFNサブタイプと結合する抗体、したがって別個のエピトープピンを画定する抗体は、以下の通り。BinA:mab M43、M88、C2595。IFN又はIFNのみと結合する抗体は別個のエピトープピンを形成する。

【0143】

【表4】

表4

抗原	抗体又は受容体融合タンパク質						
	M80	M88	M42	C2595	c2601*	c2605**	IFNAR2-Fc
IFN α A	—	未試験	+	—	+	++	—
IFN α B	未試験	—	未試験	—	—	—	—
IFN α C	未試験	—	未試験	—	—	++	—
IFN α F	未試験	—	未試験	—	+	++	—
IFN α G	未試験	—	+	—	—	++	—
IFN α H	—	—	+	—	—	++	—
IFN α J	未試験	—	未試験	—	—	++	—
IFN α 2	—	未試験	未試験	—	+	++	—
IFN α 4a	未試験	—	未試験	—	—	++	—
チンパンジーIFN ω	—	—	未試験	—	++	—	—

「—」は結合がないことを示す。

「+」又は「++」は結合を示す。

NT: 未試験

*c2601は高親和性を有するIFN α Aと結合しない。

**c2605はチンパンジーIFN ω と結合しない。

【0144】

【表5】

表5

抗体	抗原	
	チンパンジーIFN ω	IFN α A
C2595	—	—
C2601	++	—*
C2605	—**	++

*c2601は高親和性を有するIFN α Aと結合しない。

**c2605はチンパンジーIFN ω と結合しない。

【0145】

実施例5. IFN T80E変異体との複合体における抗IFN / 抗体M43の結晶構造由来のM43のエピトープ

IFWM43(以下、mAbについてはM43、FabについてはFabM43)は、ヒトIFN分子及びIFNを広域に中和し、多くのIFNサブタイプ及びヒトIFNとの結合を示す。IFNサブタイプ及びIFNに対するその特異性に関する構造的ベースを明らかにするために、FabM43との複合体におけるIFN-の結晶構造を決定した。

【0146】

材料と方法

タンパク質

Hisタグ付けしたFabM43(IgG1 / アイソタイプ)及びT80E変異(本

例においてIFN γ 及びIFN γ T80Eは同義)をHEK293F細胞にて発現し、アフィニティ及びサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。タンパク質は、20 mMのトリス、pH 7.4、50 mMのNaClにおける量である。

【0147】

IFN γ / FabM43複合体の結晶化

この複合体は、1.05 : 1.0 (過剰のIFN γ) のモル比でIFN γ をFabM43と混合することによって調製し、20 mMの酢酸Na (pH 5.5)、0.1 M NaCl、及び10%グリコールで平衡したSuperdex 200カラムで精製した。精製した複合体を、Amicon-Ultra 10kDaカットオフを用いて10.24 mg/mLに濃縮した。X回折に適した結晶は、記載されているように(Olmolovaら、Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66:927~33、2010)、MMS播種した26%のPEG 3350、1 MのLiCl、0.7%の1-ブタノールからのシッティングドロップにて得た。

10

【0148】

X線データ収集及び構造決定

X線データ収集については、結晶を、20%グリセロールを補充した合成母液(0.1 M MES (pH 6.5)、20% PEG 3350、1 M LiCl)に数秒間浸し、液体窒素中でフラッシュ凍結させた。X線回折データはSwiss Light Sourceで収集した。X線データはプログラムXDS (Kabsch、Acta Crystallographica 66:125~132、2010)で処理した。X線データ統計を表6に示す。

20

【0149】

構造は、Phaser (Read、Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57:1373~82、2001)を用いて分子置換(MR)で解析した。MRの検索モデルはFab15 (PDB ID 3NCJ; Luoら、J Mol Biol 402:708~719、2010)及びIFN γ -2 (PDB ID 1RH2; Radhakrishnanら、Structure 4:1453~1463、1996)の結晶構造であり、C α モデルはPDBにおいて入手可能である。MRに使用するために、C α 座標及びPDBでの反射データを用いてPhaserを使用してMRによってIFN γ -2の完全な分子モデルを取得し、PHENIXで精密化した(Adamsら、J Synchrotron Radiat 11:53~55、2004)。IFN γ / FabM43構造はPHENIXを用いて精密化し、モデルの調製はCOOTを用いて実行した(EmSLEY and Cowtan、Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60:2126~2132、2004)。他の全ての結晶学的計算は、CCP4のプログラムスイートを用いて行った(Collaborative Computational project、Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 53:240~255、1994)。可変ドメインと定常ドメインとの間のエルボー角度は、RBO Wプログラムを用いて計算した(Stanfieldら、J Mol Biol 357:1566~1574、2006)。分子グラフィックはPyMolを用いて生成した(DeLano、Palo Alto、CA、USA、DeLano-Scientific)。構造精密化統計を表6に提供する。

30

40

【0150】

【表 6】

表 6. 結晶データ及び精密化統計

X線回折データ		
空間群	P2 ₁	
単位細胞寸法		
a、b、c (Å)	132.20、107.35、142.48	
α、β、γ (°)	90、101.96、90	
非対称単位の内容	6つの複合体	
分解能 (Å)	50.00–2.50	(2.56–2.50) ^d
測定した反射数	357,014	(3,854) ^d
独立の反射数	110,299	(1,929) ^d
完全性 (%)	82.1	(19.1) ^d
冗長度	3.2	(2.0) ^d
R-merge ^a	0.085	(0.404) ^d
<I/σ> (avg)	10.0	(2.1) ^d
B因子 (Wilson) (Å ²)	51.3	
改良版		
分解能 (Å)	48.50–2.50 (2.58–2.50)	
R _{cryst} /R _{free} (%) ^b	23.4/27.7 (36.3/49.9)	
反射数		
ワーキング/テストセット	109,900/1,610	
原子数		
タンパク質	27,056	
溶媒 (水など)	1,228	
RMSD結合長 (Å)	0.004	
RMSD結合角 (°)	0.76	
B因子平均値 (Å ²)		
タンパク質	35.9	
溶媒	36.2	
ラマチャンドラプロット ^c		
有利な領域 (%)	96.4	
アウトライヤー (%)	0.4	

^a $R_{merge} = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$ 、式中、 I は測定された反射の強度であり、 $\langle I \rangle$ はこの反射の全ての測定値の平均強度である。 40

^b $R_{cryst} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$ 、式中、 F_{obs} 及び F_{calc} は、観察され、算出された構造因子、 R_{free} は精密化の前にランダムに選択された反射の 5% のセットについて算出される。

^c ラマチャンドラプロットは MolProbity を用いて算出した。

^d a^* 、 b^* 及び c^* における異方性の解像限界は、回折異方性スケールサーバによれば、3.0、2.5、及び 2.5 である (http://__services__mbi__ucla.edu/__anisoscale/)。回折データ統計は、これらの限界を用いた、異方性の切り捨て及びスケリング後のデータセットに関する。

【0151】

結果

全体構造

非対称単位に6つのIFN / FabM43複合体が存在する。これらの複合体の全てが非常に類似している。IFN / FabM43複合体の全体的な分子構造を図4に示す。図面の説明Hの標識はVH、Lの標識はVL、左上はIFN である。

【0152】

IFN 分子は本質的に同一の立体配座を有し、平均C rmsdは0.35未満である。IFN の分子構造は、平均C rmsdが0.53であるIFN - 2と非常に類似したヘリックス束であり、C rmsdが0.47である公開されているIFN - (p d b i d 3 s e 4)及びIFN (94の残基に関してC rmsd 0.85)とほぼ同一である。しかしながら、IFN - のABループは残基1つ分短いので、IFN / とIFN - との間にはいくつかの有意な違いが存在する。Fab分子はまた、CDR - H1 (G₂₆GTF₂₉) (配列番号33)における短い部分を除いて同一の構造を有し、わずかに異なるバックボーン立体配座を採用する。

10

【0153】

エピトープ、パラトープ、及びAb / Agの相互作用

M43は、ABループ(R22とQ40の間)の残基及び残基K134、M146、M149、K150、F153並びにヘリックスEのL154で構成された立体配座エピトープを認識する(表7)。パラトープは6つのCDRのうち5つからの残基で構成されている。パラトープ残基は主に疎水性であり、一連のポケットを形成し、そこに、短いABヘリックスの残基F27、L30、K31及びR33の側鎖がドッキングする。抗体と抗原の相互作用は、ほとんどがvdw及び疎水性パッキングのように思われる。抗体と抗原の間には少数のH結合しかなく、それらのほとんどにバックボーン - バックボーン又は側鎖 - バックボーンの相互作用が関与している。Ab / Ag相互作用の大部分は、ABヘリックスのいくつかの残基F27、L30、K31及びR33によるものである。したがって、IFN のこの領域がエピトープの主な部分を構成しているように見える。

20

【0154】

【表 7】

表 7. 抗体M43のエピトープ及びパラトープ6つの全ての複合体の
接触残基が示されている。残基番号は、ヒトIFN ω （配列番号1）による。

	ABO	CDP	EFQ	GHR	IJX	KJT
VL:						
	Y31	Y31	Y31	Y31	Y31	Y31
	S33	S33	S33	S33	S33	S33
	Y38	Y38	Y38	Y38	Y38	Y38
	F98	F98	F98	F98	F98	F98
	D99	D99	D99	D99	D99	D99
	Y102	Y102	Y102	Y102	Y102	Y102
VH:				T28		
	F29	F29	F29	F29	F29	F29
	S30	S30	S30	S30		
	S31	S31	S31	S31	S31	S31
		Y32	Y32			Y32
	A33	A33	A33	A33	A33	A33
	G50	G50	G50	G50	G50	G50
			I51			
	I52		I52	I52	I52	I52
	I54	I54				
	F55	F55	F55	F55	F55	F55
	T57	T57	T57	T57	T57	T57
	A58	A58	A58	A58	A58	A58
	N59	N59	N59	N59	N59	N59
	D99	D99	D99	D99	D99	D99
	W101	W101	W101	W101	W101	W101
	Y105	Y105	Y105	Y105	Y105	Y105
IFN- ω						
	R22	R22	R22			R22
	P26	P26	P26	P26	P26	P26
	F27	F27	F27	F27	F27	F27
	L30	L30	L30	L30	L30	L30
	K31	K31	K31	K31	K31	K31
	D32	D32	D32	D32	D32	D32
	R33	R33	R33	R33	R33	R33
	R34	R34	R34	R34	R34	R34
	D35	D35	D35	D35	D35	D35
	Q40		Q40	Q40	Q40	Q40
	K134	K134	K134	K134	K134	K134
	M146	M146	M146	M146	M146	M146
	M149	M149	M149			M149
	K150	K150	K150	K150		K150
	F153	F153	F153	F153	F153	F153
	L154	L154	L154	L154	L154	L154

10

20

30

40

結合パートナーの3.9 以内の全ての残基は接触残基とみなす。抗体VL及びVHの残基は順に番号付けされる。

【0156】

抗体の中和形態

IFNAR1及び/又はIFNAR2との複合体中のIFN / の結晶構造は最近報告されている(Thomasら、Cell 146:621~632、2011)。M43/IFN 4の構造とIFN / IFNAR1/IFNAR2複合体との比較は、M43重鎖とIFNAR2の明らかなオーバーラップを示している。したがって、M43はIFNAR2/IFN相互作用を遮断することによって中和する。

【0157】

実施例6. IFN T80E又はIFN 4Aとの複合体中のFab357(C2595のFab)の結晶構造からのC2595のエピトープ

C2595(以下、mAbに関してはC2595、Fabに関してはFab357)は、複数のヒトIFN- 分子及びマウスハイブリドーマから得たIFN を中和する抗体である。V領域をクローンし、ヒト重鎖及び軽鎖(IgG1 アイソタイプ)にキメラ化して、組換えFab357を生成した。IFN- / Fab357及びIFN- 4A/Fab357の結晶構造を決定した。

【0158】

材料及び方法

タンパク質

Hisタグ付けしたFab357(IgG1/ アイソタイプ)及びT80E変異ヒトIFN (以下、IFN T80E。IFN と、T80Eを有するIFN とは、本実施例では同義)をHEK293F細胞において発現させ、アフィニティ及びサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。タンパク質は、20mMトリス(pH 7.4)、50mM NaClにおける量である。IFN 4Aは、20mMトリス(pH 7.4)、50mM NaClにおいて、Crown Bioscience Inc. から入手した。

【0159】

IFN- 4A/Fab357複合体及びIFN- / Fab357複合体の結晶化
IFN 4A/Fab357複合体は、1.05:1.0のモル比でIFN 4AとFab357とを混合することによって調製し、0.1M NaClを用いて、20mMのMES(pH 6.5)にて、SuperDex 200カラムで精製した。精製した複合体を5.5mg/mLに濃縮した。回折に適した結晶は、タンパク質溶液及び20%PEG 3350及び播種した0.2Mのクエン酸アンモニウムの等量の混合物を含むシッティングドロップ中で増殖した。

【0160】

IFN / Fab357複合体は、1.17:1.0(過剰のIFN)のモル比で、4 で2時間インキュベートしたIFN とFab357とを混合することによって調製し、このIFN / Fab357複合体を、20mM HEPES(pH 7.5)、0.1M NaClで平衡したSuperdex 200カラム(GE Healthcare)で精製し、6.8mg/mLに濃縮した。X回折に適した結晶は、タンパク質複合体と、播種した100mMのMES(pH 6.5)、18% PEG 3K、0.2M LiClとの混合物を含むシッティングドロップから得た。

【0161】

X線データ収集及び構造決定

X線データ収集については、IFN- 4A/Fab357及びIFN / Fab357の結晶を、20%グリセロールを補充した合成母液(それぞれに対応して、20% PEG 3350、0.2Mクエン酸アンモニウム、プレート10/20/11-MMS-A10;及び0.1MES(pH 6.5)、18% PEG 3350、0.2M LiCl、プレート12/21/2011-B11(R))中に数秒間浸漬し、液体窒素で

10

20

30

40

50

フラッシュ凍結した。X線回折データは、それぞれ、Advance Photon Source of Argonne National Lab及びSwiss Light Sourceで収集した。X線データはXDSプログラムにより処理した。X線データ統計を表8に示す。

【0162】

構造は、Phaserを用いた分子置換(MR)で解析した。MRの検索モデルは、Fab15(PDB ID 3NCJ)、及びM43との複合体としてのIFNの結晶構造であった。PHENIX⁵を用いてそれらの構造を精密化し、COOTを用いてモデルの調整を実行した。他の全ての結晶学的計算は、CCP4の一連のプログラムを用いて行った。分子グラフィックはPyMolを用いて生成した。構造精密化統計を表8に提供する。

10

【0163】

【表 8】

表 8. 結晶データ及び精密化統計

X線回折データ	IFN α 4A / Fab357	IFN ω / Fab357	
空間群	P6 ₅ 22	C222 ₁	
単位細胞寸法			
a、b、c (Å)	156.07、156.07、122.81	70.23、	
104.33、155.38			
α 、 β 、 γ (°)	90、90、120	90、90、90	10
非対称単位の内容	1複合体	1複合体	
分解能 (Å)	50.00–2.30 (2.36–2.30)	50.00–2.20	
(2.26–2.20)			
測定した反射数	260,405 (19,875)	193,190	
(13,207)			
独立の反射数	39,577 (2,888)	29,394	
(2,143)			
完全性 (%)	99.9 (100.0)	99.9 (99.9)	
冗長度	6.6 (6.9)	6.6 (6.2)	20
R-merge ^a	0.059 (0.618)	0.056	
$\langle I / \sigma \rangle$ (avg)	20.0 (3.3)	0.539	
B因子 (Wilson) (Å ²)	45.2	45.2	
精密化			
分解能 (Å)	39.30–2.30 (2.36–2.30)	43.31–2.20 (2.26–2.20)	
R _{cryst} / R _{free} (%) ^b	19.3 / 23.6 (25.4 / 31.1)	20.0 / 25.0 (22.1 / 28.3)	
反射数			
ワーキング / テストセット	37,572 / 1,998	27,390 / 2,000	30
原子数			
タンパク質	4,555	3,785	
溶媒 (水など)	198	180	
RMSD結合長 (Å)	0.008	0.005	
RMSD結合角 (°)	1.12	0.95	
B因子平均値 (Å ²)			
タンパク質	48.4	45.6	
溶媒	42.3	43.3	40
ラマチャンドラプロット ^c			
有利な領域 (%)	96.2	96.5	
アウトライヤー (%)	0.4	0.2	
全原子 Clashscore	9.8	8.9	

^a $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$ 、式中、 I は測定された反射の強度であり、 $\langle I \rangle$ はこの反射の全ての測定値の平均強度である。

^b $R_{cryst} = \sum ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum |F_{obs}|$ 、式中、 F_{obs} 及び F_{calc} は、観察され、算出された構造因子、 R_{free} は精密化の前にランダムに選択された反射の 5% のセットについて算出される。

【0164】

ラマチャンドランプロットはMolProbabilityを用いて算出した。

【0165】

結果

全体構造

両方の結晶構造中に、非対称単位に1つの抗原/抗体複合体が存在している。代表的な分子構造の全体を図5に示す。Fab分子は両方の結晶において非常に類似している。IFN 4Aの立体配座はIFN 4A/FabM88のそれと非常に類似している。IFN /Fab357の構造については、IFN のモデルは残基R22~P39及びL118~L154のみを含む。IFN の不足している残基は、結晶パッキングがそれらの存在を排除するため、結晶の無秩序の結果ではない。明らかに、IFN のタンパク質分解切断は、結晶化中に発生した。コールドボックス内でシッティングしている同じ複合体のその部分がいくらかのプロテアーゼ分解を受けていた証拠があるが、そのパターンは、結晶中で確認されたものとは同一ではなかった(データは示されていない)。にもかかわらず、IFN の結合領域はよく秩序だっている。

10

【0166】

エピトープ、パラトープ、及びAb/Agの相互作用

C2595は、IFN 4AとIFN の両方で、(R/G22とR/H34の間の)ABループの残基及び残基V143、M/A146、E147並びにヘリックスEのR/K150を含んで成るほぼ同一の立体配座エピトープを認識する(表9)。パラトープは、6つのCDRのうち4つ(CDR-L1、L3、H2、及びH3)からの残基を含んで成る。パラトープ残基は主に疎水性であり、一連のポケットを形成し、そこに、短いABヘリックスの残基F27、L30、K31及びR33の側鎖がドッキングする。抗体と抗原の相互作用は、ほとんどがvdw及び疎水性パッキングのように思われる。抗体と抗原の間には少数のH結合しかなく、それらのほとんどにバックボーン-バックボーン又は側鎖-バックボーンの相互作用が関与している。Ab/Ag相互作用の大部分は、ABヘリックスのいくつかの残基F27、L30、K31及びR33によるものである。したがって、IFN のこの領域がエピトープの主な部分を構成しているように見える。

20

【0167】

【表 9】

表 9. 抗体 C 2 5 9 5 のエピトープ及びパラトープ 6 つの全ての複合体の接触残基が示されている。残基番号は、IFN- ω (配列番号 1) 及び IFN- α 4 a (配列番号 19) による。

	パラトープ		エピトープ		
	IFN ω /Fab357	IFN α 4A/Fab357	IFN ω	IFN α 4A	
VL:				G22	10
	H31	H31	R23	R23	
	N33	N33	I24	I24	
	Y37	Y37	S25	S25	
	N96	N96	P26	H26	
	L97	L97	F27	F27	
	L99	L99		C29	
			L30	L30	20
VH:			K31	K31	
	I50	I50	R33	R33	
	T52		R34	H34	
	Y57	Y57		V143	
	T58	T58	M146	A146	
	Y59	Y59	E147	E147	
		E101	K150	R150	
	G103	G103			
	G104	G104			
	N105	N105			30
	Y106	Y106			
	Y108	Y108			

【0168】

結合パートナーの 3 . 9 以内の全ての残基は接触残基とみなす。抗体 VL 及び VH の残基は順に番号付けされる。

【0169】

抗体の中和形態

C 2 5 9 5 は IFNAR 2 / IFN 相互作用を遮断することによって中和する。

【0170】

実施例 7 . IFN α 4 A との複合体における抗 - IFN 抗体 M 8 8 の結晶構造由来の M 8 8 のエピトープ 40

IFN α 4 A との複合体における抗 - IFN 抗体 M 8 8 の結晶構造は 2 . 5 に対して決定した。主エピトープは IFN の AB ループのヘリカル要素 A 1 9 ~ D 3 5 である。M 8 8 の結合は IFNAR 2 の相互作用を防ぐであろう。したがって、M 8 8 は IFNAR 2 ブロッカーである。その構造は M 8 8 の結合の交差反応性を明らかにする。

【0171】

IFWM 8 8 (以下、mAb 及び Fab に関してそれぞれ M 8 8 及び Fab M 8 8) は、ヒト IFN を中和する抗体である。M 8 8 mAb は、IFN の多くのサブタイプとの結合を示すが、ヒト IFN との結合はほとんど示さない。

【0172】

材料及び方法

タンパク質

H i s タグ付けした F a b M 8 8 (I g G 1 / カッパアイソタイプ) をクローンし、H E K 2 9 3 F 細胞において発現し、アフィニティ及びサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。F a b は、2 0 m M の トリス (p H 7 . 4)、5 0 m M の N a C l に受け取られた。I F N 4 a は、(2 0 m M の トリス (p H 7 . 4)、5 0 m M の N a C l において) C r o w n B i o s c i e n c e I n c . から入手した。

【 0 1 7 3 】

I F N 4 A / F a b M 8 8 複合体の結晶化

この複合体は、I F N 4 A と F a b M 8 8 とを、1 . 0 5 : 1 . 0 (過剰の I F N 4 A) のモル比で混合し、4 で 1 時間インキュベートし、2 0 m M の トリス (p H 8 . 0)、1 0 % グリセロール、0 . 1 M の N a C l で 2 0 倍希釈してから、A m i c o n - U l t r a 1 0 k D a カットオフを用いて 9 . 2 5 m g / m L に濃縮することによって調製した。最初の結晶化は、I H 1、I H 2 及び P E G スイート (Q i a g e n) で設定した。複合体の結晶化は、O r y x 4 ロボット (D o u g l a s I n s t r u m e n t s) を使用して、2 0 で蒸気拡散法により行った。I H 2 # E 1 2 ~ 2 5 % P E G 3 K、0 . 2 M のクエン酸アンモニウムから結晶が現れた。これらの最初の結晶を用いて、結晶化シードを調製した。結晶の質を改善するために、I F N 4 A / F a b M 8 8 複合体を、2 0 m m の M E S (p H 6 . 5)、0 . 1 M の N a C l、1 0 % グリセロールで平衡した S u p e r d e x 2 0 0 カラム (G E H e a l t h c a r e) で精製し、8 . 1 6 m g / m L に濃縮した。X 回折に適した結晶は、記載されているように (O b m o l o v a ら、A c t a C r y s t a l l o g r D B i o l C r y s t a l l o g r 6 6 : 9 2 7 ~ 9 3 5、2 0 1 0) M M S 播種した 2 8 % の P E G 3 K、0 . 2 M のクエン酸アンモニウムから得た。

10

20

【 0 1 7 4 】

X 線データ収集及び構造決定

X 線データ収集のために、1 つの結晶を数秒間、2 0 % グリコールを補充した母液に浸し、9 5 K で窒素のストリームにおいてフラッシュ凍結した。X 線回折データは、O s m i c (商標) V a r i M a x (商標) 共焦点光学系、S a t u r n 9 4 4 C C D 検出器、及び X - s t r e a m (商標) 2 0 0 0 極低温冷却システム (R i g a k u、テキサス州) を備えた R I g A k u M i c r o M a x (商標) - 0 0 7 H F マイクロフォーカス X 線ジェネレータを用いて収集した。回折強度は半分度画像で 2 3 5 度の結晶回転にわたって検出された。X 線データを X D S プログラムにより処理した。X 線データ統計を表 1 0 に示す。

30

【 0 1 7 5 】

構造は、P h a s e r を用いた分子置換 (M R) で解析した。M R の検索モデルは、F a b 1 5 (P D B I D 3 N C J) 及び I F N 2 (P D B I D 1 R H 2 (この C モデルは P D B において入手可能であった) の結晶構造であった。M R に使用するために、C 座標及び P D B での反射データを用いて P h a s e r を使用して M R によって I F N 2 の完全な分子モデルを取得し、P H E N I X で精密化した。P H E N I X を用いて I F N 4 A / F a b M 8 8 の構造を精密化し、C O O T を用いてモデルの調整を実行した。他の全ての結晶学的計算は、C C P 4 のプログラムスイートを用いて行った。可変ドメインと定常ドメインとの間のエルボー角度は、R B O W プログラムを用いて計算した。全ての分子グラフィックは P y M o l を用いて生成した。構造精密化統計を表 1 0 に提供する。

40

【 0 1 7 6 】

【表 10】

表 10. 結晶データ及び精密化統計

結晶データ		
空間群	P1	
単位細胞寸法		
a、b、c (Å)	41.92、84.71、102.53	
α 、 β 、 γ (°)	97.68、90.12、98.54	
非対称単位の内容	2つの複合体	
V_m (Å ³ /Da)	2.62	
X線データ		
分解能 (Å)	50-2.5	(2.58-2.50) ^a
測定された反射数	83,604	(1,217)
一意の反射数	34,097	(588)
完全性 (%)	72.1	(16.7) ^b
冗長度	2.5	(2.1)
R-merge	0.43	(0.452)
$\langle I/\sigma \rangle$	18.0	(1.9)
B因子 (Wilsonプロット) (Å ²)	43.8	
改良版		
分解能 (Å)	30.6-2.5	(2.58-2.50)
精密化に使用される反射数	34,095	(640)
完全性 (%)	72.2	
全ての原子の数	8,844	
水分子の数	149	
R _{cryst} (%)	21.1	(42.8)
R _{free} (%)	27.3	(56.6)
RMSD結合長 (Å)	0.003	
RMSD結合角 (°)	0.67	
RMSD B因子主鎖 (Å)	6.6	
B因子平均値 (Å ²)	47.4	
MolProbity[25]		
クラッシュスコア	9.8	
不十分な回転異性体	3.9	
ラマチャンドラン有利 (%)	94.4	
ラマチャンドランアウトライヤー (%)	0.6	
C β 偏差 > 0.25 Å	0	

^a 高分解能シェル値はカッコ内に示す。

^b 完成度が低いのは、高分解能シェルは検出器の角にのみ反射を包含するため。

【0177】

結果

全体構造

50

I F N 4 A / F a b M 8 8 複合体の全体的な分子構造を図 6 に示す。非対称単位にこれらの複合体は 2 つ存在する。2 つの独立した I F N 4 A 分子の分子モデルは、一方に残基 7 ~ 1 0 2 及び 1 1 3 ~ 1 6 0 を、もう一方に 1 2 ~ 1 0 2 及び 1 1 3 ~ 1 6 0 を含む。両方の分子中の残基 1 0 3 と 1 1 2 との間の接続ループは無秩序である。2 つの F a b 分子は軽鎖に関しては 1 ~ 2 1 2 の残基、重鎖に関しては 1 ~ 2 2 1 の残基を含む。C 末端 6 x H i s タグ及び鎖間ジスルフィド結合は無秩序である。

【 0 1 7 8 】

2 つの I F N 4 A 分子は、1 2 2 の C 原子に対して 0 . 1 3 2 の平均 R M S D を有する本質的に同一の立体配座を有する。それら 2 つの F a b 分子は、F a b 全体に対して 0 . 5 未満の平均 R M S D を有する同一の構造もまた有する。興味深いことに、それら 2 つの F a b は R B O W に従ってほぼ同一のエルボー角度 (1 7 2 度及び 1 7 4 度) を有する。

10

【 0 1 7 9 】

I F N の構造

I F N 4 A (図 7 A) の分子構造は、0 . 5 ~ 0 . 7 の平均 C r m s d を有する I F N 2 と非常に類似している。それはまた、I F N (図 7 B 、 1 1 2 の残基に関して 0 . 6 1 の C r m s d) 及び I F N (図 7 C 、 9 4 の残基に関して 0 . 8 5 の C r m s d) とともに非常に類似している。I F N の A B ループにより短い残基が 1 つあるために、I F N / と I F N の間にはいくつかの有意な違いがある。

20

【 0 1 8 0 】

エピトープ、パラトープ、及び A b / A g の相互作用

M 8 8 は、A B ループ (A 1 9 と D 3 5 の間) の残基及びヘリックス E の残基 V 1 4 3 、 A 1 4 6 、 E 1 4 7 及び R 1 5 0 で構成された立体配座エピトープを認識する (表 1 1) 。パラトープは 6 つの全ての C D R からの残基で構成されている。パラトープ残基は主に疎水性であり、一連のポケットを形成し、そこに、短い A B ヘリックスの残基 F 2 7 、 L 3 0 、 K 3 1 及び R 3 3 の側鎖がドッキングする。抗体と抗原の相互作用は、ほとんどが v d w 及び疎水性パッキングのように思われる。抗体と抗原の間には少数の H 結合しかなく、それらのほとんどにバックボーン - バックボーン又は側鎖 - バックボーンの相互作用が関与している。A b / A g 相互作用の大部分は、A B ヘリックスのいくつかの残基 F 2 7 、 L 3 0 、 K 3 1 及び R 3 3 によるものである。したがって、I F N 4 A のこの領域がエピトープの主な部分を構成している。V L の F 5 0 は、構造の抗原と直接接していない。しかしながら、その側鎖は、結合に関与する Y 3 2 (V L) 及び P 1 0 5 (V H) の近くにある。この残基はおそらく、結合を有利にするために、C D R - H 3 の局所構造をそれが支持することから選択された。

30

【 0 1 8 1 】

【表 1 1】

表 1 1. 抗体M88のエピトープ及びパラトープ

	パラトープ		エピトープ		
	LHI	ABJ	LHI	ABJ	
VL			IFNa4A		
	Y32	Y32	A19	A19	
	S91	S91	H26		
	Y92	Y92	F27	F27	10
	S93	S93	L30	L30	
	T94	T94	K31	K31	
	L96	L96	D32	D32	
VH			R33	R33	
	W47	W47	H34	H34	
	G50	G50	D35	D35	
	I51	I51	V143	V143	
	I52		A146	A146	
	F55	F55	E147	E147	20
	N59	N59	M149		
	H99	H99	R150	R150	
	L100	L100	S153		
	G101	G101			
	Y102	Y102			
	A103	A103			
	F104	F104			
	P105	P105			
	D106	D106			30

【0182】

結合パートナーの3.9 以内の全ての残基は接触残基とみなす。抗体VL及びVHの残基は順に番号付けされる。LHI及びABJは2つの複合体を代表する。

【0183】

交差反応性及び親和性の改善のための、構造に基づくライブラリの設計

M88はIFN サブタイプの多くと強く結合するが、IFN との結合は弱い。現在の複合体の構造及びIFN の構造を用いた分子モデリングに基づく、2つの戦略が可能である。1つの戦略は、IFN 4A/M88構造内の現在の接触の全てを維持する一方で追加のAb/Ag相互作用を生成することによりCDR-L1 (extL1ライブラリ) を延長することである。構造及び配列の比較は、全てのIFN サブタイプで5つの残基表面パッチ (D32、H34、D35、Y130及びK134) が100%保存されたことを示している (表12)。

【0184】

【表 1 2】

表 1 2

	残基:32~35		残基:130~134	
	配列	配列番号	配列	配列番号
IFN α	DRHD	34	YLxEK	36
IFN ω	DRRD	35	YLKEK	37

【0185】

これらの5つの残基のうちIFNにおけるH34の代わりにR34を除く4つの残基もまた保存された。CDR-L1は、この良好に保存された表面パッチから離れている。したがって、より長いCDR-L1、例えば3-1-1正準構造に追加の6つの残基を有する生殖細胞系列IGKV4-1(B3)のものなどは、このパッチと接触するために十分に長くなるであろうと仮定される。より長いCDR-L1は全てのIFNサブタイプ及びIFNに追加の相互作用をもたらし、それにより、親和性及び特異性広域化の両方を改善するであろう。延長されたCDR-L1の配列は、ライブラリからのファージディスプレイによって最適化することができる。ファージディスプレイライブラリの設計は表13に示されている。その抗原と反対側を向いているextL1の位置はランダム化されていない。VLのF50位のみが、非ヒト生殖細胞系列の残基である。構造上、それはCDR-L3に支持を提供するように見える。したがって、それによる延長CDR-L1の支持を最適化するために、この位置もまたランダム化される。

【0186】

【表 1 3】

表 1 3

	配列	配列番号:
M88	SQSISSYL	38
M32	SQSVLYSSNNKNYL	39
extL1	SQSVLXSXXNKNYL	40

Xは任意のアミノ酸

【0187】

抗体の中和形態

IFNAR1及び/又はIFNAR2との複合体中のIFN / の結晶構造は最近報告されている(Thomasら、Cell 146:621~632、2011)。図8は、IFN / IFNAR1 / IFN 2複合体の上にM88 / IFN 4を重ねたものである。HCとIFNAR2が重なり合うことは明らかである。したがって、M88はIFNAR2 / IFN相互作用を遮断することによって中和する。

【0188】

実施例8. IFN 及びIFN の最小限のエピトープは広域のIFN / IFN 中和活性を提供する

IFN T80E / FabM43、IFN 4A / FabM88、IFN 4A / Fab357(C2595)及びIFN / Fab357の結晶構造は、IFN 及び複数のIFN サブタイプの広域中和に必要とされる最小限の共通エピトープを画定する(表14)。4つの結晶構造の抗体 / 抗原相互作用の解析は、IFN 4a(配列番号19)及びIFN (配列番号1)のABループの3つの残基、F27、L30、及びR33がそれらの抗体と広範な接触を形成することを示している。これらの残基が抗体の結合に主に寄与する可能性が高い。したがって、F27、L30、及びR33は、IFN / IFN の交差中和エピトープの主要な要素である。

【0189】

10

20

30

40

50

立体配座エピトープは、A Bループ（配列番号1のIFN ω 及び配列番号19のIFN α 4aの残基22～34）からの、短いヘリカル部分（27～29）を有する残基と、ヘリカルEの残基（134～154はIFN ω 及びIFN α 2を除く全てのIFN サブタイプ（すなわち133～153）のヘリカルEの同じ残基である）とで構成されている。具体的には、配列番号1のIFN ω の位置P26、F27、L30、K31、R33及びH34、並びに配列番号19のIFN α 4aの残基H26、F27、L30、K31、R33及びH34が、中和抗体によって認識される。これらの残基は、多様なIFN サブタイプ及びIFN ω 間で主に保存され、したがって、これらの抗体の交差反応性及び示差特異性を担うものであるが、異なるソースに由来する。追加的なエピトープ残基は、IFN ω のR22、R23、I24、S25、D32、D35、M149、K150、又はL154及びIFN α 4aの残基A19、G22、R23、I24、S25、H26、F27、C29、L30、K31、D32、R33、H34、D35、V143、A146、E147、M149、R150、又はS153である。

【0190】

【表14】

表14

エピトープ			
IFN ω での M43	IFN α 4aでの M88	IFN α 4aでの C2595	IFN ω での C2595
	A19		
R22		G22	
		R23	R23
		T24	T24
		S25	S25
P26	H26	H26	P26
F27	F27	F27	F27
		C29	
L30	L30	L30	L30
K31	K31	K31	K31
D32	D32		
R33	R33	R33	R33
R34	H34	H34	R34
D35	D35		
Q40			
K134			
	V143	V143	
M146	A146	A146	M146
	E147	E147	E147
M149	M149		
K150	R150	R150	K150
F153	S153		
L154			

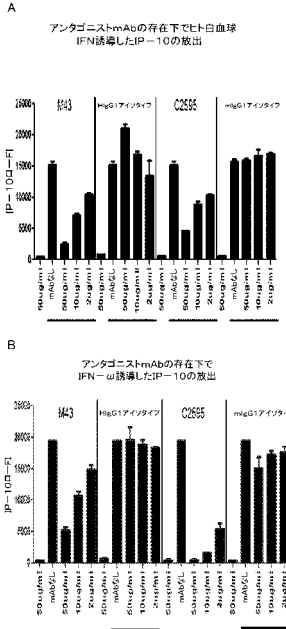
10

20

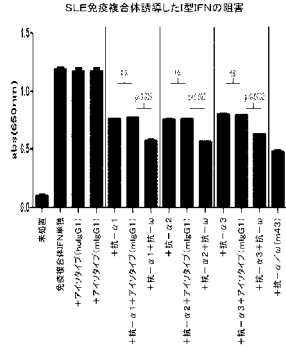
30

40

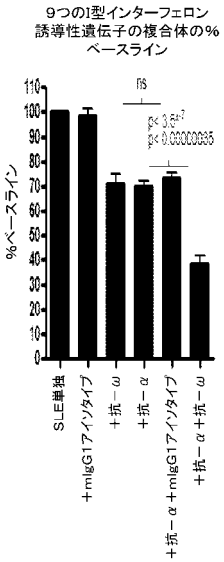
【 図 1 】



【 図 2 】



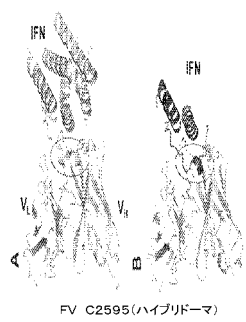
【 図 3 】



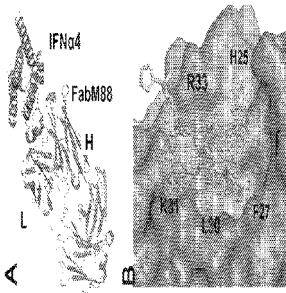
【 図 4 】



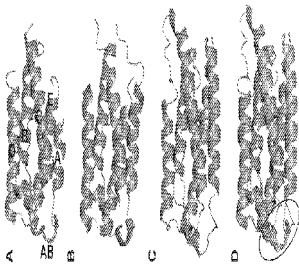
【 図 5 】



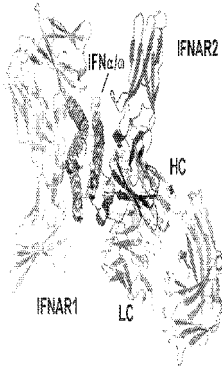
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

2016518330000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/025701
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C07K 16/24 (2014.01) USPC - 435/335 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B) - A81K 38/21, 39/395; A81P 37/02; C07K 16/24; C12N 15/19, 20, 21; C12P 21/08 (2014.01) USPC - 424/130.1, 133.1, 141.1, 142.1, 145.1; 435/335; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.15, 388.23; 538/23.53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 51/1021; C07K 16/249, 2316/96, 2317/565 (2014.02) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BENOIT et al. 'A monoclonal antibody to recombinant human IFN-alpha receptor inhibits biologic activity of several species of human IFN-alpha, IFN-beta, and IFN-omega Detection of heterogeneity of the cellular type I IFN receptor.' J Immunol. (01 February 1993) Vol. 150, No. 3, Pgs. 707-716. entire document.	1-11, 33
Y	US 2007/0014724 A1 (WITTE et al) 18 January 2007 (18.01.2007) entire document	1-11, 33
Y	LAFLEUR et al. 'Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes.' J Biol Chem. (26 October 2001, published online 20 August 2001) Vol. 276, No. 43, Pgs. 39765-71. entire document	9
Y	TERENZI et al. 'Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56.' J Biol Chem. (10 November 2006, published online 13 September 2006) Vol. 281, No. 45, Pgs. 34064-34071. entire document	9
A	US 5,317,089 A (ADOLF) 31 May 1994 (31.05.1994) entire document	1-45
A	US 2005/0019306 A1 (HORVATH et al) 27 January 2005 (27.01.2005) entire document	1-45
A	US 2010/0021477 A1 (TSUI et al) 28 January 2010 (28.01.2010) entire document	1-45
A	US 2012/0114667 A1 (EBERLEIN et al) 10 May 2010 (10.05.2010) entire document	1-45
A	US 2009/0186027 A1 (SOLOMON et al) 23 July 2009 (23.07.2009) entire document	1-45
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 June 2014		Date of mailing of the international search report 08 JUL 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/025701

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1, 19, 23, 24, 27, and 28 were searched.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
	C 1 2 P	21/08	

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

(74) 代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72) 発明者 チ, エレン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 - 1 1 2 6, サンディエゴ, メリーフィールド
ロウ 3 2 1 0

(72) 発明者 コナー, ジュディス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 - 1 1 2 6, サンディエゴ, メリーフィールド
ロウ 3 2 1 0

(72) 発明者 フアン, チチ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0

(72) 発明者 ジョーダン, ジャラット

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0

(72) 発明者 リンシMIT, シエファン

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0

(72) 発明者 ルオ, ジンクアン

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0

(72) 発明者 ル, ル

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0

(72) 発明者 マルティネス, クリスチャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 - 1 1 2 6, サンディエゴ, メリーフィールド
ロウ 3 2 1 0

(72) 発明者 オブモロバ, ガリナ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0

(72) 発明者 スワンソン, ロナルド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 - 1 1 2 6, サンディエゴ, メリーフィールド
ロウ 3 2 1 0

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA01 CA10 CA19 CC24 DA01
4C085 AA14 BB31 DD62 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA22 FA74