



(12) PATENT

(11) 343054

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

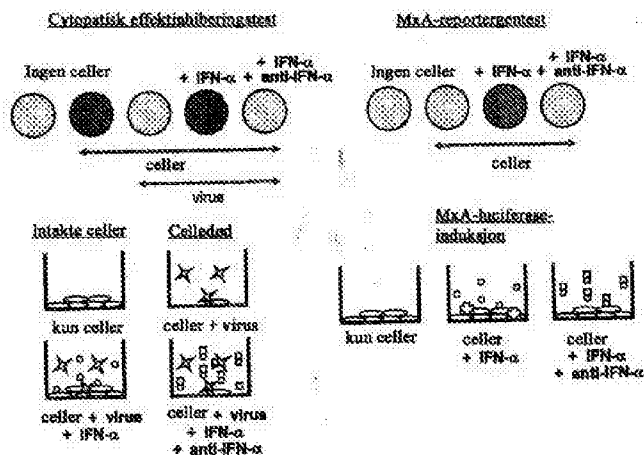
A61K 39/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20074512	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.02.09 PCT/US2006/004643
(22)	Inng.dag	2007.09.06	(85)	Videreføringsdag	2007.09.06
(24)	Løpedag	2006.02.09	(30)	Prioritet	2005.02.10, US, 60/652,233
(41)	Alm.tilgj	2007.10.31			
(45)	Meddelt	2018.10.22			
(83)	Biol.mat. dep	ATCC American Type Culture Collection, USA PTA-6557-62			
(73)	Innehaver	Baylor Research Inst, 3434 Live Oak #125, TX75204 DALLAS, USA			
(72)	Oppfinner	Jacques Banchemereau, 6730 Northaven Road, TX75223 DALLAS, USA Kiley Prilliman, 7150 East Grand #1614, TX75223 DALLAS, USA Virginia Pascual, 6615 Windrock Road, TX75252 DALLAS, USA Anna Karolina Palucka, 3000 Blackburn Street #2522, TX75214 DALLAS, USA			
(74)	Fullmektig	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Anti-interferon monoklonale antistoffer og anvendelser WO 2004003211 A, OVERALL ML. and HERTZOG PJ. Functional analysis of interferon-alpha subtypes using monoclonal antibodies to interferon-alpha 4a--subtype reactivity, neutralisation of biological activities and epitope analysis. Mol Immunol. 1992, vol. 29, no. 3, side 391-399., WO 02066649 A, CHUNTHARAPAI A. ET AL. Characterization and humanization of a monoclonal antibody that neutralizes human leukocyte interferon: a candidate therapeutic for IDDM and SLE. Cytokine. 2001, vol. 15, no. 5, side 250-260.
(56)	Anført publikasjoner	
(57)	Sammendrag	

Foreliggende oppfinnelse inkluderer sammensetninger og fremgangsmåter som inkluderer antistoffer som selektivt nøytraliserer en bioaktivitet fra minst to interferon alfa ("IFN α ") proteinsubtyper for proteinsubtypene A, 2, 132, C, F, G, 1-12, 1, JI, K, 4a, 4b og WA, men nøytraliserer ikke minst en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtype D. Eksempler på bioaktivitet for måling inkluderer aktivering av MxA-promoteren eller antiviral aktivitet og varianter, derivater og fragmenter derav. Oppfinnelsen inkluderer også vertsceller, hybridomer og plasmacytomer som produserer antistoffer. På grunn av deres unike selektivitet og affinitet, er antistoffene av den foreliggende oppfinnelsen nyttige for å detektere IFN α -subtyper i prøve eller vev og/eller for terapeutisk anvendelse som inkluderer, men ikke er begrenset til, behandlingen og/eller forbedringen av en IFN α -relatert forstyrrelse slik som SLE, lupus, type I diabetes, psoriasis, AIDS og Graft versus Vert sykdom.



Foreliggende oppfinnelse er relatert til fremgangsmåter og sammensetninger nyttige for å diagnostisere og behandle tilstander korrelert med et unormalt nivå av interferon- α (IFN α) i et individ.

5 Humane interferoner (IFN'er) er funksjonelt-relaterte cytokiner som modulerer både iboende og adaptive immunresponser. De er kategorisert i to grupper, for det meste på basis av sekvenshomologi, som type I og II. Type I IFN'er inkluderer seks typer (IFN α , IFN β , IFN ω , IFN κ , IFN ϵ og IFN λ). IFN α , - β , - ω og - κ virker gjennom en identisk IFN-reseptor, IFNAR. IFN λ assosierer med en forskjellig reseptor, IFNLR. Reseptoren for
10 IFN ϵ er foreløpig ukjent. Type II IFN består av en enkel type (IFN γ) og assosierer med reseptoren IFNGR. Mens type I IFN'er er sterkt induert under virale infeksjoner, er type II IFN primært induert i respons til immun og inflammatorisk stimuli, og derfor er IFN γ hyppig referert til som "immun IFN". De mest studerte av tallrike type I IFN'er inkluderer IFN1, IFN β og IFN ω . Av disse er IFN α den mest komplekse, inkluderer
15 minst femten forskjellige proteinsubtyper som viser opp mot 75% sekvenshomologi. Diaz (1985) "Semin. Virol." 6:143-149; Weissmann et al. (1986) "Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol." 33-251; "J. Interferon Res." (1993) 13:443-444; Roberts et al. (1998) "J. Interferon Cytokine Res.", 18:805-816. I tillegg til å ha strukturell likhet, viser IFN α genene og deres produkter funksjonelle likheter. For eksempel er de induert ved
20 dsRNA eller virus, og kan interagere med den samme reseptoren, IFN α /IFN β -reseptoren IFNAR. Mogensen et al. (1999) "J. Interferons and other Regulatory Cytokines", John Wiley & Sons. IFN α inhiberer også apoptose, fremmer overlevelsen og differensieringen av antigenaktiverede T-hjelpeceller og fremmer modningen av funksjonelt effektive monocyttderiverte dendrittceller.

25 Mange typer av celler produserer IFN α når eksponert for virus og dsRNA. Spesialiserte leukocytter (kalt interferon- α -produserende celler ("IPC'er")) produserer IFN α i respons til et bredt utvalgt av stimuli, f.eks. virus, bakterier og protozoa. Flere *in vitro* studier indikerer at de ulike IFN α -subtypene er produsert i forskjellige utstrekninger ved forskjellige IFN α -utskillende cellelinjer eller på en virustypespesifikk måte etter infeksjon
30 av humane perifere mononukleære celler i blod (PBMC'er), og at disse mønstrene ofte er assosiert med subtypeavhengige forskjeller i anti-proliferative, anti-virale og anti-tumoraktiviteter. Imidlertid, er den fysiologiske signifikansen av de individuelle subtypene og deres synergistiske eller antagonistiske aktiviteter med hverandre *in vivo* fortsatt udefinert.
35

IFN α har blitt implisert som en mediator av patologien sett i flere autoimmune sykdommer. Videre kan den forårsake autoimmun sykdomsutvikling i pasienter behandlet med IFN α for cancer og virale infeksjoner. Økt ekspresjon av IFN α har blitt observert i de sykdomslokaliserte vevene av pasienter med insulinavhengig diabetes mellitus

5 (IDDM eller type I diabetes), psoriasis, Crohn's sykdom og cøliaki. Overekspressjon av IFN α har blitt observert i pasienter med systemisk lupus erytematosus (SLE), IDDM og AIDS. I tilfelle av SLE, som er karakterisert ved en overflod av både autoreaktive B- og T-celler, er IFN α -ekspresjon observert ikke bare i vevslesjoner, men sirkulerende i blodet av rammede individer. Videre, tenderer IFN α serumnivåene å korrelere med den

10 kliniske sykdomsaktivitetsindeksen. Dette er trodd å stamme fra syklisk induksjon av normalt hvilende monocytter til potente antigenpresenterende dendrittceller (DC'er) som fremkalt ved oppregulering av IFN α -produksjon ved plasmacytoide DC'er (pDC'er). De foreliggende oppfinnerne har virkelig tidligere demonstrert via oligonukleotidmikromatriseanalyse at SLE kan bli skjeldnet ved "signaturer" av uregulerte

15 gener involvert i granulopoiese og IFNinduksjon; disse signaturene vender tilbake til normalen ved fusjon av høy dose av glukokortikoider (U.S. patentsøknad 11/228,586). Systemisk lupus erytematosus (SLE) er en systemisk autoimmun reumatisk sykdom som spesielt er aggressiv hos barn og karakterisert ved oppblusninger av høy sykkelighet. Autoimmune sykdommer slik som SLE virker ofte i selvvedlikeholdende sykluser av

20 tilbakefall og tilbakegang. Disse syklusene er ofte definert ved faser av behandling med generelt terapeutiske regimer administrert for å undertrykke SLE-sykdomssyklusen. FDA-godkjente behandlingsmuligheter for SLE inkluderer kortikosteroider, ikke-steroid immunundertrykkende midler, midler mot malaria og ikke-steroid anti-inflammatoriske medikamenter. Disse medikamentene opphever integriteten av alle

25 immuneffektorresponser i stedet for å virke på dem spesifikke for patogenesen av SLE. SLE representerer et ikke tilfredsstilt medisinsk behov siden disse behandlingene bare delvis er effektive med moderate til kraftige bieffekter som inkluderer fortynning av ben, vektøkning, akne, anemi, sterilitet, kraftig diarre, hårtap og kvalme. Videre har ingen nye legemidler for SLE blitt godkjent på 40 år.

30 SLE har nylig blitt nært forbundet til uforminsket IFN α -produksjon. Shi et al. (1987) "Br. J. Dermatol." 117(2):155-159. IFN α er tilstede ved forhøyede nivåer i SLE-serum (Crow et al. (2004) "Curr. Opin. Rheumatol." 16(5):541-547) og plasmacytoide DC'er (pDC'er), den primære kildern for IFN α , akkumulert i SLE-hud. Farkas et al. (2001)

35 "Am. J. Phathol." 159(1):237-243. Videre har det blitt observert at noen pasienter behandlet med IFN α har utviklet lupus (Okanoue et al. (1996) "J. Heptol." 25(3):283-291;

Tothova et al. (2002) "Neoplasma" 49(2):91-94; og Raanani et al. (1996) "Acta Haematol." 107(3):133-144) og at lupuspasienter som har IFN α -antistoffer har blitt vist til å presentere en mildere form av sykdommen. Von Wussow et al. (1988) "Rheumatol. Int." 8(5):225-230. IFN α kan virke via differensieringen av monocytter til funksjonelle dendrittceller (DC'er) som i videre medierer etiopatogenesen av SLE. V. Pascual et al. (2003) "Curr. Opin. Rheumatol." 15(5):548-556. En foreslått fremgangsmåte for behandlingen av SLE er nøytralisering av IFN α . (se Banchereau et al., WO 02/067760.). WO 04/003211 beskriver bispesifikke antistoff som binder VEGF reseptorer. WO 02/066649; Overall M. L. et al. (1992) «Molecular Immunology», 29: 391-399; og Chuntharapai et al. (2001) «Cytokine», 15: 250-260 beskriver monoklonale antistoff som gjenkjenner et distingt sett med IFN α subtyper og nøytraliserer den biologiske aktiviteten.

Selv om monoklonale antistoffer (MAb'er) som kan blokkere human IFN α -bioaktivitet har blitt produsert, har ingen blitt rapportert til nå som kan nøytralisere alle femten kjente subtyper, og få kan nøytralisere naturlig-derivert, IFN α -inneholdende leukocyt-IFN. PBL Biomedical Laboratories tilbyr ti musemonoklonale antistoffer som binder til multiple humane IFN α -gensubtyper (se world wide web ved interferonsource.com/relativespecificity.html). Hvert av PBL-antistoffene binder imidlertid IFN α -proteinsubtypen kodet ved human IFN α -gensubtype 1 (IFN α -proteinsubtype D) og fra opp til en til tolv andre IFN α -subtyper. U.S. patentpublikasjon nr. 2003/0166228A1 angir et monoklonalt antistoff (betegnet 9F3) som ble derivert fra immunisering av mus med leukocyt IFN α (som inkluderer alle av IFN α -proteinsubtypene). 9F3 MAb binder og nøytraliserer den antivirale aktiviteten av proteinene kodet ved syv humane IFN α -gensubtyper, 1, 2, 4, 5, 8, 10 og 21 (som koder for hhv. IFN α -proteinsubtyper D, A, 4, G, B2, C og F), uten å nøytralisere den antivirale aktiviteten av human IFN β . Denne publikasjonen angir ikke hvorvidt 9F3-antistoffet binder og inaktiverer de andre åtte IFN α -gensubtypene, eller om det binder til en eller begge av IFN α -proteinsubtyper 4a og 4b. PCT-publikasjonen foreslår å benytte de monoklonale antistoffene for å behandle lidelser assosiert med økt ekspresjon av IFN α , nærmere bestemt autoimmune lidelser slik som insulinavhengig diabetes mellitus og SLE. Imidlertid er det ikke kjent hvorvidt 9F3-antistoffet er i stand til å tilstrekkelig nøytralisere den biologiske aktiviteten av IFN α -proteinsubtypene funnet i SLE-serum.

Fordi IFN α er en multifunksjonell mediator av immunresponsen, og har fordelaktig antiviral aktivitet, er fullstendig inhibering eller signifikant nedregulering av alle IFN α -

subtyper ikke en optimal terapeutisk fremgangsmåte. Et behov eksisterer derfor for midler som selektivt vil nøytralisere IFN α -subtypene assosiert med patologiske tilstander. Denne oppfinnelsen tilfredsstiller dette behovet og tilveiebringer også beslektede forde-
ler.

5

Oppfinnelsen tilveiebringer monoklonale antistoffer og derivater derav som nøytraliserer spesifikke IFN α -subtyper. Antistoffene av oppfinnelsen er nyttige i forbedringen og behandlingen av tilstander assosiert med økt ekspresjon av IFN α , slik som SLE, psoriasis, type I diabetes, AIDS, Graft versus Vert sykdom og andre autoimmune sykdommer. I
10 et aspekt inkluderer oppfinnelsen et antistoff som selektivt nøytraliserer 40% av en bioaktivitet av minst ti interferon alfa ("IFN α ") proteinsubtyper selektert fra gruppen bestående av A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, men nøytraliserer ikke signifikant minst en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtype D; hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren og blir målt ved å benytte RGmax IFN mengder og 2 mikrogram
15 per ml antistoff eller antiviral aktivitet målt ved bruk av cytopatisk effekt inhibisjons-test. Fortrinnsvis er antistoffet et monoklonalt antistoff. I en utførelsesform, nøytraliserer antistoffet ikke signifikant IFN α -protein subtype D eller 1. I et aspekt nøytraliserer antistoffet minst 60% av bioaktivitet av nevnte IFN α -proteinsubtypene, der bioaktiviteten er aktivering av MxA promotoren. I et annet aspekt omfatter antistoffet et tungkjedevariabelt domene av SEK. ID. nr. 2 og et lett kjedevariabelt domene av SEK. ID. nr.
20 10. I et aspekt binder antistoffet den samme IFN α -epitopen som anti-IFN α -antistoffet produsert ved hybridomen som har ATCC anbringningsnr. PTA-6557. I et aspekt er det antigenbindende fragmentet et Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fv- eller sFv-fragment.

25 Det beskrives et antistoff, eller antigenbindende fragment derav, omfattende et tungkjedevariabelt domene og et lett kjedevariabelt domene, hvor lett kjedevariabelt domene omfatter de følgende CDR'ene, derivatene eller delene derav:

V_{L1} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 12;

V_{L2} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 14; og

30 V_{L3} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 16;

hvor antistoffet eller antigenbindende fragment nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, men ikke bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtype D, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren.

Det beskrives et antistoff, eller antigenbindende fragment derav, omfattende et lett kjedevariabelt domene og et tungkjedevariabelt domene, hvor tungkjedevariabelt domene omfatter de følgende CDR'ene, derivatene eller delene derav:

V_{H1} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 4;

5 V_{H2} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 6; og

V_{H3} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 8;

hvor antistoffet eller antigenbindende fragment spesifikt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, men nøytraliserer ikke bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtype D, hvor bioaktiviteten er aktivering av

10 MxA-promoteren.

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff, eller antigenbindende fragment derav, omfattende minst en lett kjede eller et antigenbindende fragment derav, omfattende de følgende CDR'ene:

15 V_{L1} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 12;

V_{L2} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 14; og

V_{L3} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 16; og

minst en tung kjede eller antigenbindende fragment derav, omfattende de følgende CDR'ene:

20 V_{H1} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 4;

V_{H2} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 6; og

V_{H3} som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 8.

I et aspekt omfatter antistoffet en homo-tetramer struktur bestående av to disulfidforbundene antistofftungkjede-lettkjedepar. I et aspekt omfatter antistoffet et lineært antistoff.

Beskrivelsen tilveiebringer et antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtype 4a, men nøytraliserer ikke signifikant bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtype 4b, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren og/eller anti-viral aktivitet. Fortrinnsvis nøytraliserer antistoffet selektivt bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtypene A, 2, B2, C, I, K og 4a, men nøytraliserer ikke signifikant bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper D, F, G, 4b og 1. I en utførelsesform er antistoffet det monoklonale antistoffet ACO-3.

Det beskrives også et antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtypene A, 2, B2 og C, men nøytraliserer ikke signifikant bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper D, 4b og 1, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren og/eller antiviral aktivitet. I en utførelsesform er antistoffet det monoklonale antistoffet

5 ACO-4.

Det beskrives et antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtypene A, 2, G, H2, K, WA og 1, men nøytraliserer ikke signifikant bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtype B2 og D, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren og/eller antiviral aktivitet. I en utførelsesform er antistoffet det monoklonale

10 antistoffet ACO-5.

Det beskrives et monoklonalt antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtypene 2 og C, men nøytraliserer ikke bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper A, B2, C, D, F og 1, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren. I en utførelsesform er antistoffet monoklonalt antistoff ACO-6.

15

Det beskrives et antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtypene A, 2, B2, F, I, 4a, 4b og 1, men nøytraliserer ikke bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper C, H2, K og WA, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren. I en utførelsesform er antistoffet monoklonalt antistoff ACO-8.

20

Det beskrives et antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtypene A, 2, B2, D, F, I, J1, 4a, 4b og 1, men nøytraliserer ikke bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper C, G, H2, K og WA, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren.

25

Antistoffene, derivatene eller fragmentene derav av oppfinnelsen kan være fra mus, rotte, menneske eller fra andre pattedyr, eller fragmenter eller humaniserte eller chimere former derav. Det beskrives musemonoklonale antistoffer, f.eks. ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5, ACO-6 og ACO-8, så vel som humaniserte former, chimere former eller fragmenter derav. Det beskrives videre antistoffer som binder til hovedsakelig den samme IFN α -epitopen som murine monoklonale antistoffer ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5, ACO-6 og ACO-8. Oppfinnelsen tilveiebringer videre vertsceller, hybridomer, sammensetninger, farmasøytiske sammensetninger og sett omfattende antistoffene av oppfinnelsen. I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff som binder

30

35

den samme IFN α -epitopen som anti-IFN α -antistoffet produsert ved hybridomen som har ATCC anbringningsnr. PTA-6557. I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff produsert ved en hybridom som har ATCC anbringningsnr. PTA-6557. I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et humanisert antistoff derivert fra antistoffet produsert ved
 5 en hybridom som har ATCC anbringningsnr. PTA-6557.

Antistoffene, derivatene eller fragmentene derav av oppfinnelsen har anvendelse i behandlingen av sykdommer eller tilstander assosiert med overekspresjon av IFN α , inkluderende, men ikke begrenset til, SLE, psoriasis, AIDS, type I diabetes og autoimmun tyroiditt, og for produksjonen av medikamenter for å behandle slike sykdommer og tilstander. Antistoffene av oppfinnelsen kan også bli benyttet for å skjelne eller for å rense ulike IFN α -subtyper. I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff eller antigenbindende fragment ifølge oppfinnelsen til bruk i behandling av en sykdom eller tilstand
 15 selektert fra systemisk lupus erytematosus (SLE), Graft versus Vert sykdom (GVHD), type 1 diabetes, AIDS, lupus, psoriasis og autoimmun tyroiditt.

I et ytterligere aspekt beskrives en isolert nukleinsyre omfattende en polynukleotid kodende for et polypeptid valgt fra gruppen bestående av SEK. ID. nr. 2; SEK. ID. nr. 4; SEK. ID. nr. 6; SEK. ID. nr. 8; SEK. ID. nr. 10; SEK. ID. nr. 12; SEK. ID. nr. 14 og SEK. ID. nr. 16; eller polypeptider som har minst 80% sekvensidentitet dertil. Fortrinnsvis er polynukleotidet valgt fra gruppen bestående av SEK. ID. nr. 1; SEK. ID. nr. 3; SEK. ID. nr. 5; SEK. ID. nr. 9; SEK. ID. nr. 11; SEK. ID. nr. 13 og SEK. ID. nr. 15.
 25

I tillegg, beskrives et protein eller peptid omfattende et polypeptid valgt fra gruppen bestående av SEK. ID. nr. 2; SEK. ID. nr. 4; SEK. ID. nr. 6; SEK. ID. nr. 8; SEK. ID. nr. 10; SEK. ID. nr. 12; SEK. ID. nr. 14 og SEK. ID. nr. 16, eller et protein eller peptid som har minst 80% sekvensidentitet dertil. I et annet aspekt, tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å produsere en hybridomcellelinje, inkluderende: immunisering
 30 av et pattedyr med en sammensetning som inkluderer rekombinante IFN α -subtyper A, B2 og F; fusjonere splenocytter fra det immuniserte pattedyret til en myelomcellelinje for å produsere hybridomer; og identifisere en hybridomcellelinje som produserer et monoklonalt antistoff som selektivt nøytraliserer en eller flere IFN α -proteinsubtyper valgt fra gruppen bestående av 2, C, G, I, J1, K, 4a 4b og WA og 1, men nøytraliserer ikke selektivt IFN α -proteinsubtype D.
 35

Oppfinnelsen inkluderer også vertsceller og hybridomcellelinjer som produserer anti-stoffer som har de ovenfor nevnte spesifitetene, f.eks. spesifikk binding til en eller flere interferon alfa ("IFN α ") proteinsubtyper (A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og
 5 WA), men nøytraliserer ikke bioaktiviteten av f.eks. IFN α -proteinsubtype D. Antistoffene og/eller hybridomcellelinjene kan bli kombinert med en bærer, slik som en farmasøytisk akseptabel bærer, for anvendelse i diagnostiske eller terapeutiske fremgangsmåter. Antistoffene er nyttige for å detektere spesifikke IFN α -subtyper og for å diagnostisere, stille prognose, behandle og/eller forbedre symptomer av IFN α -relaterte lidelser.
 10 Eksempler på slike tilstander inkluderer, men er ikke begrenset til SLE, psoriasis, type I diabetes, Graft versus Vert (GVH) sykdom, AIDS, autoimmun tyroiditt og andre autoimmune lidelser. Antistoffene av oppfinnelsen er også nyttige for å nøytralisere og/eller isolere disse IFN α -subtypene in vitro eller in vivo. I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en vertscelle omfattende en nukleinsyre kodende for antistoffet ifølge oppfinnelsen.
 15 I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en hybridom som produserer et antistoff ifølge oppfinnelsen. I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en sammensetning omfattende et antistoff ifølge oppfinnelsen, der sammensetningen valgfritt er en farmasøytisk sammensetning og ytterligere omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer.
 20 For en mer fullstendig forståelse av disse trekkene og fordelene av den foreliggende oppfinnelsen, er referanse nå gjort til den detaljerte beskrivelsen av oppfinnelsen sammen med de vedlagte figurene og hvor:

Figur 1 viser et skjematisk diagram av reporter-gen (RG) testen og den cytopatiske effektinhiberende testen (CPE). De fylte sirklene i CPE-testdiagrammen representerer
 25 levende, intakte celler. De ikke-fylte sirklene representerer døde celler, drept ved viral infeksjon. De fylte sirklene og celler så vel som "+" i RG-testdiagrammet representerer luciferaseekspresjon, mens de ikke-fylte sirklene og cellene representerer mangelen på luciferaseekspresjon.

30

Figur 2 viser et flytskjema av IFN α MAb-utviklingsskjema.

Figur 3 viser nøytralisering av komplekse IFNkilder ved ACO-1, -2, -3, -4 og -5.
 (a) (Nøytralisering av 600 pg av leukocytt IFN (Sigma) ved de indikerte mengdene av
 35 hvert MAb ble evaluert via RG-biotesten. Prosentandeler av blokkering ble beregnet basert på LCPS-verdiene oppnådd i nærværet/fraværet av leukocytt-IFN og fraværet av

et hvert MAb. Verdier representerer middelverdien av triplikater. (b) Nøytralisering av PBMC-flu (640 ganger fortynning) ved hvert MAb. Prosentandeler av blokkering ble beregnet som tidligere beskrevet. Verdier representerer middelverdien av triplikater.

5 Figur 4 viser nøytralisering av femten rekombinante IFN α -subtyper ved ACO-1. (a) Nøytralisering av de indikerte IFN α -subtypene ved økende konsentrasjoner av ACO-1 ble evaluert via RG-biotesten. Den numeriske verdien angitt til kurve representerer midtpunktet (EC₅₀) beregnet fra LCPS-verdien (luminiscenstillinger pr. sekund) oppnådd i fraværet av ACO-1 (indikert ved åpne sirkeler på Y-aksen) og den
10 høyeste konsentrasjonen av MAb restet (2000 ng/ml). N.D. angir at ingen EC₅₀-verdi kunne bli fastsatt. Datapunkter ble derivert fra triplikater. (b) Mangel på nøytralisering av IFN β ved økende konsentrasjoner av ACO-1, -2, -3, -4, -5 og -8. Datapunkter ble derivert fra triplikater.

15 Figur 5 viser resultatene av en multipleksanalyse av monoklonale antistoffer ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5 og ACO-6.

Figur 6 viser resultatene av fastfasebindingstest av IFN α -subtyper ved monoklonale antistoffer ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5 og ACO-6.

20 Figur 7 viser nøytraliseringen av SLE-pasientserumprøver SLE-43 (a), SLE-133 (b), SLE-140 (c) og SLE-BD (d) bioaktivitet evaluert ved CPE-testen. Mengder av MAb testet er indikert. Kontroller inkluderte serum alene, medium alene (-), og et pan-nøytraliserende polyklonalt antistoff (pAb, kanin- og anti-humant IFN α , PBL). Verdier
25 representerer middelverdien av triplikater.

Figur 8A-C viser kryssreaktiviteten av ACO-1 (A), ACO-2 (B) og ACO-3 (C) med 156 pg/brønn Macaque IFN.

30 Figur 9 viser cDNA og aminosyresekvensen av den tunge kjeden fra ACO-1. DNA-sekvensen som koder for V_H1, V_H2 og V_H3 CDR'ene er vist i italiensk skrift, mens de korresponderende aminosyresekvensene er understreket.

Figur 10 viser cDNA og aminosyresekvensen av den lette kjeden fra ACO-1. DNA-sekvensen kodende for V_L1, V_L2 og V_L3 CDR'ene er vist i italiensk skrift, mens de korresponderende aminosyresekvensene er understreket.
35

Omfanget av foreliggende oppfinnelse er definert ved kravene og informasjon som ikke faller innenfor kravene er fremlagt kun til informasjon.

For å fremme forståelsen av denne oppfinnelsen er et antall av betegnelser definert nedenfor. Betegnelser definert her har betydninger som alminnelig forstått ved en fagperson i områdene relevant for den foreliggende oppfinnelse. Betegnelser slik som "en", "ei" og "et" er ikke ment til å bare referere til en enkel helhet, men inkluderer den generelle klassen hvorfra et spesifikt eksempel kan bli benyttet for illustrasjon. Terminologien her er benyttet for å beskrive spesifikke utførelsesformer av oppfinnelsen, men deres bruk avgrenser ikke oppfinnelsen, med unntak som uthevet i kravene. For eksempel inkluderer betegnelsen "en celle" et flertall av celler, inkluderende blandinger derav. Alle numeriske betegnelser, f.eks. pH, temperatur, tid, konsentrasjon og molekylær vekt, inkluderende områder, er avrundinger som er variert (+) eller (-) ved forøkelse på 0,1. Det må forstås, selv om ikke alltid eksplisitt nevnt, at alle numeriske betegnelser er innlede ved betegnelsen "omkring". Det må også forstås, selv om ikke alltid eksplisitt nevnt, at reagensene beskrevet her bare er eksemplariske og at ekvivalenter av slike er kjent i fagfeltet.

Betegnelsen "antistoff", som benyttet her, refererer til alle klasser og subklasser av intakte immunglobuliner. Betegnelsen "antistoff" dekker også monoklonale antistoffer, antistofffragmenter og antistofffragmentkloner. "Antistofffragmenter" inkluderer en del av et intakt antistoff som inneholder den antigenbindende eller variable regionen av det intakte antistoffet. Eksempler på antistofffragmenter inkluderer Fab-, Fab'-, F(ab')₂- og Fv-fragmenter; enkelkjedeantistoffmolekyler, multispesifikke antistoffer dannet fra antistofffragmenter; et Fd-fragment inkluderer VH- og CH-domener; et Fv-fragment inkluderer VL- og VH-domener av en enkel arm av et antistoff, et dAb-fragment (Ward et al. (1989) "Nature" 341:544-546), som inkluderer et VH-domene; og en isolert komplementaritetsbestemmende region (CDR). "Enkelkjede Fv"- eller "scFv"-antistofffragmenter inkluderer VH- og VL-domener av antistoff, hvor disse domener er tilstede i en enkel polypeptidkjede. Generelt inkluderer scFv-polypeptidet ytterligere en polypeptidlinker mellom VH- og VL-domener, som muliggjør scFv å danne den ønskede strukturen for antigenbinding. For en gjennomgåelse av scFv se Pluckthun (1994) i "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", bind 113, Rosenberg og Moore red., Springer-Verlag, New York, s. 269-315, Dall'Acqua og Carter (1998) "Curr. Opin. Struct. Biol." 8:443-450, Hudson (1999) "Curr. Opin. Immunol.", 11:548-557, Bird et al. (1988) "Science", 242:423-426 og Huston et al. (1988) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA"

85:58979-5883. Et hvert av de ovenfor nevnte antistofffragmentene kan bli oppnådd ved å benytte konvensjonelle teknikker kjent for fagpersoner, og fragmentene er screenet for bindingsspesifisitet og nøytraliseringsaktivitet på den samme måte som intakte antistoffer. Antistoffene kan bli isolert fra enhver egnet biologisk kilde, f.eks. murin, kanin, rotte, human, sau, hund, osv. "Naturlig forekommende" eller "native" antistoffer er heterotetramere glykoproteiner, som vanligvis har en molekylær vekt på omtrentlig 150-200 kD. Heterotetrameren inkluderer to identiske lette (L) kjeder og to identiske tunge (H) kjeder. Hver lette kjede er kovalent bundet til en tung kjede ved en disulfidbinding.

10 Betegnelsen "antistoffderivat", som benyttet her, refererer til å omslutte molekyler som binder en epitop og som er modifikasjoner eller derivater av et nativt monoklonalt antistoff av denne oppfinnelsen. Derivater inkluderer, men er ikke begrenset til, f.eks. bispesifikke, multispesifikke, heterospesifikke, trispesifikke, tetraspesifikke, multispesifikke antistoffer, chimere, rekombinante og humaniserte.

15 Betegnelsen "antistoffvariant", som benyttet her, refererer til antistoffer produsert i en art annen enn en mus eller en isotype av et antistoff valgt fra antistoffene betegnet ACO-1 til og med ACO-6 og ACO-8. Betegnelsen "antistoffvariant" inkluderer også antistoffer inneholdende post-translasjonelle modifikasjoner av den lineære peptidsekvensen av antistoffet eller fragmentet. Den omslutter videre fullstendig humane antistoffer.

Betegnelsen "monoklonalt antistoff", som benyttet her, refererer til et antistoff (inkluderende antistofffragmenter) oppnådd fra en populasjon av vesentlig homogene antistoffer, dvs. at de individuelle antistoffene i populasjonen er identiske med unntak for mulig naturlig forekommende mutasjoner som kan være tilstede i mindre mengder, som også er del av den foreliggende oppfinnelsen så lenge som de viser den ønskede biologiske aktiviteten. Monoklonale antistoffer er sterkt spesifikke og rettet mot en enkel epitop. Monoklonale antistoffer kan bli syntetisert ved en hybridomkultur, i en bioreaktor, som en ascites eller laget ved rekombinante fremgangsmåter, slik som in vitro translasjon, i bakterier, gjær-, plante-, insekt- og/eller dyreceller. Følgelig, indikerer modifikatoren "monoklonal" karakteren av antistoffet til å være oppnådd fra en vesentlig homogen populasjon av antistoffer, og skal ikke fortolkes som å kreve produksjon av antistoffet ved noen bestemt fremgangsmåte. For eksempel, kan de monoklonale antistoffene som skal bli benyttet i overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelsen bli laget ved hybridomfremgangsmåten først beskrevet ved Kohler et al. (1975) "Nature", 256:495,

eller laget ved rekombinante DNA-metoder (se f.eks. U.S. 4,816,567). "Monoklonale antistoffer" inkluderer, men er ikke begrenset til, humane monoklonale antistoffer, humaniserte monoklonale antistoffer, rekombinante humane antistoffer, kloner av antigen-gjenkjennings- og bindingssete inneholdende antistofffragmenter (Fv-kloner) isolert fra fagantistoffbibliotek og derivater derav. (Se Clackson et al. (1991) "Nature", 352:624-628; og Marks et al. (1991) "J. Mol. Biol." 222:581-597). Monoklonale antistoffer inkluderer også "chimere" antistoffer (immunglobuliner) hvor f.eks. en del av den tunge og/eller lette kjeden er identisk med eller homolog til korresponderende sekvenser i antistoffer derivert fra en bestemt art eller tilhørende en bestemt antistoffklasse eller subklasse, mens resten av kjeden(e) eller delene derav, er identisk med eller homolog til korresponderende sekvenser i antistoffer derivert fra en annen art eller tilhørende en annen antistoffklasse eller subklasse, så vel som fragmenter av slike antistoffer, så lenge som de viser den ønskede biologiske aktiviteten (U.S. 4,816,567; Morrison et al. (1984) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 81:6851-6855).

15

Betegnelsen "humant monoklonalt antistoff", som benyttet her, refererer til antistoffer som viser en enkel bindingsspesifisitet som har variable og konstante regioner derivert fra humane kjønnslinjeglobulinsekvenser.

Betegnelsen "humant antistoff", som benyttet her, refererer til antistoffer som har variable og konstante regioner derivert fra humane kjønnslinjeimmunglobulinsekvenser. De humane antistoffene av oppfinnelsen kan inkludere aminosyrerester ikke kodet ved humane kjønnslinjeimmunglobulinsekvenser (f.eks. mutasjoner introdusert ved tilfeldig eller setespesifikk mutagenese in vitro, eller ved somatisk mutasjon in vivo). Imidlertid, er betegnelsen "humant antistoff" som benyttet her, ikke ment å inkludere antistoffer hvor CDR-sekvenser derivert fra kjønnslinjen av en annen mammalsk art, slik som en mus, har blitt kodet på humane rammeverksekvenser. Som benyttet her, refererer derfor betegnelsen "humant antistoff" til et antistoff hvor hovedsakelig hver del av proteinet (f.eks. CDR, rammeverk, CL, CH-domener (f.eks. CH₁, CH₂, CH₃), hengsle (VL, VH)) er hovedsakelig ikke-immunogen i mennesker, med bare mindre sekvensendringer eller variasjoner. På lignende måte, antistoffer betegnet primate (ape, bavian, sjimpanse osv.), gnager (mus, rotte, kanin, marsvin, hamster og lignende) og andre pattedyr betegner slike arter, subslekt, slekt, subfamilie, familiespesifikke antistoffer. Som beskrevet her ovenfor, kan chimere antistoffer også inkludere enhver kombinasjon av det over. Slike endringer eller variasjoner beholder eller reduserer eventuelt og fortrinnsvis immunogenisiteten i mennesker eller andre arter relativt til ikke-modifiserte antistoffer. Et

humant antistoff er derfor forskjellig fra et chimert eller humanisert antistoff. Et humant antistoff kan bli produsert ved en ikke-human dyre- eller prokaryot eller eukaryot celle som er i stand til uttrykke funksjonelt rearrangert humant immunglobulin (f.eks. tung kjede og/eller lett kjede) gener. Når et humant antistoff er et enkelkjedeantistoff, kan det
 5 også videre inkludere et linkerpeptid som ikke er funnet i native humane antistoffer. For eksempel kan et Fv-fragment også inkludere et linkerpeptid, slik som to til omkring åtte glycine- eller andre aminosyrerester, som forbinder den variable regionen av den tunge kjeden og den variable regionen av den lette kjeden. Slike linkerpeptider er betraktet til å være av human opprinnelse.

10

Et humant antistoff er "derivert fra" en bestemt kjønnslinjesekvens hvis antistoffet er oppnådd fra et system ved å benytte humane immunglobulinsekvenser, f.eks. ved immunisering av en transgen mus som bærer humane immunglobulingener eller ved screening av et humant immunglobulinbibliotek. Et humant antistoff som er "derivert fra"
 15 "en human kjønnslinjeimmunglobulinsekvens kan bli identifisert slik som ved å sammenligne aminosyresekvensen av det humane antistoffet med aminosyresekvensen av humane kjønnslinjeimmunglobuliner. Et valgt humant antistoff er vanligvis minst 90% identisk i aminosyresekvens til en aminosyresekvens kodet ved et humant kjønnslinjeimmunglobulingen og inneholder aminosyrerester som identifiserer det humane antistoffet til å være humant, når sammenlignet med kjønnslinjeimmunglobulinamino-
 20 syresekvensene av andre arter (f.eks. muse- eller rottekjønnslinjesekvenser). I bestemte tilfeller kan et humant antistoff være minst 95%, eller til og med minst 96%, 97%, 98% eller 99% identisk i aminosyresekvens til aminosyresekvensen kodet ved kjønnslinjeimmunglobulingenet. Et humant antistoff derivert fra en bestemt human kjønnslinjesekvens vil typisk ikke presentere mer enn 10 aminosyreforskjeller fra aminosyresekvensen kodet ved det humane kjønnslinjeimmunglobulingenet. I enkelte tilfeller kan det humane antistoffet vise ikke mer enn 5, eller til og med ikke mer enn 4, 3, 2 eller 1 aminosyreforskjell fra aminosyresekvensen kodet ved kjønnslinjeimmunglobulingenet.

20

25

30

35

Betegnelsen "humanisert", som benyttet her, refererer til anvendelsen av deler av ikke-humane (f.eks. mus eller rotte) antistoffer som er benyttet på en human immunglobulinrygggrad for å lage chimere immunglobuliner, immunglobulinkjeder eller fragmenter derav (slik som Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ eller andre antigenbindende subsekvenser av antistoffer) som har sekvenser derivert fra ikke-humant immunglobulin. Generelt er humaniserte antistoffer humane immunglobuliner (mottakerantistoff) hvor rester fra del eller alt av en eller flere komplementaritetsbestemmende regioner (CDR'er) av motta-

kerantistoffet er erstattet ved rester fra en eller flere CDR'er av en ikke-human art (donorantistoff) slik som mus, rotte eller kanin som har den ønskede spesifisiteten, affiniteten eller kapasiteten. For eksempel, er Fv-rammeverksregion (FR) -rester av det humane immunglobulinet erstattet ved korresponderende ikke-humane rester, eller omvendt, 5 dvs. at humane immunglobulindeler kan bli podet på de ikke-humane immunglobulin-regionene som bestemmer antigenspesifisitet. Videre kan humaniserte antistoffer inkludere rester som er verken funnet i mottakerantistoffet eller i de importerte CDR- eller rammeverksekvensene. Modifikasjonene som ikke er del av donor- eller mottakerantistoffet er alminnelig og enkelt gjort for å videreføre og optimalisere antistofftyteevne. 10 Generelt vil det humaniserte antistoffet inkludere hovedsakelig alle eller minst en, og vanligvis begge, variable domener (lett og tung), hvor alle eller hovedsakelig alle av CDR-regionene korresponderer til dem av et ikke-humant immunglobulin og alle eller hovedsakelig alle av FR-regionene er dem av en human immunglobulinsekvens. Det humaniserte antistoffet kan også inkludere minst en del av en immunglobulinkonstant 15 region (Fc), vanligvis den av et humant immunglobulin.

Betegnelsen "rekombinant humant antistoff", som benyttet her, inkluderer alle humane antistoffer som er preparert, uttrykt, laget eller isolert ved rekombinant fremgangsmåte, slik som antistoffer isolert fra et dyr (f.eks. en mus) som er transgen eller transkromosomal for humane immunglobulingener eller en hybridom preparert derifra, antistoffer 20 isolert fra en vertscelle transformert til å uttrykke antistoffet, f.eks. fra en celle transfektert til å uttrykke antistoffet (alminnelig en plasmacytom), antistoffer isolert fra et rekombinant, kombinasjonsmessig humant antistoffbibliotek, og antistoffer preparert, uttrykt, laget eller isolert ved enhver annen fremgangsmåte som kan involvere spleising 25 av humane immunglobulingensekvenser til andre DNA-sekvenser. Slike rekombinante humane antistoffer har variable og konstante regioner derivert fra humane kjønnslinje-immunglobulinsekvenser. I enkelte utførelsesformer, kan imidlertid slike rekombinante humane antistoffer være utsatt for in vitro mutagenese (eller, når et dyr transgent for human Ig-sekvens er benyttet, in vivo somatisk mutagenese) og derfor er aminosyresekvensene av VH- og VL-regionene av de rekombinante antistoffene sekvenser som, 30 mens derivert fra og beslektet til humane kjønnslinje-VH- og VL-sekvenser, ikke naturlig eksistere i det humane antistoffkjønnslinjerepertoar in vivo.

Betegnelsene "antigenbindende sete" eller "bindende del", som benyttet her, refererer til 35 delen av et immunglobulinmolekyl som deltar i antigenbinding. Det antigenbindende setet er dannet ved aminosyrerester ved de N-terminale tre variable ("V") regionene av

den tunge ("H") kjeden og tre variable regioner av lett ("L") kjeder. Tre sterkt divergente strekker i V-regionene av de tunge og lette kjedene er referert til som "hypervariable regioner" eller "CDR'er", hvorav tre er innskutt mellom fire konserverte flankerende strekker kjent som "rammeverksregioner" (FR). Rammeverksregioner refererer til aminosyresekvenser som er funnet naturlig mellom, og herliggende til, hypervariable regioner i immunglobuliner. I antistoffmolekyler, er de tre hypervariable regionene av en lett kjede (V_L1 , V_L2 og V_L3) og de tre hypervariable regionene av en tung kjede (V_H1 , V_H2 og V_H3) anbragt relativt til hverandre i tredimensjonalt rom for å danne en antigenbindende overflate. Den antigenbindende overflaten er komplementær til den tredimensjonale overflaten av et bundet antigen, og de tre hypervariable regionene av hver av de tunge og lette kjedene er referert til som "komplementaritetsbestemmende regioner" eller "CDR'er".

Betegnelsen "bioaktivitet", som benyttet her, refererer til evnen av en eller flere $IFN\alpha$ -subtyper (eller $IFN\beta$) til å aktivere MxA-promoteren (og interferoninduserbar promoter) eller til å utøve en antiviral effekt. EC_{50} og prosent nøytralisering for et antistoff av en $IFN\alpha$ -bioaktivitet kan variere avhengig av testtilstandene og typen av $IFN\alpha$ -bioaktivitet målt. For konsistens, er spesifikke typer av bioaktiviteter (dvs. aktivering av MxA-promoteren og antiviral aktivitet) og testforhold (dvs. "RG-testen" og "CPE-testen") benyttet. RG-testen kan bli utført ved å benytte forholdene beskrevet her. Prosent nøytralisering av aktivering av MxA-promoteren er bestemt som beskrevet i eksemplene (se eksempel 3), ved å benytte RGmax IFN mengder og 2 μg pr. ml antistoff. Den antivirale (CPE) testen kan bli utført i henhold til fremgangsmåtene beskrevet i eksemplene.

Betegnelsen "bispesifikt molekyl", som benyttet her, refererer til et hvert middel, f.eks. et protein, peptid, eller protein eller peptidkompleks, som har to forskjellige bindingsspesifisiteter. Betegnelsen "multispesifikt molekyl" eller "heterospesifikt molekyl" er ment å inkludere et hvert middel, f.eks. et protein, peptid, eller protein- eller peptidkompleks, som har mer enn to forskjellige bindingsspesifisiteter.

Betegnelsen "sammensetning", som benyttet her, refererer til en kombinasjon av aktivt middel og en annen bærer, f.eks. forbindelse eller sammensetning, inert (f.eks. et detekterbart middel eller merke) eller aktiv, slik som en adjuvant, fortynningsmiddel, bindemiddel, stabilisator, buffere, salter, lipofile løsningsmidler, konserveringsmiddel, adjuvant eller lignende. Bærere inkluderer også farmasøytiske bindemiddel- og tilset-

ningsstoffproteiner, peptider, aminosyrer, lipider og karbohydrater (f.eks. sukkere, inkluderende monosakkarider, di-, tri-, tetra- og oligosakkarider; derivatiserte sukkere slik som alditoler, aldonsyrer, esterifiserte sukkere og lignende; og polysakkarider eller sukkerpolymerer), som kan være tilstede enkeltvis eller i kombinasjon, inkluderende alene
 5 eller i kombinasjon 1-99,99% ved vekt eller volum. Eksemplariske proteinbindemidler inkluderer serumalbumin slik som humant serumalbumin (HSA), rekombinant humant albumin (rHA), gelatin, kasein og lignende. Representative aminosyre/antistoffkomponenter, som også kan fungere i en bufrende kapasitet, inkluderer f.eks. alanin, glysin, arginin, betain, histidin, glutaminsyre, aspartinsyre, cystein, lysin, leucin,
 10 isoleucin, valin, metionin, fenylalanin, aspartam og lignende. Karbohydratbindemidler er også ment å være innenfor rekkevidden av denne oppfinnelsen, eksempler på slike inkluderer, men er ikke begrenset til, monosakkarider slik som fruktose, maltose, galaktose, glukose, D-mannose, sorbose og lignende; disakkarider, slik som laktose, sukrose, trehalose, cellobiose og lignende; polysakkarider, slik som raffinose, malezitose, maltodekstriner, dekstraner, stivelser og lignende; og alditoler, slik som mannitol, xylitol,
 15 maltitol, laktitol, xylitol-sorbitol (glukitol) og myoinositol. Betegnelsen bærer inkluderer videre en buffer eller et pH-justerende middel; vanligvis er bufferen et salt preparert fra en organisk syre eller base. Representative buffere inkluderer organiske syresalter slik som salter av sitronsyre, askorbinsyre, glukonsyre, karbonsyre, vinsyre, ravsyre, eddiksyre eller ftalsyre; Tris, trometaminhydroklorid eller fosfatbuffere. Ytterligere bærere inkluderer polymere bindemidler/tilsetningsstoffer slik som polyvinylpyrrolidoner, fikoller (et polymert sukker), dekstrater (f.eks. syklodekstriner, slik som 2-hydroksypropyl-kvadratur-syklodekstrin), polyetylenglykoler, smaksstoffer, antimikrobielle midler, søtningsstoffer, antioksidanter, antistatiske midler, overflateaktive stoffer (f.eks. polysorbater slik som "TWEEN 20" og "TWEEN 80"), lipider (f.eks. fosfolipider, fettsyrer), steroider (f.eks. kolesterol) og chelaterende midler (f.eks. EDTA).
 20
 25

Betegnelsen "kontroll", som benyttet her, refererer til et alternativt emne eller prøve benyttet i en studie for formål av sammenligning. En kontroll kan være "positiv" eller
 30 "negativ".

Betegnelsen "effektiv mengde", som benyttet her, refererer til en mengde tilstrekkelig for å utøve fordelaktige eller ønskede resultater. En effektiv mengde kan bli administrert i en eller flere administrasjoner, påføringer eller doseringer.

Betegnelsene "epitop" eller "antigenisk determinant", som benyttet her, refererer til et sete på et antigen, eller et antigenfragment, gjenkjent ved et antistoff eller en antigenreseptor. En T-cellepitop er et kort peptid derivert fra et proteinantigen som er presentert ved det hensiktsmessige Major Histocompatibility Compatibility (MHC) proteinet. B-cellepitoper er generelt antigeniske determinanter gjenkjent ved B-celler og er alminnelig deler av en tredimensjonal overflate som er gjenkjent ved et antistoff, som kan inkludere sekvensielle eller konformasjonsmessige determinanter, som vil være kjent for fagpersonen.

10 IgG-antistoffer kan bli kløyyet til tre fragmenter ved papainfordøying. To av disse fragmentene er vanligvis identiske antigenbindende fragmenter, kalt "Fab"-fragmenter, hvert med et enkelt antigenbindende sete, og en gjenværende "Fc"-fragment. Fab-fragmentet inneholder den lette kjeden og den aminoterminal halvdel av den tunge kjeden holdt sammen ved en interkjededisulfidbinding. Fc-fragmentet består av de karboksyterminale halvdelene av de to tunge kjedene disulfidbundet til hverandre ved resten av hengsleregionen. Pepsinfordøying av et IgG-antistoff kløyver i den samme generelle regionen av antistoffet som papain, men på den karboksyterminale siden av disulfidbindingen, for å produsere $F(ab')_2$ -fragmentet, som har to antigenkombinerende seter og er fortsatt i stand til å kryssforbinde antigen. Fab'-fragmenter er forskjellig fra Fab-fragmenter ved tilføyingen av noen få rester ved karboksyendene av tungkjede CH1-domenet inkluderende en eller flere cysteiner fra antistoffhengsleregionen. Fab'-SH er betegnelsen for Fab' hvor cysteinresten (restene) av de konstante domene bærer en fri tiolgruppe.

25 Betegnelsen "Fv", som benyttet her, refererer til det minimale antistofffragmentet som inkluderer et fullstendig antigengjenkjennende og bindende sete. I en tokjede Fv-art, inkluderer denne regionen en dimer av et tung- og et lettkjedevariabelt domene i ikke-kovalent assosiasjon. I en enkelkjede Fv-art, kan et tung- og et lettkjedevariabelt domene være forbundet kovalent ved en fleksibel peptidlinker slik at de lette og tunge kjedene kan assosiere i en "dimer" struktur analog til den i en tokjede Fv-art.

Betegnelsen "heteroantistoffer", som benyttet her, refererer til to eller flere antistoffer, antistoffbindende fragmenter (f.eks. Fab), derivater derav, eller antigenbindende regioner forbundet sammen som minst må ha to forskjellige antigenspesifisiteter.

Betegnelsen ”interferon alfa” (”IFN α ”), som benyttet her, refererer til en familie av proteiner som inkluderer noen av de viktigste effektorene av iboende immunitet. Det er minst 15 kjente isotyper av human IFN α . Navnene av IFN α -proteinsubtypene og korresponderende kodende gener er listet opp nedenfor.

5

IFN α -proteinsubtyper	Korresponderende IFN α -gen
A	2a
2	2b
B2	8
C	10
D (Val ¹¹⁴)	1
F	21
G	5
H2	14
I	17
J1	7
K	6
4a	4a
4b	4b
WA	16
1 (Ala ¹¹⁴)	1

Se Pestka et al. (1997) ”Interferon Standardization and Designations”, J. Interferon Cytokine Res. 17: Supplement 1, S9-S14. IFN α B2 er noen ganger også referert til som IFN α B, og skal ikke forveksles med IFN β . Naturlig IFN α fra leukocytter (leukocyt

10 IFN), så vel som disse rekombinante humant IFN α -proteinsubtypene er tilgjengelig fra PBL Biomedical Labs, Piscataway, NJ (interferonsource.com). Naturlig IFN α er en kompleks blanding av IFN α -subtyper. IFN β har ikke blitt detektert i de naturlige IFN α -preparater benyttet her. Fremgangsmåter for å detektere og kvantifisere disse interferonene, slik som ELISA og RIA er kjent i fagfeltet. Se Staehelin et al. (1981) ”Methods in

15 Enzymology” 79 (S. Pestka, red.) Academic Press, NY 589-595; Kelder et al. (1986) ”Methods in Enzymology” 119 (S. Pestka, red.) Academic Press, NY 581-589; Stewart (2003) supra; Bennett, et al. (2003) ”J. Exp. Med.” 197(6):711-723; Baechler et al. (2003) ”Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 100(5):2610-2615.

Betegnelsen ”IFN α -produserende celle”, som benyttet her, refererer til en spesialisert leukocyt som er ansvarlig for IFN α -produksjon som for det meste er induisert ved dobbeltrådet RNA (ds)RNA, virus, bakterier, protozoa, enkelte cellelinjer og umetylert CpG-DNA. Ronnblom og Alm (2004) ”J. Exp. Med.” 194(12):F59-F63.

5

Frasen ”IFN α -relatert tilstand eller sykdom”, som benyttet her, refererer til unormale og skadelige sykdommer eller prekliniske sykdomstilstander som har blitt forbundet med forhøyede nivåer av IFN α i en pasients serum. Eksempler på slike inkluderer, men er ikke begrenset til SLE, Graft versus Vert sykdom (GVHD), type 1 diabetes, AIDS
10 (forårsaket ved humant immunsviktivirus (HIV)), autoimmun tyroiditt, psoriasis og lupus. Fremgangsmåte for å bestemme nivået av IFN α er kjent i fagfeltet og beskrevet her.

Betegnelsen ”immunrespons”, som benyttet her, refererer til de antigenspesifikke
15 responsene av lymfocytter til fremmede substanser. Enhver substans som kan fremkalle en immunrespons er betraktet å være ”immunogen” og er referert til som et ”immuno-gen”. Alle immunogener er antigener, imidlertid er ikke alle antigener immunogene. En immunrespons kan være humoral (via antistoffaktivitet) eller cellemediert (via T-celleaktivering).

20

Betegnelsene ”immunologisk binding” og ”immunologiske bindingsegenskaper”, som benyttet her, refererer til de ikke-kovalente interaksjonene av typen som forekommer mellom et immunglobulinmolekyl og et antigen hvor immunglobulinet er spesifikt. Styrken eller affiniteten av immunologiske bindingsinteraksjoner kan bli uttrykt på vil-
25 kår av dissosiasjonskonstanten (K_d) av interaksjonen, hvor en liten K_d representerer en større affinitet. Immunologiske bindingsegenskaper av valgte polypeptider kan bli kvantifisert ved å benytte fremgangsmåter godt kjent i fagfeltet. En slik fremgangsmåte medfører å måle hastighetene av antigenbindende sete/antigenkompleksdannelse og disso-
siasjon, hvor disse hastighetene avhenger av konsentrasjonene av komplekspartnerne, affiniteten av interaksjonen, og av geometriske parametere som likt påvirker hastigheten
30 i begge retninger. Både ”påhastighetkonstanten” (K_{pa}) og ”avhastighetkonstanten” (K_{av}), kan bli bestemt ved kalkulering av konsentrasjonene og de aktuelle hastighetene av as-sosiasjon og dissosiasjon som er godt kjent i fagfeltet. Forholdet av K_{av}/K_{pa} muliggjør kansellering av alle parametere som ikke er relatert til affinitet og er derfor lik disso-
35 sjonskonstanten K_d . Se f.eks. Coligan et al., ”CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY”, Wiley, NY (1999).

Betegnelsen "isolert", som benyttet her, refererer til et antistoff som har blitt identifisert og separert og/eller gjenvunnet fra en komponent av dets naturlige omgivelse. Kontaminerende komponenter av dets naturlige omgivelse er materialer som kan interferere med diagnostiske eller terapeutiske anvendelser av antistoffet, og kan inkludere enzymer, hormoner og andre proteinøse eller ikke-proteinøse oppløste stoffer. I foretrukkede utførelsesformer vil antistoffet bli rensset (1) til mer enn 95 vekt-% av antistoff som bestemt ved Lowry-metoden, og mest foretrukket mer enn 99 vekt-%, (2) til en grad tilstrekkelig for å oppnå minst 15 rester av N-terminal eller intern aminosyresekvens ved anvendelse av sekvenator med roterende kopp, eller (3) til homogenitet ved SDS-PAGE under reduserende eller ikke-reduserende forhold ved å benytte Coomassie blå eller, fortrinnsvis sølvfarge. Isolert antistoff inkluderer antistoffet in situ i rekombinant celler siden minst en komponent av antistoffets naturlige omgivelse ikke er tilstede. Ordinært kan imidlertid isolert antistoff bli preparert ved minst et rensetrinn. Monoklonale antistoffer og varianter og derivater derav er betraktet som isolerte antistoffer.

Betegnelsen "isotype", som benyttet her, refererer til antistoffklassen basert på aminosyresekvensen av det konstante domenet og deres tunge kjeder. Det er fem hovedisotyper av immunglobuliner: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, og flere av disse ytterligere bli delt inn i underklasser, f.eks. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 og IgA2.

"Lupus" refererer til flere sykdommer eller tilstander. "Systemisk lupus erytematosus" (SLE) er formen av sykdommen som kan ramme mange deler av kroppen. Symptomer av SLE kan være milde eller kraftige, og er gjennomgått her. "Diskoid lupus erytematosus" er en kronisk hudlidelse hvor ete rødt, hevet utslett viser seg i ansiktet, hodebunnen eller andre steder. De hevede områdene kan bli tykke og skalle av og kan forårsake arrdannelse. Utslettet kan vare i dager eller år og kan komme tilbake. En liten prosentandel av mennesker med diskoid lupus har eller utvikler SLE senere. "Subakutt kutan lupus erytematosus" refererer til hudskader som viser seg på deler av kroppen eksponert for sol. "Medikamentindusert lupus" er en form av lupus forårsaket ved enkelte medisiner. Symptomer er lignende dem av SLE (artritt, utslett, feber og brystsmerte) og de går vanligvis vekk fullstendig når medikamentet er stoppet. Nyrene og hjernen er sjelden involvert. "Neonatal lupus" er en sjelden sykdom som kan forekomme hos nyfødte babyer av kvinner med SLE, Sjögren's syndrom, eller ingen sykdom i det hele tatt, og kan være forårsaket ved autoantistoffer i morens blod, kalt anti-Ro (SSA) og anti-La

(SSB). Ved fødsel har babyene vanligvis et hudutslett, leverproblemer og lave blodtel-

Betegnelsen ”farmasøytisk akseptabel bærer”, som benyttet her, refererer til enhver av
 5 de standard farmasøytiske bærerene, f.eks. en fosfatbufret saltoppløsning, vann og
 emulsjoner, slik som olje/vann- eller vann/oljeemulsjon, og ulike typer av fuktemidler.
 Sammensetningene kan også inkludere stabilisatorer og konserveringsmidler av enhver
 av de ovenfor nevnte bærerene med det ytterligere forbeholdet om at de er akseptable for
 anvendelse in vivo. For eksempler på bærere, stabilisatorer og adjuvanter, se Martin
 10 ”REMINGTON’S PHARM. SCI.”, 18. utgave, Mack Publ. Co., Easton, PA (1995) og i
 ”PHYSICIAN’S DESK REFERENCE”, 58. utgave, Medical Economics, Montvale,
 N.J. (2004).

Betegnelsene ”selektivt nøytraliserer” og ”selektivt nøytraliserende”, som benyttet her,
 15 refererer til et isolert og rensset antistoff (slik som, men ikke begrenset til, et monoklon-
 alt antistoff) som nøytraliserer selektivt minst 40% av en bioaktivitet av en eller flere
 ”IFN α ” proteinsubtyper, men nøytraliserer ikke signifikant minst en bioaktivitet av en
 annen IFN α -proteinsubtype, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoterer eller
 antiviral aktivitet. Siden de forskjellige subtypene av IFN α varierer i funksjon, er det
 20 fordelaktig å selektivt nøytralisere spesifikke former av IFN α for å kontrollere spesifik-
 ke funksjoner. Det ene eller flere av antistoffene av den foreliggende oppfinnelsen er
 spesifikke for IFN α , men er også ”selektiv” for en eller flere subtyper og ikke andre.
 For selektivt å nøytralisere en eller flere IFN α -proteinsubtyper, f.eks. A, 2, B2, C, F, G,
 H2, I, J1, K, 4a, 4b, har en eller flere antigene epitoper på IFN α som ikke signifikant
 25 kryssreagerer med antigene epitoper på f.eks. D-subtypen, blitt identifisert, isolert, ka-
 rakterisert og rensset, som angitt her.

Frasen ”nøytraliserer ikke signifikant”, som benyttet her, refererer til et antistoff som
 nøytraliserer mindre enn 40% av bioaktiviteten av en spesifisert IFN α -subtype (eller av
 30 IFN β), hvor bioaktiviteten er målt ved MxA-reportergentesten (RG-testen) eller den
 cytopatiske effekttesten (CPE-testen) i overensstemmelse med forholdene beskrevet her.
 I noen utførelsesformer, nøytraliserer et antistoff av oppfinnelsen ikke signifikant mer
 enn 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2% eller til og med ikke mer enn 1% av
 bioaktiviteten av den spesifiserte IFN α -subtypen.

Betegnelsen "individ", som benyttet her, refererer til en vertebrat, fortrinnsvis et pattedyr, mer foretrukket et menneske. Pattedyr inkluderer, men er ikke begrenset til, gnagere, apere, mennesker, gårdsdyr, hester, hunder og katter.

- 5 Nåværende SLE-behandlinger er symptomatiske og induserer global immunundertrykkelse; disse inkluderer glukokortikoider, syklofosfamider, azatioprin og mykofenolat mofetil. Deres virkeevne er bare partiell, og uønskede bieffekter slik som økt mottakelighet for infeksjoner er alminnelig. Spesifikk nøytralisering av IFN α i SLE-pasienter er derfor et attraktivt konsept for å kontrollere sykdomspatologien. Siden massiv uregulert
- 10 produksjon av IFN α ved pDC'er spiller en signifikant rolle i vedlikehold av sykdomssyklusen, tilveiebringer å nøytralisere IFN α bioaktivitet ved å benytte spesifikk MAb-blokkering et målrettet terapeutisk middel som ikke kompromiterer evnen av pasienter til å iverksette effektive immunresponser til patogener. En ønskelig MAb-kandidat mot IFN α vil kreve spesifikke egenskaper, inkluderende: (i) evne til å reagere mot nesten
- 15 alle av de humane IFN α -subtypene involvert i etiologien av SLE; (ii) evnen til å blokkere de biologiske aktivitetene av slike IFN α -subtyper, (iii) udugelighet til å blokkere enten IFN β eller IFNAR; og/eller (iv) høy affinitet. Nøytralisering av IFN α i stedet for IFNAR, kan også tilveiebringe trygt og mer spesifikt legemiddel siden denne fremgangsmåten ikke vil ramme de antivirale effektene av IFN β -signalleringsveien, som
- 20 benytter den samme reseptoren som IFN α . Derfor tilveiebringer oppfinnelsen også en serie av monoklonale antistoffer (MAb'er) i stand til å nøytralisere human IFN α . To av disse anti-IFN α -MAb'ene er f.eks. i stand til å blokkere bioaktiviteten av tretten rekombinante IFN α -subtyper, så vel som to komplekse blandinger av IFN produsert ved viral infeksjon. I et aspekt, tilveiebringer oppfinnelsen syv MAb'er som variabelt nøytraliserer human IFN α , hvorav tre signifikant nøytraliserer opp til tretten rekombinante
- 25 IFN α -subtyper og komplekse IFN α -blandinger (både kommersielt tilgjengelig leukocytt IFN og supernatanter produsert ved infeksjon av PBMC'er med influensavirus). To av MAb'ene, ACO-1 og ACO-2, blokkerer også konsekvent bioaktiviteten av serum fra SLE-pasienter som viser IFN α -signaturer ved mikromatriseanalyse. Siden ACO-1 og
- 30 ACO-2 ikke signifikant nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper D og 1, men nøytraliserer IFN α -bioaktiviteten av SLE-serum, er disse subtypene trolig ikke signifikant involvert i etiologien av SLE. Følgelig er det ønskelig å behandle SLE ved å benytte antistoffer, slik som humaniserte eller ikke-antigene (dvs. deimmuniserte) varianter av ACO-1 og ACO-2, som blokkerer bioaktiviteten av IFN α -subtyper assosiert
- 35 med SLE, men blokkerer ikke bioaktivitetene av IFN α -proteinsubtyper (D og 1) som ikke er signifikant assosiert med SLE.

- Oppfinnelsen tilveiebringer også et antistoff som selektivt nøytraliserer en bioaktivitet av minst to interferon alfa ("IFN α ") proteinsubtyper valgt fra gruppen bestående av proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, men nøytraliserer ikke
- 5 signifikant minst en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtype D; hvor bioaktiviteten f.eks. er aktivisering av MxA-promoteren og/eller antiviral aktivitet. I et annet aspekt, tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å behandle en sykdom eller tilstand assosiert med unormal ekspresjon av minst en interferon alfa ("IFN α ") proteinsubtype valgt fra
- 10 proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA uten å nøytralisere IFN α -proteinsubtype D antiviral aktivitet, i et individ, inkluderende å administrere til individet en effektiv mengde av et eller flere av antistoffene beskrevet her. Eksempler på slike antistoffer inkluderer, men er ikke begrenset til, antistoffene betegnet ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5, ACO-6 og antistoffer som hovedsakelig gjenkjenner den
- 15 samme IFN α -epitopen som et hvert av de foregående antistoffene. Fortrinnsvis er antistoffene monoklonale antistoffer. ATCC-avleveringsnummerne av hybridomcellelinjer som produserer disse monoklonale antistoffene er listet opp her nedenfor. Følgelig, tilveiebringer oppfinnelsen videre hybridomcellelinjer uttrykkende ACO-1-, ACO-2-, ACO-3-, ACO-4-, ACO-5-, ACO-6- og ACO-8-antistoffene.
- 20 I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff som hovedsakelig binder den samme IFN α -epitopen som et antistoff valgt fra gruppen bestående av ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5 og ACO-6. Oppfinnelsen tilveiebringer videre cellelinjer, f.eks. en hybridom, som uttrykker slike antistoffer.
- 25 I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff som nøytraliserer en bioaktivitet av minst 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 eller 14 IFN α -proteinsubtyper valgt fra proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, men nøytraliserer ikke minst en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtype D; hvor bioaktiviteten er aktivisering av MxA-promoteren eller antiviral aktivitet. Oppfinnelsen tilveiebringer videre
- 30 hybridomcellelinjer som uttrykker slike antistoffer.

Monoklonale antistoffer er tilveiebragt som ikke nøytraliserer minst en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtype 1, hvor bioaktiviteten er aktivisering av MxA-promoteren og/eller antiviral aktivitet.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et monoklonalt antistoff som selektivt nøytraliserer en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, K, 4a, 4b og WA, men nøytraliserer ikke signifikant bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper D og 1, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren og/eller antiviral aktivitet. Andre utførelsesformer inkluderer ACO-1 og ACO-2.

I et annet aspekt, tilveiebringer oppfinnelsen et monoklonalt antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtypene A, 2, B2, C, I, K og 4a, men nøytraliserer ikke signifikant bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper D, F, G, 4b og 1; hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren og/eller antiviral aktivitet. En slik utførelsesform er ACO-3-antistoffet laget ved ACO-3-cellen og derivater derav.

I ytterligere aspekt, tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtypene A, 2, B2 og C, men nøytraliserer ikke signifikant bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper D, 4b og 1, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren og/eller antiviral aktivitet. En slik utførelsesform er ACO-4-antistoffet og derivater derav laget ved ACO-4-cellen og derivater derav.

I et annet aspekt, nøytraliserer antistoffet av denne oppfinnelsen en bioaktivitet av IFN α 4a, men nøytraliserer ikke selektivt IFN α 4b, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren. Eksempler på disse antistoffene er antistoffene betegnet ACO-3 og ACO-4, og derivater derav, laget ved hhv. f.eks. ACO-3- og ACO-4-cellene og derivatene derav.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et monoklonalt antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtypene A, 2, G, I, K, WA og 1, men nøytraliserer ikke signifikant bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper B2 og D, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren og/eller antiviral aktivitet. En slik utførelsesform er ACO-5-antistoffet og derivater derav, laget ved f.eks. ACO-5-cellen og derivater derav.

I en ytterligere utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et monoklonalt antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper 2 og C, men nøytraliserer ikke bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper A, B2, C, D, F og 1, hvor bioaktiviteten er aktivering av MxA-promoteren. Et eksempel er ACO-6-antistoffet og derivater derav laget ved ACO-6-cellen og derivater derav.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et monoklonalt antistoff som selektivt nøytraliserer bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper A, 2, B2, D, F, I, 4a, 4 b og 1, men nøytraliserer ikke bioaktiviteten av IFN α -proteinsubtyper C, H2, K og WA, hvor bioaktiviteten er aktivisering av MxA-promoteren. Et eksempel er ACO-8-antistoffet og derivater derav laget ved ACO-8-cellen og derivater derav.

De monoklonale antistoffene av oppfinnelsen inkluderer også et humanisert antistoff, et humant antistoff, et chimert antistoff, et antistofffragment, slik som et Fab-fragment, et F(ab')₂-fragment, et Fab'-fragment eller et hvert annet fragment kjent for fagpersonen. I et eksempel er antistoffet er humanisert chimert antistoff.

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å produsere en hybridomcellelinje ved f.eks. å immunisere et pattedyr med en sammensetning inkluderende rekombinant IFN α -subtyper A, B2 og F; fusjonere splenocytter fra pattedyret med en myelomcellelinje for å produsere hybridomer; og identifisere en hybridomcellelinje som produserer et monoklonalt antistoff som selektivt nøytraliserer en eller flere IFN α -proteinsubtyper valgt fra gruppen bestående av 2, C, G, I, J1, K, 4a, 4b og WA og 1, men nøytraliserer ikke selektivt IFN α -proteinsubtype D.

Betegnelsen "nøytraliserer", som benyttet her, refererer til evnen av et antistoff til å inhibere en eller flere biologiske aktiviteter av en IFN α -proteinsubtype med minst 40% målt ved RT, CPE eller monocyttdifferensieringstestene definert her. For eksempel nøytraliserer antistoffet minst 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% eller 100% av en biologisk aktivitet av en IFN α -proteinsubtype. IFN α -biologiske aktiviteter inkluderer transkripsjonell aktivisering av MxA-promoteren (se f.eks. "RG"-testen, infra), antiviral aktivitet, f.eks. cytopatisk effekttest ("CPE"), og evnen av SLE-serum til å forårsake differensiering av monocytter til dendrittceller. fremgangsmåter for å bestemme prosentandelen nøytralisering ved å benytte RG-test og CPE-testen er beskrevet her.

Frasene "nøytraliserer ikke" eller "nøytraliserer ikke signifikant", som benyttet her, refererer til et antistoff som nøytraliserer mindre enn 40% av en biologisk aktivitet av en IFN α -proteinsubtype, hvor den nøytraliserende effekten av tilsatt antistoff er målt ved RG-, CPE- eller monocyttdifferensieringstesten. Antistoffet nøytraliserer f.eks. mindre enn 35%, eller mindre enn 35%, eller mindre enn 30%, eller mindre enn 25%, eller mindre enn 20%, eller mindre enn 15%, eller mindre enn 10%, eller mindre enn 8%,

eller mindre enn 5%, eller mindre enn 3%, eller til og med mindre enn 1% av bioaktiviteten.

Antistoffet av oppfinnelsen kan være antistoffvarianter, derivater eller fragmenter. I et aspekt er antistoffene isolert. I et annet aspekt er antistoffene kombinert med en egnet bærer. Antistoffene kan bli isolert fra enhver art, mus, rotte, ape, eller rekombinant produsert. Eksempler på musemonoklonale antistoffer er antistoffene betegnet ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5, ACO-6 og ACO-8. Også tilveiebragt ved denne oppfinnelsen er hybridomcellelinjene som produserer disse monoklonale antistoffene, alene eller i kombinasjon med en bærer eller i kultur.

Også tilveiebragt ved denne oppfinnelsen er polypeptider som inkluderer et antistoff, variant, derivat eller fragment derav, inkluderende, men ikke begrenset til, immunglobulinlignende linker og CDR'er. Polypeptidene binder, inhiberer og/eller nøytraliserer fortrinnsvis IFN α som beskrevet ovenfor, med den samme eller lignende affinitet og/eller evne.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer videre et anti-idiotypisk antistoff reaktivt med et hvert av antistoffene ACO-1 til og med ACO-6 eller ACO-8. Et anti-idiotypeantistoff er et antistoff laget mot de unike determinantene av et enkelt antistoff. Anti-idiotypeantistoffer er nyttige for å detektere bunnede antistoffer i immuntester og andre anvendelser. Et anti-idiotypeantistoff av oppfinnelsen kan inkludere eller bli derivert fra et hvert pattedyr, slik som, men ikke begrenset til, et menneske, en mus, en kavnin, en rotte, en gnager, en primat og lignende.

Et eller flere av antistoffene ovenfor kan videre bli kombinert med en bærer, en farmasøytisk akseptabel bærer eller medisinsk anordning som er egnet for anvendelse av antistoffet eller den relaterte sammensetningen i diagnostiske eller terapeutiske fremgangsmåter. Bæreren kan være en bærer i flytende fase eller fast fase, f.eks. kule, gele eller bærermolekyl slik som et liposom. Sammensetningen kan eventuelt videre inkludere minst en ytterligere forbindelse, protein eller sammensetning. Et ytterligere eksempel på "bærere" inkluderer terapeutisk aktive midler slik som et annet peptid eller protein (f.eks. et Fab'-fragment, en J-kjede, et annet antistoff, et toksin og lignende). For eksempel kan et anti-IFN α -antistoff av denne oppfinnelsen, variant, derivat eller fragment derav, bli funksjonelt forbundet (f.eks. ved kjemisk kobling, genetisk funksjon, ikke-kovalent assosiasjon eller på annen måte) til en eller flere andre molekyllære enheter, slik som et annet antistoff (f.eks. for å produsere et bispesifikt eller multispesifikt anti-

stoff), et cytotoxin, en cellulær ligand eller et antigen. Følgelig omslutter denne oppfinnelsen et stort utvalg av antistoffkonjugater, bi- og multispesifikke molekyler, og fusjonsproteiner, hvorvidt de målsøker den samme epitopen av antistoffene eller ikke av denne oppfinnelsen.

5

Ytterligere eksempler på bærere er organiske molekyler (også kalt modifierende midler) eller aktiverende midler som kan være festet kovalent, direkte eller indirekte, til et antistoff av denne oppfinnelsen. Festing av molekylet kan forbedre farmakokinetiske egenskaper (f.eks. økt in vivo serumhalveringstid). Eksempler på organiske molekyler inkluderer, men er ikke begrenset til, en hydrofil polymer gruppe, en fettsyregruppe eller en fettsyreestergruppe. Betegnelsen "fettsyre", som benyttet her, refererer f.eks. til monokarboksytsyre og dikarboksytsyre. Betegnelsen "hydrofil polymer gruppe", som benyttet her, refererer til en organisk polymer som f.eks. er mer løselig i vann enn i oktan.

15

Hydrofile polymerer egnet for å modifisere antistoffer av oppfinnelsen kan være lineære eller forgrenede og inkluderer f.eks. polyalkanglykoler (f.eks. polyetylen glykol (PEG), monometoksy polyetylen glykol (mPEG), polypropylen glykol (PPG) og lignende), karbohydrater (f.eks. dekstran, cellulose, oligosakkarider, polysakkarider og lignende), polymerer av hydrofile aminosyrer (f.eks. polylysin, polyarginin, polyaspartat og lignende), polyalkanoksider (f.eks. polyetylen oksid, polypropylen oksid og lignende), og polyvinylpyrrolidon. En egnet hydrofil polymer for anvendelse med et antistoff av oppfinnelsen kan ha en molekylær vekt på f.eks. omkring 800 til omkring 150 000 Dalton som en separat molekylær helhet. Den hydrofile polymere gruppen kan bli substituert med en til omkring seks alkyl, fettsyre- eller fettsyreestergrupper. Hydrofile polymerer som er substituert med en fettsyre- eller fettsyreestergruppe kan bli preparert ved å benytte egnede fremgangsmåter. En polymer inkluderende en amingruppe kan f.eks. bli koblet til et karboksylat av fettsyren eller fettsyreesteren, og et aktivert karboksylat (f.eks. aktivert med N,N-karbonyldiimidazol) på en fettsyre eller fettsyreester kan bli koblet til en hydroksylgruppe på en polymer.

30

Fettsyrer og fettsyreestere egnet for å modifisere antistoffer av oppfinnelsen kan være mettet eller kan inneholde en eller flere enheter av umetning. Eksempler på slike inkluderer, men er ikke begrenset til, n-dodekanoat, n-tetradekanoat, n-oktadekanoat, n-eikosanoat, n-dodokanoat, n-triakontanoat, n-tetrakontanoat, cis- δ -9-oktadekanoat, alle cis- δ -5,8,11,14-eikosatetraenoat, oktandionsyre, tetradekandionsyre, oktadekandionsyre,

35

dokosandionsyre og lignende. Egnede fettsyreestere inkluderer monoestere av dikarboksylsyrer og inkluderer en lineær eller forgrenet lavere alkylgruppe. Den lavere alkylgruppen kan inkludere fra et til omkring tolv, fortrinnsvis et til omkring seks karbonatomer.

5

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen et transgent, ikke-humant dyr, slik som en transgen mus (også referert til her som "Human MAb-mus"), som uttrykker et fullstendig humant monoklonalt antistoff som nøytraliserer minst en IFN α -proteinsubtype lignende et antistoff av denne oppfinnelsen som definert ovenfor. I en bestemt utførelsesform, er det transgene ikke-humane dyret en transgen mus som har et genom inkluderende et humant tungkjedettransgen og et humant lettkjedettransgen som koder for hele eller en del av anti-alfa V-antistoffet av oppfinnelsen. For å generere humane antistoffer, kan det transgene ikke-humane dyret bli immunisert med et rensset eller anrikt preparat av IFN α -proteinsubtyper A, B og F. Et eksempel på et transgent ikke-humant dyr kan f.eks. være en transgen mus som er i stand til å produsere multiple isotyper av humane monoklonale antistoffer til IFN α (f.eks. IgG, IgA og/eller IgM) ved å gjennomgå V-D-J-rekombinasjon og isotypesvitsjing. Isotypesvitsjing kan f.eks. forekomme ved klassisk eller ikke-klassisk isotypesvitsjing.

Følgelig tilveiebringer en annen utførelsesform av oppfinnelsen isolerte celler derivert eller isolert fra et transgent ikke-humant dyr som beskrevet ovenfor, f.eks. en transgen mus, som uttrykker humane antistoffer. De isolerte B-cellene kan bli immortalisert ved fusjon til en immortaliseret celle for å tilveiebringe en kilde (f.eks. en hybridom) av humane antistoffer. Disse hybridomene er også inkludert innenfor rekkevidden av oppfinnelsen.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer videre minst en antistoffremgangsmåte eller sammensetning, for å diagnostisere minst en IFN α -relatert tilstand i en celle, vev, organ, dyr eller pasient og/eller før, påfølgende eller under en relatert tilstand, som kjent i fagfeltet og/eller som beskrevet her. De er også benyttet for å stille prognose av eller monitorere sykdomsprogressjon.

Også tilveiebragt er en sammensetning omfattende minst et anti-IFN α -antistoff av denne oppfinnelsen, variant, derivat eller fragment derav, egnet for administrasjon i en effektiv mengde for å modulere eller forbedre IFN α -assosierte symptomer eller behandle minst en IFN α -relatert tilstand i en celle, vev, organ, dyr eller pasient og/eller før, på-

35

følgende eller under en relatert tilstand, som kjent i fagfeltet og/eller beskrevet her.

Sammensetningene inkluderer f.eks. farmasøytiske og diagnostiske sammensetninger/sett, inkluderende en farmasøytisk akseptabel bærer og minst et anti-IFN α -

antistoff av denne oppfinnelsen, variant, derivat eller fragment derav. Som bemerket

- 5 ovenfor, kan sammensetningen videre inkludere ytterligere antistoffer eller terapeutiske midler som i kombinasjon, tilveiebringer multiple terapier skreddersydd for å tilveiebringe den maksimale terapeutiske fordelen.

Alternativt kan en sammensetning av denne oppfinnelsen bli ko-administrert med andre

- 10 terapeutiske og cytotoksiske midler, hvorvidt eller ikke forbundet til dem eller administrert i den samme doseringen. De kan bli ko-administrert samtidig med slike midler

(f.eks. i en enkel sammensetning eller separat) eller kan bli administrert før eller etter administrasjon av slike midler. Slike midler kan inkludere kortikosteroider, ikke-stereoide immunundertrykkende midler, midler mot malaria og ikke-steroide, antiin-

- 15 flammatoriske medikamenter. Sammensetningene kan bli kombinert med alternative terapier slik som administrasjon av kortikosteroider, ikke-steroide immunundertrykkende midler, midler mot malaria og ikke-steroide antiinflammatoriske medikamenter.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for selektivt å nøytralisere

- 20 en bioaktivitet av minst to interferon alfa ("IFN α ") proteinsubtyper valgt fra gruppen bestående av proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, uten å selektivt nøytralisere minst en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtype D; hvor bioaktiviteten er aktivisering av MxA-promoterer eller antiviral aktivitet. Fremgangsmåten krever å kontakte prøven mistenkt for å inneholde subtypen med et monoklonalt antistoff som
- 25 selektivt nøytraliserer subtypen. Eksempler på slike antistoffer inkluderer, men er ikke begrenset til antistoffene betegnet ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5 og ACO-6.

Ulike terapier er tilveiebragt ved denne oppfinnelsen. Denne redegjørelsen angir f.eks.

- 30 fremgangsmåter for å forbedre symptomene assosiert med unormal ekspresjon av minst en interferon alfa ("IFN α ") proteinsubtype valgt fra gruppen bestående av proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, K, 4a, 4b og WA uten å binde IFN α -proteinsubtyper D o 1 i et individ, ved å administrere til individet en effektiv mengde av et antistoff som selektivt nøytraliserer subtypen. Eksempler på slike er tilveiebragt ovenfor.

- 35 Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for behandling av en sykdom eller tilstand som resulterer i unormal ekspresjon av minst en interferon alfa ("IFN α ") proteinsubtype

valgt fra gruppen bestående av proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, K, 4a, 4b og WA uten å binde IFN α -proteinsubtyper D og 1 i et individ, ved å administrere til individet en effektiv mengde av et antistoff som selektivt nøytraliserer subtypen. Eksempler på slike er tilveiebragt ovenfor. Videre tilveiebragt er fremgangsmåter for immunisering ved å administrere til et pattedyr en sammensetning inkluderende rekombinante IFN α -subtyper A, B2 og F. I en annen utførelsesform inkluderer fremgangsmåten av immunisering å administrere til et pattedyr en sammensetning hovedsakelig bestående av IFN α -subtyper A, B2 og F, en farmasøytisk akseptabel bærer, og eventuelt en eller flere adjuvanter. I et alternativt aspekt, hever immunisering antistoffer som nøytraliserer IFN α -proteinsubtyper A, B2 og F, men ikke IFN α -proteinsubtyper D og 1. I et ytterligere aspekt nøytraliserer fremgangsmåten og sammensetningen IFN α 4a og ikke IFN α 4b (f.eks. ACO-3).

For anvendelse in vivo, er antistoffene og sammensetningene av denne oppfinnelsen administrert eller levert til pasienter (f.eks. humane individer) ved terapeutiske effektive doseringer for å nøytralisere valgte IFN α -subtyper. I tillegg, kan administrasjon eller levering av effektive mengder av antistoffer eller sammensetninger av denne oppfinnelsen bli benyttet for å behandle eller forbedre symptomene av en IFN α -relatert tilstand slik som SLE, diabetes, psoriasis eller AIDS, i et individ ved å benytte en hver egnet rute av administrasjon for antistoffbaserte kliniske produkter. Mange er kjent i fagfeltet, slik som injeksjon eller infusjon.

Doseringsformer.

En doseringsenhet for anvendelse av antistoffene av den foreliggende oppfinnelsen kan være en enkel forbindelse eller blandinger derav med andre forbindelser. Forbindelsene kan bli blandet sammen, danne ioniske eller til og med kovalente bindinger. Et eller flere av antistoffene av den foreliggende oppfinnelsen kan bli administrert i oral, intravenøs (bolus eller infusjon), intraperitoneal, subkutan eller intramuskulær form, alle ved å benytte doseringsformer godt kjent for fagpersoner i de farmasøytiske fagfeltene. Avhengig av den bestemte lokaliseringen eller fremgangsmåten for levering, kan forskjellige doseringsformer, f.eks. tabletter, kapsler, piller, pulvere, granuler, eliksirer, tinkturer, suspensjoner, siruper og emulsjoner bli benyttet for å tilveiebringe antistoffet/antistoffene av den foreliggende oppfinnelsen til en pasient med behov for terapi som inkluderer nøytraliseringen av enkelte IFN α -subtyper, som beskrevet her. Antistoffene er generelt hydrofobe, men de kan bli administrert som enhver av kjente saltformer.

Antistoffer er vanligvis administreret i blanding med egnede farmasøytiske salter, buffere, fortynningsmidler, ekstendere, bindemidler og/eller bærere (kollektivt referert til her som en farmasøytisk akseptabel bærer eller bærermaterialer) valgt basert på den tiltenkte formen av administrasjon og som samsvarende med konvensjonell farmasøytisk praksis. Avhengig av den beste lokaliseringen for administrasjon, kan antistoffene bli formulert for å f.eks. tilveiebringe maksimal og/eller forenelig dosering for den bestemte formen for oral, rektal, topikal, intravenøs injeksjon eller parenteral administrasjon. Mens antistoffene, f.eks. humaniserte former av ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5, ACO-6 og ACO-8, kan bli administrert alene, eller i kombinasjon, i en farmasøytisk akseptabel bærer. Bæreren kan være fast eller flytende, avhengig av typen og/eller lokaliseringen av administrasjon valgt.

Teknikker og sammensetninger for å lage nyttige doseringsformer ved å benytte den foreliggende oppfinnelsen er beskrevet i en eller flere av de følgende referansene: Ansel, "Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms", 2. utgave (1976); "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17. utgave (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985); "Advances in Pharmaceutical Sciences" (David Ganderton, Trevor Jones, red., 1992); "Advances in Pharmaceutical Sciences", bind 7 (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, red., 1995); "Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms" (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, serie 36 (James McGinity, red., 1989); "Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications": Drugs and the Pharmaceutical, bind 61 (Alain Rolland, red., 1993); "Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract" (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology; J.G. Hardy, S.S. Davis, Clive G. Wilson, red.); "Modern Pharmaceutics Drugs and the Pharmaceutical Sciences", bind 40 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, red.).

Antistoffene av den foreliggende oppfinnelsen kan bli administrert i form av liposomleveringssystemer, f.eks. små unilamellære vesikler, store unilamellære vesikler, og multilamellære vesikler, enten ladede eller uladede. Liposomer kan inkludere en eller flere: fosfolipider (f.eks. kolesterol), stearylamin og/eller fosfatidylkolin, blandinger derav og lignende.

Antistoffene kan også bli koblet til en eller flere løselige, biodegraderbare, bioakseptable polymerer som medikamentbærere eller som et promedikament. Slike polymerer kan

inkludere: polyvinylpyrrolidon, pyrankopolymer, polyhydroksylpropylmeakrylamidfenol, polyhydroksyetylaspartamimdefenol, eller polyetylenoksidpolylysin substituert med palmitoylrester, blandinger derav og lignende. Videre kan antistoffene bli koblet til en eller flere biodegraderbare polymerer for å oppnå kontrollert frigjøring av antistoffene, biodegraderbare polymerer for anvendelse med den foreliggende oppfinnelsen inkluderer: polymelkesyre, polyglykolsyre, kopolymerer av polymelkesyre og polyglykolsyre, polyepsilonekapolakton, polyhydroksysmørsyre, polyortoestere, polyacetaler, polydihydropyraner, polycyanoacylater, og kryssforbundede eller amfifatiske blokkopolymerer av hydrogeler, blandinger derav og lignende.

For direkte levering til de nasala passasjene, bihuler, munn, svelg, øsofagus, takea, lunger og alveoli, kan antistoffene også bli levert som en intranasal form via anvendelse av et egnet intranasalt befordringsmiddel. For dermal og transdermal levering, kan antistoffene bli levert ved å benytte lotioner, kremer, oljer, eliksirer, serumer, transdermale hudplaster og lignende, som er godt kjent for fagpersoner. Parenterale og intravenøse former kan også inkludere farmasøytisk akseptable salter og/eller mineraler og andre materialer for å gjøre dem kompatible med typen av injeksjon eller leveringsystem valgt, f.eks. en bufret, isoton løsning. Eksempler på nyttige farmasøytiske doseringsformer for administrasjon av antistoffer kan inkludere de følgende formene.

Injiserbar løsning.

En parenteral sammensetning egnet for administrasjon ved injeksjon er preparert ved å røre 1,5 vekt-% av aktiv ingrediens i deionisert vann og blandet med f.eks. opptil 10 volum-% propylenglykol og vann. Løsningen er gjort isoton med natriumklorid og sterilisert ved å f.eks. benytte ultrafiltrering. Sterile injiserbare løsninger er preparert ved inkorporering av de aktive forbindelsene i den nødvendige mengden i et hensiktsmessig løsningsmiddel med ulike av de andre ingrediensene spesifisert ovenfor, som nødvendig, etterfulgt ved filtrert sterilisering. Generelt er dispersjoner preparert ved inkorporering av de ulike steriliserte aktive ingrediensene i et sterilt befordringsmiddel som har et basisk dispersjonsmedium. I tilfelle av sterile pulvere for prepareringen av sterile injiserbare løsninger, inkluderer nyttige fremgangsmåter for prepareringen av et tørt pulver, vakuumbørking, sprayfrysing, vakuumbørking i nærvær av varme og frysetørkingsteknikker, som gir et pulver av den aktive ingrediensen pluss enhver ytterligere ønsket ingrediens fra en på forhånd steriltfiltrert løsning derav. Antistoffene av den foreliggende oppfinnelsen kan bli levert som mikro- eller nanopartikler i en injiserbar form eller via pulmonær eller annen levering.

Suspensjoner.

I en utførelsesform kan en vannholdig suspensjon ble preparert for administrasjon slik at hver 5 ml f.eks. har 0,001-1,000 mg av finfordelt aktiv ingrediens, 200 mg av
 5 natriumkarboksymetylcellulose, 5 mg av natriumbenzoat, 1,0 g av sorbitolløsning og salt til 0,01, 0,1, 1, 5 eller 10 ml.

Den effektive dosen av antistoff kan inkludere mengder som gir ved rekondisjonering, om i et vått/tørt system, konsentrasjoner fra omkring 1,0 µg/ml til omkring 1 000
 10 mg/ml, selv om lavere og høyere konsentrasjoner er funksjonelle og er avhengig av det tiltenkte befordringsmidlet for levering, f.eks. vil løsningsformuleringer være forskjellig fra transdermalt plaster, pulmonære, transmukosale eller osmotiske eller mikropumpe-fremgangsmåter.

15 Formuleringer inkluderende et antistoff av denne oppfinnelsen er tilveiebragt her. Formuleringene av den foreliggende oppfinnelsen kan bli preparert ved en fremgangsmåte som inkluderer en blanding av minst et antistoff av denne oppfinnelsen og et konserveringsmiddel valgt fra gruppen bestående av fenol, m-kresol, p-kresol, o-kresol, klorkresol, benzylalkohol, alkylparaben (metyl, etyl, propyl, butyl og lignende), benzal-
 20 koniumklorid, benzetoniumklorid, natriumdehydroacetat og timerosal eller blandinger derav i et vannholdig fortynningsmiddel. Blanding av antistoffet og konserveringsmidlet i et vannholdig fortynningsmiddel er utført ved å benytte konvensjonelle prosedyrer for oppløsning og blanding. For eksempel er en målt mengde av minst et antistoff i bufret løsning kombinert med det ønskede konserveringsmidlet i en bufret løsning i
 25 mengder tilstrekkelig for å tilveiebringe antistoffet og konserveringsmidlet ved de ønskede konsentrasjonene. Variasjoner av denne fremgangsmåten vil bli gjenkjent ved en fagperson, f.eks. er rekkefølgen komponentene er tilsatt, hvorvidt ytterligere tilsetningsstoffer er benyttet, temperaturen og pH hvorved formuleringen er preparert, alle faktorer som kan bli optimalisert for konsentrasjonen og fremgangsmåten av administrasjon be-
 30 nyttet.

Formuleringen kan inkludere et eller flere konserveringsmidler eller stabilisatorer slik som fenol, m-kresol, p-kresol, o-kresol, klorkresol, benzylalkohol, fenylkvikksølvnitritt, fenoksyetanol, formaldehyd, klorbutanol, magnesiumklorid (f.eks. heksahydrat), alkyl-
 35 paraben (metyl, etyl, propyl, butyl og lignende), benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, natriumdehydroacetat og timerosal, eller blandinger derav i et vannholdig fortyn-

ningsmiddel. En hver egnet konsentrasjon eller blanding kan bli benyttet som kjent i fagfeltet, slik som 0,001-5%, eller et hvert område eller verdi deri, slik som, men ikke begrenset til, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, eller et hvert område eller verdi deri. Ikke-begrensede eksempler inkluderer, ikke noe konserveringsmiddel/midler eller konserveringsmidler slik som f.eks. 0,1-2% m-kresol (f.eks. 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% benzylalkohol (f.eks. 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5% timerosal (f.eks. 0,005, 0,01), 0,001-2,0% fenol (f.eks. 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% alkylparaben(er) (f.eks. 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9 og 1,0%).

Sammensetningene og formuleringene kan bli tilveiebragt til pasienter som klare løsninger eller som doble rør inkluderende et rør av lyofilisert antistoff som er rekondisjonert med et annet rør inneholdende det vannholdige fortynningsmidlet. Enten kan et enkelt løsningsrør eller dobbelt rør krevende rekondisjonering bli brukt om igjen multiple ganger og kan være nok for en enkel eller multiple sykluser av pasientbehandling og tilveiebringer derfor et mer bekvemmelig behandlingsregime enn nåværende tilgjengelig. Gjenkjente anordninger inkluderende disse enkle rørsystemene inkluderer de peninjektoranordningene for levering av en løsning slik som BD Pens, BD Autojectore, Humaject™, NovoPen™, B-DTMPen, AutoPen™ og OptiPen™, Genotropin-Pen™, Genotronorm Pen™, Humatro Pen™, Reco-Pen™, Roferon Pen™, Biojector™, Iject™, J-tip Needle-Free Injector™, Intraject™, Medi-Ject, f.eks. som laget eller utviklet ved Becton Dickinson (Franklin Lakes, N.J. tilgjengelig ved bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Sveits, tilgjengelig ved disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon (tilgjengelig ved bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, Storbritannia, tilgjengelig ved weston-medical.com), Medi-Ject Corp. (Minneapolis, Minn., tilgjengelig ved mediject.com).

Oppfinnelsen tilveiebringer en artikkel for fremstilling, inkluderende pakningsmateriale og minst et rør inkluderende en løsning av minst antistoff som av denne oppfinnelsen med de preskriberte bufferne og/eller konserveringsmidlene, eventuelt i et vannholdig fortynningsmiddel, hvor pakningsmaterialet inkluderer et merke som indikerer at slik løsning kan bli oppbevart over en periode på 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 71 timer eller mer. Oppfinnelsen inkluderer videre en artikkel for frem-

- stilling, inkluderende pakningsmateriale, et første rør inkluderende minst et lyofilisert antistoff av denne oppfinnelsen og et andre rør inkluderende et vannholdig fortynningsmiddel av preskribert buffer eller konserveringsmiddel, hvor pakningsmaterialet inkluderer et merke som instruerer en pasient til å rekondisjonere antistoffet i det vann-
- 5 holdige fortynningsmidlet for å danne en løsning som kan bli oppbevart over en periode på 24 timer eller mer.

Sett.

Den foreliggende oppfinnelsen inkluderer også farmasøytiske sett nyttige for f.eks. behandlingen av en sykdomstilstand, settet kan inkludere en eller flere beholdere som inkluderer den farmasøytiske sammensetningen som kan bli tilveiebragt som fortynnet
 5 eller resuspendert i en terapeutisk effektiv mengde av antistoffer. Slike sett kan ytterligere inkludere, om ønsket, en eller flere av ulike konvensjonelle farmasøytiske komponenter av settet, slik som f.eks. beholdere med en eller flere farmasøytisk akseptable bærere, væsker, ytterligere beholdere, som f.eks. vil bli enkelt forstått ved fagpersoner. Skrevne instruksjoner, enten som innlegg som merker, indikerende mengder av komponentene som skal bli administrert, retningslinjer for administrasjon og/eller retningslinjer for blanding av komponentene, kan også bli inkludert i settet. Det burde bli forstått at selv om de spesifiserte materialene og forholdene er viktig i å praktisere oppfinnelsen, er uspesifiserte materialer og forhold ikke ekskludert så lenge som de ikke hindrer fordelene av oppfinnelsen fra å bli realisert.

15

Antistoffer.

Antistoffene av denne oppfinnelsen inkluderer monoklonale antistoffer. De kan også være IFN α -nøytraliserende funksjonelle fragmenter, antistoffderivater eller antistoffvarianter. De kan være chimere, humaniserte eller totalt humane. Et funksjonelt fragment
 20 av et antistoff inkluderer, men er ikke begrenset til, Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂ og enkelkjedevariable regioner. Antistoffer kan bli produsert i en cellekultur, f.eks. i bakterier, gjær, planter eller planteceller, insekter eller insektceller, eukaryot celle, eller i ulike dyr, inkluderende, men ikke begrenset til, kuer, kaniner, geiter, mus, rotter, hamstere, marsvin, sauer, hunder, katter, aper, sjimpanser osv. Så lenge som fragmentet eller derivatet
 25 holder spesifisitet av binding eller nøytraliseringssevne som antistoffene av denne oppfinnelsen det bli benyttet. Antistoffer kan bli testet for spesifisitet av binding ved å sammenligne binding til hensiktsmessig antigen mot binding til irrelevant antigen eller antigenblanding under et gitt sett av forhold. Om antistoffet binder til det hensiktsmessige antigenet ved minst 2, 5, 7 og til og med 10 ganger mer enn til irrelevant antigen eller antigenblanding, så er det betraktet til å være spesifikt. Spesifikke tester, f.eks.
 30 ELISA, for å bestemme spesifisitet er beskrevet infra.

Antistoffene er også karakterisert ved deres evne til å nøytralisere en eller flere biologiske aktiviteter av en IFN α -proteinsubtype, slik som, men ikke begrenset til, transkripsjonell aktivisering av MxA-promoterer eller av en annen promoter som er induserbar
 35

ved IFN α , antiviral aktivitet, evne av SLE-serum til å forårsake differensiering av monocytter til dendrittceller.

De monoklonale antistoffene av oppfinnelsen kan bli generert ved å benytte konvensjonelle hybridomteknikker kjent i fagfeltet og godt beskrevet i litteraturen. For eksempel er en hybridom produsert ved å fusjonere en egnet udødelig cellelinje (f.eks. en myelomcellelinje slik som, men ikke begrenset til, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U397, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/O) eller lignende, eller heteromyelomer, fusjonsprodukter dreav, eller en hver celle eller fusjonscelle derivert derifra, eller en hver annen egnet cellelinje som kjent i fagfeltet (se f.eks. www.atcc.org, www.lifetech.com, og lignende, med antistoffproduserende celler, slik som, men ikke begrenset til, isolert eller klonet milt, perifert blod, lymfe, tonsill eller annen immun eller B-celle inneholdende celler, eller hvilke som helst andre celler uttrykkende tung eller lett kjede konstant eller variabel eller rammeverk eller CDR-sekvenser, enten som endogen eller heterolog nukleinsyre, som rekombinant eller endogen, viral, bakteriell, algal, prokaryot, amfibie, insekt, reptil, fisk, mammalsk, gnager, heste, ovin, geit, sau, primat, eukaryot, genomisk DNA, cDNA, rDNA, mitokondrielt DNA eller RNA, kloroplast DNA eller RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, enkel-, dobbel- eller trippeltrådet, hybridisert, og lignende eller enhver kombinasjon derav. Antistoffproduserende celler kan også bli oppnådd fra det perifere blodet, eller fortrinnsvis milten eller lymfeknutene, fra mennesker eller andre egnede dyr som har blitt immunisert med antigenet av interesse. En hver annen egnet vertscelle kan også bli benyttet for å uttrykke heterolog eller endogen nukleinsyre kodende for et antistoff, spesifisert fragment eller variant derav, av den foreliggende oppfinnelsen. De fusjonerte cellene (hybridomer) eller rekombinante cellene kan bli isolert ved å benytte selektive dyrkningsforhold eller andre egnede kjente fremgangsmåter, og klonet ved begrenset fortynning eller celledatering, eller andre kjente fremgangsmåter.

Andre egnede fremgangsmåter for å produsere eller isolere antistoffer av den påkrevede spesifisiteten kan bli benyttet, inkluderende, men ikke begrenset til, fremgangsmåter som selekterer rekombinant antistoff fra et peptid eller proteinbibliotek (f.eks., men ikke begrenset til, et bakteriofag, ribosom, oligonukleotid, RNA, cDNA, eller lignende, presentasjonsbibliotek; f.eks. som tilgjengelig fra ulike kommersielle leverandører slik som Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, Storbritannia), MorphoSys (Mar-

tinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Skottland, Storbritannia), BioInvent (Lund, Sverige), og Antitope (Cambridge, Storbritannia) ved å benytte fremgangsmåter kjent i fagfeltet. Se U.S. 4,704,692; 5,723,323; 5,763,192; 5,814,476; 5,817,483; 5,824,514; 5,976,862. Alternative fremgangsmåter beror på immunisering av transgene

5 dyr (f.eks. SCID-mus, Nguyen et al. (1977) "Microbiol. Immunol." 41:901-907 (1997); Sandhu et al. (1996) "Crit. Rev. Biotechnol.", 16:95-118; Eren et al. (1998) "Immunol." 93:154-161 som er i stand til å produsere et repertoar av humane antistoffer, som kjent i fagfeltet og/eller som beskrevet her. Slike teknikker inkluderer, men er ikke begrenset til, ribosompresentasjon (Hanes et al. (1997) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 94:4937-

10 4942; Hanes et al. (1998) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 95:14130-14135); enkelcelle-antistoffproduserende teknologier (f.eks. selektert lymfocytantistoffmetode ("SLAM") (U.S. 5,627,052, Wen et al. (1987) "J. Immunol." 17:887-892; Babcook et al. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" (1996) 93:7843-7848); gelmikrodråpe og flowcytometri (Powell et al. (1990) "Biotechnol." 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass.); Gray et

15 al. (1995) "J. Imm. Meth." 182:155-163; Kenny et al. (1995) "Bio/Technol." 13:787-790); B-celleseleksjon (Steenbakkens et al. (1994) "Molec. Biol. Reports" 19:125-134 (1994).

Antistoffvarianter av den foreliggende oppfinnelsen kan også bli preparert ved å benytte

20 levering av et polynukleotid kodende for et antistoff av denne oppfinnelsen til en egnet vert slik som å tilveiebringe transgene dyr eller pattedyr, slik som geiter, kuer, hester, sauer og lignende, som produserer slike antistoffer i deres melk. Disse fremgangsmåtene er kjent i fagfeltet og er beskrevet i f.eks. U.S. 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362 og 5,304,489.

25 Betegnelsen "antistoffvariant" som benyttet her, refererer til posttranslasjonell modifikasjon av lineær polypeptidsekvens av antistoffet eller fragmentet. For eksempel beskriver U.S. 6,602,684 B1 en fremgangsmåte for genereringen av modifiserte glykolformer av antistoffer, inkluderende hele antistoffmolekyler, antistofffragmenter eller fu-

30 sjonsproteiner som inkluderer en region ekvivalent til Fc-regionen av et immunglobulin, som har forsterket Fc-mediert cellulær toksisitet, og glykoproteiner generert på denne måten.

Antistoffvarianter kan også bli preparert ved levering av et polynukleotid av denne opp-

35 finnelsen for å tilveiebringe transgene planter og dyrkede planteceller (f.eks., men ikke begrenset til, tobakk, mais og andemat) som produserer slike antistoffer, spesifiserte

delers eller varianter i plantedelene eller i celler dyrket derfra. For eksempel beskriver Cramer et al. (1999) "Curr. top. Microbiol. Immunol." 240:95-118 og referanser sitert deri, produksjonen av transgene tobakkblader uttrykkende store mengder av rekombinante proteiner, ved å f.eks. benytte en induserbar promoter. Transgen mais har blitt be-
 5 nyttet til å uttrykke mammalske proteiner ved kommersielle produksjonsnivåer, med biologiske aktiviteter ekvivalente til dem produsert i andre rekombinante systemer eller rensset fra naturlige kilder. Se f.eks. Hood et al., "Adv. Exp. Med. Biol." (1999) 464:127-147 og referanser sitert deri. Antistoffvarianter har også blitt produsert i store mengder fra transgene plantefrø inkluderende antistofffragmenter, slik som enkel-
 10 kjedeantistoffer (scFv'er), inkluderende tobakkfrø og potetgroer. Se f.eks. Conrad et al. (1998) "Plant Mol. Biol." 38:101-109 og referanser sitert deri. Antistoffer av den foreliggende oppfinnelsen kan derfor også bli produsert ved å benytte transgene planter, i henhold til kjente fremgangsmåter.

15 Antistoffderivater kan f.eks. bli produsert ved å tilføye eksogene sekvenser for å modifisere immunogenisitet eller redusere, forsterke eller modifisere binding, affinitet, påhastighet, av-hastighet, aviditet, spesifisitet, halveringstid eller enhver annen egenskap. Generelt, er del eller alt av de ikke-humane eller humane CDR-sekvensene opprettholdt mens de ikke-humane sekvensene av de variable og konstante regionene er
 20 erstattet med humane eller andre aminosyrer. Generelt er CDR-restene direkte og mest vesentlig involvert i påvirkning av antigenbinding.

Monoklonale antistoffer produsert i mus (eller i andre ikke-humane dyr) bærer risikoen i terapi om at mennesker kan utvikle antistoffer til dyre-MAb. De humane antistoffene
 25 kan så redusere effektiviteten av dyre-MAb'et og kan også resultere i en allergisk reaksjon. Dette problemet kan bli unngått ved å konstruere antistoffer som ikke er gjenkjent som fremmede. Fremgangsmåter for å konstruere slike antistoffer er godt kjent i fagfeltet, og er ofte basert på poding av CDR-regionen av dyre-MAb'et på en immunglobulinryggrad av en målvert. Den mest alminnelige fremgangsmåten er humanisering, som
 30 kan bli utført ved å pode CDR'ene av et antistoff fra dyr på rammeverket av et humant immunglobulin. I noen tilfeller, er noen få aminosyrerester fra rammeverk av antistoffet fra dyr beholdt for å konservere integriteten av det antigenbindende setet.

Humanisering eller konstruering av antistoffer av den foreliggende oppfinnelsen kan bli
 35 utført ved å benytte enhver kjent fremgangsmåte, slik som, men ikke begrenset til den beskrevet i U.S. 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192,

5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539 og 4,816,567. Fremgangsmåter for antistoffhumanisering basert på computermodellering og variable regioner er kjent for fagpersoner. Se f.eks. Tsurushita et al. (2005) "Humanized Antibodies and their Applications", 36(1):69-83.

5

I en fremgangsmåte for humanisering, i stedet for poding av de fullstendige dyre-CDR'ene til et humant rammeverk, er bare de spesifisitetsbestemmende restene (SDR'er) (de mest kritiske restene av CDR for antistoffligandbindingen) podet på det humane rammeverket (Kashmiri et al. (2005) "Humanized Antibodies and their Applications", 36(1):25-34. I en alternativ fremgangsmåte til humanisering, er humane rammeverksekvenser fra settet av humane kjønnslinjegener valgt basert på den strukturelle likheten av den humane CDR'en til dem av dyre-CDR'en som skal bli humanisert (Hwang et al. (2005) "Humanized Antibodies and their Applications", 36(1):35-41..

10

15

Rammeverksskyfling er en annen fremgangsmåte til humanisering som tillater for identifisering av humane rammeverkskombinasjoner som vil støtte de funksjonelle trekkene av muse- eller andre dyre-CDR'er, uten behovet for rasjonell design eller strukturell informasjon. I denne fremgangsmåten er kombinasjonsmessige Fab-bibliotek laget ved fusjon i leseramme av CDR'ene av et dyre-MAb til samlinger av korresponderende humane rammeverk som inkluderer alle kjente tung- og lett kjedehumane kjønnslinjegener. Fab-bibliotekene kan også bli screenet for antigenbinding. De lette og tunge kjedene av moder-MAb'et kan suksessivt bli humanisert i en ytterligere seleksjonsprosess. Se Dall'Acqua et al. (2005) "Humanized Antibodies and their Applications", 36(1):43-60.

20

25

I en alternativ fremgangsmåte, som har vellykket blitt benyttet for å lage minst et FDA godkjent antistoff for anvendelse i mennesker, kan guidet seleksjon bli benyttet for å lage en serie transisjon fra gnager til humane versjoner av gnagerantistoffer gjennom anvendelsen av et panel av humane antistoffer med lignende egenskaper til det startende gnagerantistoffet, og fag- eller ribosomfremvisning. Se Osbourn et al. (2005) "Humanized Antibodies and their Applications", 36(1):61-68. I denne fremgangsmåten er panelet av humane antistoffer eller V-regioner screenet for binding av et antigen av interesse. Det resulterende antistoffet er fullstendig av human opprinnelse.

30

35

Teknikker for å lage partielle eller fullstendige humane antistoffer er kjent i fagfeltet og en hver slik teknikk kan bli benyttet. I henhold til en utførelsesform, er fullstendig hu-

mane antistoffsekvenser laget i en transgen mus som har blitt konstruert til å uttrykke humane tung- og lettkjedeantistoffgener. Multiple stammer av slike transgene mus har blitt laget som kan produsere forskjellige klasser av antistoffer. B-celler fra transgene mus som produserer et ønskelig antistoff kan bli fusjonert for å lage hybridomcellelinjer for kontinuerlig produksjon av det ønskede antistoffet. (Se f.eks. Russel et al. (2000) "Infection and Immunity", april 2000: 1820-1826; Gallo et al. (2000) "European J. of Immun." 30:534-540; Green (1999) "J. of Immun. Methods", 231:11-23; Yang et al. (1999) "J. of Leukocyte Biology", 66:402-410; Yang (1999) "Cancer Research", 59(6):1236-1243; Jakobovits (1998) "Advanced Drug Delivery Reviews", 31:33-42; L. Green og Jakobovits (1998) "J. Exp. Med." 188(3):483-495; Jakobovits (1998) "Exp. Opin. Invest. Drugs", 7(4):607-614; Tsuda et al. (1997) "Genomics", 42:413-421; Sherman-Gold (1997) "Genetic Engineering News", 17(14); Mendez et al. (1997) "Nature Genetics", 15:146-156; Jakobovits (1996) "WEIR'S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, THE INTEGRATED IMMUNE SYSTEM", bind IV, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) "Current Opinion in Biotechnology", 6:561-566; Mendez et al. (1995) "Genomics", 26:294-307; Jakobovits (1994) "Current Biology", 4(8):761-763; Arbones et al. (1994) "Immunity", 1(4):247-260; Jakobovits (1993) "Nature", 362(6417):255-258; Jakobovits et al. (1993) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 90(6):2551-2555; U.S. patent 6,075,181).

Humane monoklonale antistoffer kan også bli produsert ved en hybridom som inkluderer en B-celle oppnådd fra et transgent ikke-humant dyr, f.eks. en transgen mus, som har et genom inkluderende et humant tungkjedettransgen og et lettkjedettransgen fusjonert til en immortalisert celle. Antistoffene av denne oppfinnelsen kan også bli modifisert for å lage chimere antistoffer. Chimere antistoffer er dem hvor de ulike domenene av antistoffets tunge og lette kjeder er kodet for ved DNA fra mer enn en art. Se f.eks. U.S. 4,816,567.

Et hvert rekombinant antistoff eller antistoffragment derav i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan bli benyttet, så lenge som det kan reagere spesifikt med minst to interferon alfa ("IFN α ") -proteinsubtyper valgt fra gruppen bestående av proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, men nøytraliserer ikke minst en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtype D. Antistoffet kan også nøytralisere IFN α , som målt i kjente biotester, f.eks. er bioaktiviteten aktivering av MxA-promoter eller antiviral aktivitet. Et slikt antistoff er et antistoff som reagerer spesifikt med en eller flere IFN α -

subtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, men ikke subtype D, og inkluderer CDR'er, derivater eller deler derav valgt fra:

- V_H1 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 4;
- 5 V_H2 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 6;
- V_H3 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 8.
- V_L1 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 12;
- V_L2 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 14;
- V_L3 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 16; derivater og kombinasjoner der-
- 10 av.

Antistoffene kan også inkludere antistoffer og/eller antistofffragmenter hvor en eller flere aminosyrer er deletert, tilføyd, substituert og/eller innsatt i disse aminosyresekvensene og som spesifikt reagerer med IFN α -subtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA er også inkludert innenfor rekkevidden av den foreliggende oppfinnelsen.

I den foreliggende oppfinnelsen, refererer en eller flere aminosyredelesjoner, substitusjoner, innsettinger eller tilføyinger i aminosyresekvensen til modifikasjoner og/eller mutasjoner av en eller flere aminosyrer som er deletert, substituert, satt inn og/eller til-

20 føyd ved en eller flere posisjoner i ryggraden av et immunglobulin. Den ene eller flere delesjoner, substitusjoner, innsettinger og/eller tilføyinger kan bli forårsaket i den samme aminosyresekvensen samtidig. Aminosyreresten substituert, innsatt eller tilføyd kan også være naturlig eller ikke-naturlig. Eksempler på de naturlige aminosyrerestene inkluderer L-alanin, L-asparagin, L-asparaginsyre, L-glutamin, L-glutaminsyre, glycin, L-

25 histidin, L-isoleucin, L-leucin, L-lysin, L-metionin, L-fenylalanin, L-prolin, L-serin, L-treonin, L-tryptofan, L-tyrosin, L-valin, L-cystein og lignende.

Eksempler på aminosyrerester som kan bli substituert kan bli funnet i en eller flere av de følgende gruppene, f.eks.:

30 Gruppe A: leucin, isoleucin, norleucin, valin, norvalin, alanin, 2-aminosmørsyre, metionin, O-metylserin, t-butylglycin, t-butylalanin, sykloheksylalanin;

Gruppe B: asparaginsyre, glutaminsyre, isoasparaginsyre, isoglutaminsyre, 2-aminoadipinsyre, 2-aminosuberinsyre;

35

Gruppe C: asparagin, glutamin;

Gruppe D: lysin, arginin, ornitin, 2,4-diaminosmørsyre, 2,3-diaminopropionsyre;

5 Gruppe E: prolin, 3-hydroksyprolin, 4-hydroksyprolin;

Gruppe F: serin, treonin, homoserin; og

Gruppe G: fenylalanin, tyrosin.

10

Betegnelsen "antistoffderivat" inkluderer videre "lineære antistoffer". Prosedyren for å lage lineære antistoffer er kjent i fagfeltet og beskrevet i Zapata et al. (1995) "Protein Eng.", **8** (10):1057-1062. I korthet inkluderer lineære antistoffer et par av tandem Fd-segmenter ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$) som danner et par av antigenbindende regioner. Lineære antistoffer kan være bispesifikke eller monospesifikke.

15

Antistoffene av denne oppfinnelsen kan bli utvunnet og rensset fra rekombinante cellekulturer ved kjente fremgangsmåter inkluderende, men ikke begrenset til, protein A-rensing, ammoniumsulfat- eller etanolpresipitering, syreekstraksjon, anion- eller kationbytterkromatografi, fosfocellulosekromatografi, hydrofob interaksjonskromatografi, affinitetskromatografi, hydroksylapatittkromatografi og lektinkromatografi. Væskeskromatografi med høy yteevne ("HPLC") kan også bli benyttet for rensing.

20

Antistoffer av den foreliggende oppfinnelsen inkluderer naturlig rensede produkter, produkter av kjemiske syntetiske prosedyrer, og produkter produsert ved rekombinante teknikker fra en eukaryot vert, inkluderende f.eks. gjær, høyere plante, insekt- og mammalske celler, eller alternativt fra en prokaryot celle som beskrevet ovenfor.

25

I noen aspekter av denne oppfinnelsen vil det være nyttig å detekterbart eller terapeutisk merke antistoffet. Fremgangsmåter for konjugering av antistoffer til disse midlene er kjent i fagfeltet. For formålet av bare illustrasjon, kan antistoffer bli merket med en detekterbar halvdel slik som et radioaktivt atom, en kromofor, en fluorofores eller lignende. Slike merkede antistoffer kan bli benyttet for diagnostiske teknikker, enten in vivo, eller i en isolert testprøve. Antistoffer kan også f.eks. bli konjugert til et farmasøytisk middel, slik som kjemoterapeutisk medikament eller et toksin. De kan bli forbundet til et cytokin, til en ligand, til et annet antistoff. Egnede midler for kobling til antistoffer for å

30

35

oppnå en anti-tumoreffekt inkluderer cytokiner, slik som interleukin (IL-2) og tumor-nekrosefaktor (TNF); fotosensibiliserende midler, for anvendelse i fotodynamisk terapi, inkluderende aluminium(III)ftalocyanintetrasulfonat, hematoporfyrin og ftalocyanin; radionukleotider, slik som jod-131 (^{131}I), yttrium-90 (^{90}Y), vismut-212 (^{212}Bi), vismut-213 (^{213}Bi), teknetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), renium-186 (^{186}Re) og renium-188 (^{188}Re); antibiotika, slik som doksorubicin, adriamycin, daunorubicin, metotreksat, daunomycin, neokarzinostatin, og karboplatin; bakterielle, plante- og andre toksiner, slik som difteria toksin, pseudomonas eksotoksin A, stafylokokk enterotoksin A, abrin-A-toksin, ricin A (deglykosylert ricin A og nativ ricin A), TGF-alfatoksin, cytotoxin fra kinesisk kobra (naja naja atra), og gelonin (et plantetoksin); ribosominaktiverende proteiner fra planter, bakterier og sopp, slik som restriktocin (et ribosominaktiverende protein produsert ved *Aspergillus restrictus*), saporin (et ribosominaktiverende protein fra *Saponaria officinalis*), og RNase; tyrosinkinaseinhibitorer; ly207702 (et difluorinert purinnukleosid); liposomer inneholdende anti-cystiske midler (f.eks. antisensoligonukleotider, plasmider som koder for toksiner, metotreksat, osv.); og andre antistoffer eller antistoffragmenter, slik som F(ab).

Med hensyn på preparater inneholdende antistoffer kovalent forbundet til organiske molekyler, kan de bli preparert ved å benytte egnede fremgangsmåter, slik som ved reaksjon med et eller flere modifierende midler. Eksempler på slike inkluderer modifierende og aktiverende grupper. Et "modifierende middel" som betegnelsen er benyttet her, refererer til en egnet organiske gruppe (f.eks. hydrofil polymer, en fettsyre, en fettsyrester) som inkluderer en aktiverende gruppe. Spesifikke eksempler på disse er tilveiebragt supra. En "aktiverende gruppe" er en kjemisk halvdel eller funksjonell gruppe som under hensiktsmessige forhold kan reagere med en annen kjemisk gruppe som der ved danner en kovalent binding mellom det modifierende midlet og den andre kjemiske gruppen. Eksempler på slike er elektrofile grupper slik som tosylat, mesylat, halo (klor, brom, fluor, jod), N-hydroksysuksinimidylestere (NHS), og lignende. Aktiverende grupper som kan reagere med tioler inkluderer f.eks. maleimid, jodacetyl, akryloyl, pyridyldisulfider, 5-tiol-2-nitrobenzosyretiol (TNB-tiol), og lignende. En aldehydfunksjonell gruppe kan bli koblet til amin- eller hydrazidinneholdende molekyler, og en azidgruppe kan reagere med en trivalent fosforholdig gruppe for å danne fosforamidat- eller fosforimidforbindelser. Egnede fremgangsmåter for å introdusere aktiverende grupper i molekyler er kjent i fagfeltet (se f.eks. Hermanson (1996) "BIOCONJUGATE TECHNIQUES", Academic Press: San Diego, California). En aktiverende gruppe kan bli bundet direkte til den organiske gruppen (f.eks. hydrofil polymer, fettsyre, fettsyre-

ester), eller gjennom en linkerhalvdel, f.eks. en divalent C₁-C₁₂ gruppe hvor et eller flere karbonatomer kan være erstattet ved et heteroatom slik som oksygen, nitrogen eller svovel. Egnede linkerhalvdeler inkluderer f.eks. tetraetylglykol. Modifiserende midler som inkluderer en linkerhalvdel kan f.eks. bli produsert ved å reagere et mono-Boc-alkyldiamin (f.eks. mono-Boc-etylendiamin, mono-Boc-diaminoheksan) med en fettsyre i nærværet av 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (EDC) for å danne en amidbinding mellom det frie aminet og fettsyrekarboksylatet. Den Boc-beskyttende gruppen kan bli fjernet fra produktet ved behandling med trifluoreddiksyre (TFA) for å eksponere et primært amin som kan bli koblet til et annet karboksylat som ønsket, eller kan bli reagert med maleinsyreanhydrid og det resulterende produktet syklisert for å produsere et aktivert maleimidoderivat av fettsyren.

De modifiserte antistoffene av oppfinnelsen kan bli produsert ved å reagere et humant antistoff eller antigenbindende fragment med et modifiserende middel. For eksempel kan de organiske halvdelene bli bundet til antistoffet på en ikke-setespesifikk måte ved å benytte et aminreaktivt modifiserende middel, f.eks. en NHS-ester av PEG. Modifiserte humane antistoffer eller antigenbindende fragmenter kan også bli preparert ved å redusere disulfidbindinger (f.eks. intrakjededisulfidbindinger) av et antistoff eller antigenbindende fragment. Det reduserte antistoffet eller antigenbindende fragmentet kan så bli reagert med et tiolreaktivt modifiserende middel for å produsere det modifiserte antistoffet av oppfinnelsen. Modifiserte humane antistoffer og antigenbindende fragmenter inkluderende en organisk halvdel som er bundet til spesifikke seter av et antistoff av den foreliggende oppfinnelsen kan bli preparert ved å benytte egnede fremgangsmåter, slik som revers proteolyse. Se generelt, Hermanson (1996) "BIOCONJUGATE TECHNIQUES", Academic Press: San Diego, Calif. (1996).

Fremstilling av isolering av proteiner og polypeptider.

Polypeptider og proteiner er nødvendige komponenter av ulike fremgangsmåter av den oppfinnelsen. Rekombinante antistoffer, varianter, derivater og fragmenter derav kan f.eks. bli oppnådd ved kjemisk syntese ved å benytte en kommersiell tilgjengelig automatisert peptidsyntetisator slik som dem produsert ved Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc., Modell 430A eller 431A, Foster City, CA, USA. Det syntetiserte proteinet eller polypeptidet kan bli presipitert og ytterligere renset, f.eks. ved væskechromatografi med høy yteevne (HPLC). Alternativt, kan proteinene og polypeptidene bli oppnådd ved kjente rekombinante fremgangsmåter som beskrevet her ved å benytte vertscelle og vek-

torsystemene beskrevet ovenfor. De kan også bli preparert ved enzymatisk fordøyning eller kløyving av naturlig forekommende proteiner.

Proteiner og peptider kan bli isolert eller rensset ved standard fremgangsmåter inklude-
 5 rende kromatografi (f.eks. ionebytter-, affinitets- og størrelsesinndelende kolonnekro-
 matografi), sentrifugering, differensiell løselighet, eller ved enhver annen standard tek-
 nikk for proteinrensing. Alternativt, kan affinitetsvedheng slik som hekso-His (Invitro-
 gen), maltosebindende domene (New England Biolabs), influensakappesekvens (Ko-
 lodziej et al., (1991) "Methods Enzymol.", 194:508-509), og glutation-S-transferases
 10 bli festet til peptidene av oppfinnelsen for å tillate enkel rensing ved passering over en
 hensiktsmessig affinitetskolonni. Isolerte peptider kan også bli fysisk karakterisert ved
 å benytte slike teknikker som proteolyse, kjernemagnetisk resonans og røntgenkrystal-
 lografi.

15 Det er godt kjent at modifikasjoner kan bli gjort til et hvert peptid for å tilveiebringe det
 med endrede egenskaper. Peptider for anvendelse i denne oppfinnelsen kan bli modifi-
 sert til å inkludere unaturlige aminosyrer. Peptidene kan derfor inkludere D-aminosyrer,
 en kombinasjon av D- og L-aminosyrer, og ulike "designer"-aminosyrer (f.eks. β -
 metylaminosyrer, C- β -metylaminosyrer og N- α -metylaminosyrer, osv.) for å gi spesielle
 20 le egenskaper til peptider.

I en ytterligere utførelsesform, vil subenheter av peptider som overdrar nyttige kjemiske
 og strukturelle egenskaper bli valgt. Peptider inkluderende D-aminosyrer kan f.eks.
 være resistente for L-aminosyrespesifikke proteaser in vivo. Modifiserte forbindelser
 25 med D-aminosyrer kan bli syntetisert med aminosyrene oppstilt i revers rekkefølge for å
 produsere peptidene av oppfinnelsen som retro-inverso peptider. I tillegg, forestiller den
 foreliggende oppfinnelsen seg å preparere peptider som har bedre definerte strukturelle
 egenskaper, og anvendelsen av peptidettersignere, og peptidettersignende bindinger, slik
 som esterbindinger, for å preparere peptider med nye egenskaper. I en annen utførelses-
 30 form, kan et peptid bli generert som inkorporerer en redusert peptidbinding, dvs. R1-
 CH₂NH-R2, hvor R1, og R2 er aminosyrerester eller sekvenser. En redusert peptidbin-
 ding kan bli introdusert som en dipeptidsubenheter. Et slikt molekyl vil være resistent for
 peptidbindinghydrolyse, f.eks. proteaseaktivitet. Slike molekyler vil tilveiebringe pepti-
 der med unik funksjon og aktivitet, slik som utvidede halveringstider in vivo p.g.a. re-
 sistens for metabolsk nedbrytning eller proteaseaktivitet. Videre, er det godt kjent at i
 35 enkelte systemer viser innskrenkede peptider forsterket funksjonell aktivitet (Hruby

(1982) "Life Sciences", 31:189-199 og Hruby et al. (1990) "Biochem J.", 268:249-262); den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en fremgangsmåte for å produsere et inn-skrenket peptid som inkorporerer tilfeldige sekvenser ved alle andre posisjoner.

5 **Tester for IFN α -biologisk aktivitet. Differensiering av monocytter.**

Genereringen av aktiverte T- og B-lymfocytter krever rekrutteringen og modningen av antigenpresenterende celler ("APC'er"). Disse APC'ene inkluderer B-celler, monocytter/makrofager og dendrittceller. Serumet av SLE-pasienter inneholder IFN α som kan aktivere DC'er og den aktiverte aktiviteten kan bli blokkert med polyklonale eller monoklonale antistoffpreparater. Fremgangsmåter for å detektere og kvantifisere denne aktiviteten er beskrevet i forsknings- og patentlitteraturen (se f.eks. paragrafer 0136 til 10 og med 0150 av patentpublikasjonsnr. U.S. 2004/0067232 A1).

Aktivering av MxA-promoteren.

15 Evnen av IFN α til å aktivere MxA-promoteren, og evnen av de anti-IFN α -monoklonale antistoffene av oppfinnelsen til å blokkere denne aktiveringen kan bli målt ved å benytte reportergentester hvor MxA-promoteren er fusjonert til et reportergen, slik som kloramfenikolacetyltransferase (CAT) eller luciferase (luc), fortrinnsvis luciferase. Tester for CAT og luciferase er kjent for fagpersoner. Fortrinnsvis er aktiviteten av MxA-
20 promoteren målt i A549-celler stabilt transformert med en MxA-promoter/reportergenfusjonskonstruksjon. A549-celler er en lungekarsinomcellelinje tilgjengelig gjennom ATCC (produktnr. CCL-185). MxA (også kjent som Mx1) promoteren kan være human, mus eller rotte. Sekvensen og strukturen av den humane MxA-promoteren er angitt i Genbank anbringningsnr. X55639, Chang et al. (1991)
25 "Arch Virol.", 117:1-15; og Ronni et al. (1998) "J. Interferon Cytokine Res.", 18:773-781. Humane MxA-promoter/luciferasefusjonskonstruksjoner og luciferasetester er angitt i U.S. patentsøknad 20040209800 og Rosmorduc et al. (1999) "J. of Gen. Virol.", 80:1253-1262. Humane MxA-promoter/CAT-fusjonskonstruksjoner og CAT-tester er angitt i Fernandez et al. (2003) "J. Gen. Virol.", 84:2073-2082 og Fray et al. (2001) "J.
30 Immunol. Methods" 249:235-244. Muse-MxA- (Mx1) promoteren er angitt i Genbank anbringningsnr. M21104; Hug et al. (1988) "Mol. Cell. Biol.", 8:3065-3079; og Leonart et al. (1990) "Biotechnology", 8:1263-1267. En muse-MxA-promoter/luciferasefusjonskonstruksjon og en luciferasetest er angitt i Canosi et al. (1996) "J. Immunol. Methods.", 199:69-67.

35

EKSEMPLER

Materialer og fremgangsmåter

Kilder av human IFN α . Rekombinante IFN α -subtypeproteiner ble oppnådd fra PBL Biomedical Laboratories (PBL). Subtypene og spesifikke aktiviteter bestemt ved produsenten inkluderte: IFN α ($3,8 \times 10^8$ U/mg); IFN α 2 ($2,77 \times 10^8$ U/mg); IFN α B2 ($4,63 \times 10^8$ U/mg); IFN α C ($2,31 \times 10^8$ U/mg); IFN α D ($7,5 \times 10^7$ U/mg); IFN α F ($3,6 \times 10^8$ U/mg); IFN α G ($2,33 \times 10^8$ U/mg); IFN α H2 ($1,05 \times 10^8$ U/mg); IFN α I ($1,4 \times 10^8$ U/mg); IFN α J1 ($2,6 \times 10^8$ U/mg); IFN α K ($1,48 \times 10^8$ U/mg); IFN α 1 ($1,4 \times 10^8$ U/mg); IFN α 4a ($2,12 \times 10^8$ U/mg); IFN α 4b ($1,8 \times 10^8$ U/mg); IFN α WA ($2,4 \times 10^8$ U/mg); og IFN β ($8,23 \times 10^7$ U/mg). Leukocytt IFN, ble innkjøpt fra Sigma (I-2396, lott #111K1603).

PBMC-influensasupernatant (PBMC-influenza), som inneholder en kompleks blanding av humane IFN α -subtyper, ble preparert på stedet ved infeksjon av humane PBMC'er fra "buffy coats" med influensa A/PR/8/34 (H1N1) (Charles River Laboratories, Lott #4XPR011022) ved en viral titer på 1 HAU/pDC. Spesifikt, ble PBMC'er (perifere blodmonocytter) høstet fra en human buffy coat ved sentrifugering over Ficoll og samling av den PBMC-inneholdende grenseflaten. FACS-farging/analyse ble utført for å bekrefte nærværet av plasmacytoide DC'er og bestemme deres prosentandel i PBMC'ene og farget med fluorescenskonjugerte antistoffer spesifikke for Lin, CD3, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123, HLA-DR og CD11c (BD Pharmingen). pDC'er ble karakterisert som CD14-negative, CD11c-negative og CD123-positive. Influenzavirusstamløsningen (spesifikk patogenfri fuglemateriale; influensa A/PR/8/34 (H1N1) (kat. #490710; lott # 4XPR011022), endelig HA-titer pr. 0,05 ml; 1:16,777,216; Charles River Laboratories, Connecticut, USA) ble fortynnet til 1 000 HAU/ μ l (hemagglutininenheter pr. μ l) i RPMI-medium (RPMI + 10% FCS + L-glutamin). Volumet av fortynnet virus nødvendig var basert på produksjonen av pDC'er i de rensede PBMC'ene, slik at det var minst en HAU/pDC (dvs. at hver brønn burde inneholde 1×10^6 PBMC'er, og om du har 0,3% pDC'er, vil hver brønn inneholde 3 000 pDC'er. I det tilfellet, vil 4-5 μ l av virus ved 1 000 HAU/ μ l bli tilsatt til hver brønn).

PBMC'er preparert fra buffy coatene ble sentrifugert ved 900 rpm i 10 min. og resuspendert ved 5 000 celler/ μ l (dette vil tilveiebringe 1×10^6 celler pr. brønn i et volum på 200 μ l) i RPMI + 10% FCS + L-glutamin). Cellene pluss influensavirus ble platet i 96-brønners plater med U-bunn, og inkubert ved 37°C + 5% CO₂ i 24 timer. Etter inkubering i 24 timer, dannet cellene en pellet ved bunnen av brønnene og hadde dannet

klynger. Supernatantene ble høstet fra brønnene ved forsiktig pipettering, ved å unngå cellepelletter ved bunnen av brønnene. Supernatanter ble sentrifugert i 50 ml koniske rør ved 900 rpm i 10 min. for å danne pellet av gjenværende celler og andre kulturdebrier. PBMC-influensasupernatanter, inneholdende en kompleks blanding av IFN α , ble sam-

5 let, blandet og lagret ved -80°C i 0,5 ml alikvoter inntil anvendelse.

Cytopatisk effekt (CPE) inhibisjonstest.

CPE-materialer: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) "fullstendig": DMEM med fenol rød + 10% FCS + 2 mM L-glutamin + penicillin + streptomycin + β -2-

10 merkaptoetanol (β -me), 96-brønners celledyrkningsplater med flat bunn, A549-celler (ATCC CCL-185); disse cellene er dyrket i Ham's F12K-medium + 10% FCS + 2 mM L-glutamin + penicillin + streptomycin + 500-800 μ g G418, 1x PBS, 1x trypsin, "Intron A" (IFN α -2b, Schering-Plough) -kontroller, testprøver (SLE-serum, rekombinante IFN α -subtyper) med/uten hybridomsupernatant eller innkjøpt polyklonale/monoklonale

15 antistoffpreparater, EMC-virusstamløsninger (preparert fra det murine encefalomyokardittviruset (EMCV) adaptert til celledyrkning på Vero-cellemonolag; ATCC-produktnummeret for denne virale stamløsningen er VR-129B, og produktnummeret for Vero-celler er CCL-81).

20 Krystallfiolett stamløsning: 1,25 mg NaCl + 3,75 mg krystallfiolett + 775 ml formaldehyd/etanolløsning (som er preparert med 75 ml formaldehyd, 750 ml 95% etanol og 1 500 ml destillert vann) ble omrørt i 20 min., så filtrert gjennom et 0,45 mikron filter og lagret ikke lenger enn 3 måneder. En arbeidsløsning av krystallfiolett ble preparert ved å fortynne stamløsningen 1:10 med formaldehyd/etanolløsningen. Krystallfiolett-

25 løsning ble lagret ved romtemperatur.

CPE-metoder.

Et skjematisk diagram av den cytopatiske effekthinhibisjonstesten (CPE) er vist i figur 1. CPE-tester ble utført i triplikate brønner i 96-brønners plater med flat bunn. For hver

30 testtype var det nyttig å inkorporere positive kontrollbrønner inneholdende intron A (Schering-Plough) -prøver av varierende konsentrasjoner og negative kontrollbrønner inneholdende bare celler + medium. Adherente A549-celler ble høstet fra flasker ved å fjerne dyrkningsmediumet, vaske en gang med PBS, og trypsinering. Trypsinering ble stoppet ved tilsetning av DMEM "fullstendig" til flasken. De trypsinerte cellene ble

35 samlet fra flasken, sentrifugert, resuspendert og tellt. Deres konsentrasjon ble justert til 600 000 celler/ml i fullstendig DMEM. Volumet av brønnene for testen var 150 μ l (før

virustilsetning) og 200 μ l (etter virustilsetning). 50 μ l av volumet var celler, hvorav 15 000 celler (50 μ l av 300 000/ml celsuspensjon) var tilsatt pr. brønn.

Å teste for viral inhibering ved rekombinant IFN α .

- 5 100 μ l av ulike konsentrasjoner av IFN α -løsning (i DMEM fullstendig) ble tilsatt i triplikate brønner. 50 μ l av celler ble tilsatt og inkubert i 5 timer ved 37°C + 5% CO₂. Etter denne tidsperioden, ble 50 μ l av EMC-virus fortynnet 50 ganger fra stamløsning tilsatt og inkubering fortsatt i 48 timer ved 37°C + 5% CO₂.

Å teste for viral inhibering ved SLE-serum.

50 µl (f.eks. ingen fortynning) eller 25 µl (f.eks. 2x fortynning) av SLE-serum ble plassert i triplikate brønner. Volumet ble justert til 100 µl ved tilsetning av DMEM uten FCS (bemerk: hver gang er serumprøver av enhver type tilsatt til brønner ved å benytte denne testen, DMEM uten FCS ble benyttet) og så ble 50 µl av celler tilsatt og inkubert i 4 timer ved 37°C + 5% CO₂. Etter denne tidsperioden, ble 50 µl av EMC-virus fortynnet 50 ganger fra stamløsning (denne konsentrasjonen ble bestemt, for vårt preparat, som den minimale mengden av stamløsning i stand til å drepe alle celler i løpet av 48 timer) tilsatt og inkubering fortsatt i 48 timer ved 37°C + 5% CO₂.

10

Å teste for viral inhibering ved PBMC-influensasupernatanter.

50 µl (f.eks. ingen fortynning) eller seriefortynninger av PBMC-influensasupernatant ble tilsatt i triplikate brønner. Volumet av hver brønn ble justert til 100 µl ved tilsetning av DMEM med FCS, og så ble 50 µl av cellen tilsatt og inkubert i 4 timer ved 37°C + 5% CO₂. Etter denne tidsperioden, ble 50 µl av EMC-virus fortynnet 50 ganger fra stamløsning tilsatt og inkubert fortsatt i 48 timer ved 37°C + 5% CO₂.

15

Å teste for antistoffmediert blokkering av viral inhibering av rekombinant IFNα, SLE-serum, eller PBMC-influensasupernatanter ved å benytte kommersielt tilgjengelige

20 Ab'er, museserum eller fusjonssupernatanter, 50 µl av hver: (i) DMEM uten FCS inneholdende kommersielle polyklonale eller monoklonale Ab-preparater; (ii) 50 µl av museserum; eller (iii) 50 µl av hybridomsupernatant ble tilsatt for å bringe det totale volumet av hver brønn ved dette punktet til 100 µl. Platene ble inkubert i 1,5 til 2 timer ved 37°C + 5% CO₂. 50 µl av celler ble tilsatt til hver brønn og inkubert i 5 timer ved 37°C + 5% CO₂. Etter denne tidsperioden ble 50 µl av EMC-virus fortynnet 50 ganger fra stamløsning tilsatt og inkubering ble fortsatt i 48 timer ved 37°C + 5% CO₂.

25

Etter 48 timers inkuberingsperiode i CPE-testene ovenfor, ble alt medium forsiktig fjernet fra brønnene ved å benytte en multikanalpipette. 50 µl av krystallfiolett ble tilsatt og tillatt å farge i 4-6 min. Krystallfiolett ble forsiktig fjernet og 200 µl av destillert vann ble tilsatt og øyeblikkelig fjernet. Platene ble tillatt å tørke i minst 30 min., og så lest på en ELISA-plateleser ved en OD på 570 nm.

30

For å oppnå prosentandelen av blokkering (basert på evnen av det inkluderte kontrollantistoffet eller antistoffet i hybridomsupernatantene til å inhibere IFNα-mediert beskyttelse mot celledød), ble dataene normalisert i konteksten av den "negative kontrol-

35

len" (IFN α rekombinant, SLE-serum eller PBMC-influensasupernatant + celler + virus) til å være 100% viabilitet (+% celledød) og den "positive kontrollen" (bare celler + virus) til å være 0% viabilitet (100% celledød) ved å benytte Prism 4.0 for Macintosh, versjon 4.0A programvare (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) og Normalize-
 5 algoritmen for å justere alle verdiene til prosentandeler i henhold til kontrollene.

Reportergen (RG) -test.

RG-materialer. Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), uten fenolrød eller
 10 supplementer; Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) "fullstendig": DMEM med fenolrød + 10% FCS + 2 mM L-glutamin + penicillin + streptomycin + 2-me (β -me); Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) preparert til å inneholde alt listet opp ovenfor med unntak av FCS; ViewPlate-96, hvite, celledyrkningsbehandlete (PerkinElmer Life Sciences); 93D7-celler (A549 transfektert til å uttrykke luciferase styrt ved type I IFNinduserbar MxA-promoter); disse cellene er dyrket i Ham's F12K-
 15 medium + 10% FCS + 2 mM L-glutamin + penicillin + streptomycin + 500-800 μ g G418; 1x PBS; 1x trypsin; "intron A" (IFN α 2b, Schering-Plough) -kontroller; testprøver (SLE-serum, rekombinante IFN α -subtyper) med/uten hybridomsupernatant eller innkjøpte polyklonale/monoklonale antistoffpreparater; Britelite™ luminiscensreporter-gentestkitt (PerkinElmer Life Sciences).

20

Fremgangsmåter for RG.

En luciferasebasert reportergentest ble benyttet for å evaluere evnen av anti-IFN α MAb'ene til å nøytralisere bioaktiviteten av rekombinante IFN α -subtyper, leukocyt IFN og PBMC-influensa. Et skjematisk diagram av RG-testen er vist i figur 1. 93D7-
 25 cellelinjen, som ble derivert ved stabil transfeksjon av A549-cellelinjen (CLL-185, ATCC) med en IFNinduserbar konstruksjon (MxA-promoter/luciferasefusjon) ble vennlig tilveiebragt ved Dr. Guenther Adolf (Boehringer-Ingelheim GmbH, Østerrike). MxA-promoter/luc-fusjonsvektoren inkluderer et 1,6 Kb BamHI-fragment inneholdende den murine MxA-promoter og IFNresponselementer kuttet ut fra pSP64-Mxp(PstI-PvuII)-rβglo (Leonart et al. (1990) "Biotechnology", 8:1263-1267) og satt inn opp-
 30 strøm for en luciferasekodende sekvens.

RG-tester ble utført i triplikate brønner i opake 96-brønners plater med flat bunn (ViewPlates™, hvite vegger, klar bunn; PerkinElmer). For hver testtype, er det foret-
 35 rukket å inkorporere positive kontrollbrønner inneholdende intron A (Schering-Plough)

-prøver av varierende konsentrasjoner og negative kontrollbrønner inneholdende bare celler + medium.

Spesifikt, ble adherente 93D7-celler høstet fra flasker ved å fjerne dyrkningsmediumet, vaske en gang med PBS og trypsinering. Trypsinering ble stoppet ved tilsetning av DMEM "fullstendig" til flasken. Cellene ble samlet fra flasken, sentrifugert, resuspendert og tellt. Deres konsentrasjon ble justert til 600 000/ml i fullstendig DMEM.

Serum fra immuniserte mus, hybridomsupernatanter eller rensede anti-IFN α -MAb'er ble preinkubert med rekombinante IFNsubtyper, leukocyt-IFN eller PBMC-influensa i 100 μ l/brønnvolumer i 1,5 timer ved 37°C + 5% CO₂, hvorefter 93D7-celler (50 μ l av 600 000/ml celsuspensjonen = 30 000 celler) ble tilsatt pr. brønn og inkubering ble fortsatt i ytterligere 5 timer. Det endelige volumet av brønnene for testen var 150 μ l. Tester ble så fremkalt ved å benytte Britelite™-luminiscensreportergensystemet (PerkinElmer) og lest på en Wallac Microbeta Trilux™-scintillasjons- og luminiscensteller innenfor 15 minutter av tilsetning av substratet.

Å teste for MxA-induksjon ved rekombinant IFN α .

Konsentrasjonen av en løsning (i DMEM fullstendig) av IFN α ble justert til å inneholde mengden som skulle bli plassert i hver brønn i 100 μ l. 100 μ l av IFN α ble plassert i triplikate brønner og så ble 50 μ l av celler tilsatt og inkubert i 5 timer ved 37°C + 5% CO₂.

Å teste for MxA-induksjon ved SLE-serum.

50 μ l (f.eks. ingen fortynning) eller 25 μ l (f.eks. 2x fortynning) av SLE-serum ble plassert i triplikate brønner. Volumet/brønnen ble så justert til 100 μ l ved tilsetning av DMEM uten FCS (bemerk: hver gang er serumprøver av enhver type tilsatt til brønner ved å benytte denne testen, DMEM uten FCS vil bli benyttet) og så ble 50 μ l av celler tilsatt og inkubert i 5 timer ved 37°C + 5% CO₂.

Å teste for blokkering av MxA-induksjon ved PBMC-influensasupernatanten.

50 μ l (f.eks. ingen fortynning) eller seriefortynninger av PBMC-influensasupernatant ble plassert i triplikate brønner. Volumet av hver brønn ble så justert til 100 μ l ved tilsetning av DMEM uten FCS, etterfulgt ved tilsetning av 50 μ l av celler og inkubering i 5 timer ved 37°C + 5% CO₂.

Å teste for blokkering av MxA-induksjon ved rekombinant IFN α , SLE-serum eller PBMC-influensasupernatanter ved å benytte kommersielt tilgjengelige Ab'er, muse-serum eller fusjonssupernatanter.

50 μ l av en ønsket fortynning av rekombinant IFN α , SLE-serum eller PBMC-influensa
 5 ble tilsatt pr. brønn. 50 μ l av enten: (i) DMEM uten FCS inneholdende kommersielle
 polyklonale eller monoklonale antistoffpreparater; (ii) 50 μ l av museserum; eller (iii) 50
 μ l av hybridomsupernatant ble så tilsatt til hver brønn for å bringe det totale volumet av
 hver brønn til 100 μ l. Platene ble inkubert i 1,5 timer ved 37°C + 5% CO₂. Etter denne
 tiden, ble 50 μ l av celler tilsatt og inkubering fortsatt i 5 timer ved 37°C + 5% CO₂.

10

Britelite™-kittreagens/fremkallingsreagenser (substratrør, substratbuffer, ufarget
 DMEM) ble satt ved romtemperatur 40 minutter før testfremkalling. Ved 30 min. før
 fremkalling ble testplatene plassert ved romtemperatur. Ved 10 min. før fremkalling, ble
 det lyofiliserte substratet rekondisjonert med buffer (10 ml pr. rør).

15

Etter den 5 timer lange inkuberingsperioden, ble alt medium forsiktig fjernet fra brøn-
 nene ved å benytte en multikanalspipette. Videre ble en klebende hvit blokkerende plate
 fiksert til bunnen av ViewPlate™. 90 μ l av DMEM (uten fenolrød) ble tilsatt pr. brønn.
 90 μ l av rekondisjonert Britelite™-reagens ble tilsatt til hver brønn, ved å forvisse seg
 20 om å pipettere opp og ned to ganger (men uten å verken sprute brønninnholdene til si-
 dene av brønnene eller lage luftbobler) for grundig å blande reagensene og mediumet.
 Dette ble utført så raskt, men så presist som mulig. Platen ble forseglet med en klar kle-
 bende forseglende remse. Innenfor et spenn på mer enn 1 min., men ikke mer enn 15
 min., ble luminiscensintensiteten av platen(e) lest ved å benytte Wallac Microbeta
 25 Trilux™.

For å oppnå prosentandelen av blokkering (basert på evnen av det inkluderte kontrollan-
 tistoffet eller antistoffet i hybridomsupernatantene til å oppheve MxA-
 luciferaseinduksjon), ble data normalisert i konteksten av den "positive kontrollen"
 30 (IFN α -rekombinant, SLE-serum eller PBMC-influensasupernatant + celler) til å være
 100% IFN α -aktivitet og den "negative kontrollen" (bare celler i medium) til å være 0%
 IFN α -aktivitet, ved å benytte programvaren Prism (GraphPad Software, Inc., San Die-
 go, CA) og Normalize-algoritmen for å justere alle verdiene til prosentandeler i henhold
 til kontrollen.

35

Eksempel 1: Immunisering og seleksjon av monoklonale antistoffcellelinjer.

Et flyskjema av IFN α MAb-utviklingsskjema er vist i figur 2. Grupper på 6-8 uker gamle Balb/c-hunnmus (Harlan) ble immunisert med 5-10 μ g hver naturlig leukocyt IFN α (I-2396, Lott #111K1603, Sigma) og/eller en cocktail av rekombinante proteiner (5-10 μ g hver av de tre rekombinante IFN α -subtypene A, B2 og F (oppnådd fra PBL Bio-medical Laboratories ("PBL")) i MPL $\text{\textcircled{R}}$ + TDM-emulsjon (Sigma #M6536) ved to til tre ukers intervaller i henhold til planene indikert i tabell 1 nedenfor. MPL $\text{\textcircled{R}}$ + TDM-emulsjonen er et Ribi-adjuvantsystem bestående av monofosforyl-lipid A (MPL: detoxifisert endotoksin fra S. Minnesota) og trehalosedikorynomykolat (TDM) i en 2% olje (squalen)-Tween 80-vannemulsjon. Antigen ble administrert via intraperitoneale (i.p.) eller subkutane (s.c.) ruter. Pre-fusjonsscreening av serum samlet fra musene ble gjort ved tre titere (1:200, 1:2 000 og 1:20 000) ved å benytte reporter-gen (RG) -testen, basert på et MxA-luciferasefusjonsprotein via aktivisering av type I IFNreseptoren, for å detektere blokkering av IFN α -bioaktivitet. Serum ble samlet fra musene via retroorbital blødning 7 dager etter den tredje påfyllingen og screenet for nøytralisering av PBMC-influensabioaktivitet ved å benytte reporter-gen (RG) -testen beskrevet ovenfor. Mus som viste titere på minst 1:2000 for $\geq 50\%$ nøytralisering, ble latt hvile i 4 uker og så gitt en endelig påfylling (enten i.v. eller i.p.) av 2,5 μ g leukocyt-IFN før splenocytffusjon med den murine myelomen Sp2/0-Ag14 (CRL-8287, ATCC) tre dager senere. Fusjoner ble utført i 50% PEG 1500 (Roche), og 1x HAT-supplement (Sigma) i DMEM + 15% FCS ble benyttet for hybridomseleksjon. Dyrkningssupernatanter ble screenet 10-14 dager senere for nøytralisering av PBMC-influensa. Basert på MxA/luc-reporter-gen (RG) -biotesten, beskrevet ovenfor, av musene immunisert, var 17 i stand til å nøytralisere PBMC-influensasupernatanten ved minst 50% ved titere på 1:200, blant disse kunne 14 nøytralisere ved $\geq 50\%$ ved 1:2 000 fortynninger, og 3 fortsatte å nøytralisere ved titere opp til 1:20 000.

Tabell 1. Immunisering og seleksjon av monoklonale antistoffcellelinjer

	Protokoll 1 Balb/c-mus	Protokoll 2 Balb/c-mus	Protokoll 3 Balb/c-mus	Protokoll 4 B6-mus	Protokoll 5 B6-mus
Initiering	Ved dag 0 10 µg naturlig IFNα 5 mus i.p. 5 mus s.c.	Ved dag 0 10 µg IFNα A, B2 og F 5 mus i.p. 5 mus s.c.	Ved dag 0 5 µg naturlig IFNα, delt i.p. og s.c. 3 grupper av 4 mus (mottok adeno-mIFNα ved dag -2, +2 eller 1. påfylling)	Ved dag 0 2,5 µg IFNα F 5 mus i.p. 2,5 µg IFNα F og B2 5 mus i.p.	Ved dag 0 4 µg IFNα B2 5 mus i.p.
1. påfylling	Ved 2 uker 5 µg naturlig IFNα 5 mus i.p. 5 mus s.c.	Ved 2 uker 5 µg IFNα A, B2 og F 5 mus i.p. 5 mus s.c.	Ved 2 uker 2,5 µg naturlig IFNα, delt i.p. og s.c.	Ved 2 uker 2 µg IFNα F, 5 mus i.p. 2 µg IFNα F og B2 5 mus i.p.	Ved 1,5 uker 2 µg IFNα A 5 mus i.p.
2. påfylling	Ved 5 uker 5 µg naturlig IFNα 5 mus i.p. 5 mus s.c.	Ved 5 uker 5 µg IFNα A, B2 og F 5 mus i.p. 5 mus s.c.	Ved 5 uker 1,5 µg naturlig IFNα, delt i.p. og s.c.	Ved 5 uker 4 µg IFNα F 5 mus i.p. 4 µg IFNα F og B2 5 mus i.p.	Ved 4 uker 2 µg IFNα F 5 mus i.p.
3. påfylling	Ved 10,5 uker 2,5 µg naturlig IFNα Alle mus i.p.	Ved 9 uker 2 µg IFNα A, B2 og F Alle mus i.p.	Ved 8,5 uker 2 µg naturlig IFNα, i.p.	Ved 7 uker 2 µg IFNα F 5 mus i.p. 2 µg IFNα F og B2 5 mus i.p.	N/A
4. påfylling	Ved 16,5 uker 2 µg naturlig IFNα Alle mus i.p.	Ved 13,5 uker 2,5 µg naturlig IFNα Alle mus i.p.	N/A	Ved 9 uker 2,5 µg IFNα A Alle mus i.p.	N/A

Bemerk: Mus fra prokoller 1, 2 og 3 ble benyttet for å lage fusjoner 1 til og med 6. Fusjonene ble utført ved å samle cellene fra 2-3 mus i et protokoll. To mus (initielt immunisert med IFNα F i protokoll 6 ble samlet for å lage fusjon 8). I protokoll 5, ble to mus samlet for å lage fusjon 7, og tre ble samlet for å lage fusjon 9.

Produksjon og rensing av monoklonale antistoffer.

Som beskrevet ovenfor, ble mus identifisert som kandidater for fusjon basert på evnen av deres serum til å nøytralisere den komplekse blandingen av IFN α -subtyper tilstede i PBMC-influensa. En serie på 8 fusjoner ble utført med splenocytter høstet fra mus med

5 akseptable serumtitere. Splenocytter ble fusjonert med den sp2/0-Ag14-murine myelomcellelinjen (ATCC-nummer, CRL-1581, som ble valgt siden det ikke er i stand til å uttrykke endogent deriverte Ig-kjeder), platet i 96-brønners celledyrkningsplater med flat bunn og inkubert i 12-15 dager før screening av supernatanter for å detektere en polyklonal antistoffrespons via RG-testprotokollen beskrevet ovenfor. Spesifikt ble

10 serumprøver fra de immuniserte musene preinkubert med supernatant fra influensainfisert PBMC i 1 time ved 37°C, hvorefter 93D7-cellene ble tilsatt for ytterligere 5 timer. Etter 5 timer ble tester fremkalt og lest på en luminiscensteller. En oppsummering av de første 8 fusjonene er vist i tabell 2 nedenfor. Supernatanter fra de 8 fusjonene ble screenet for 3 911 primære brønner, og åtte kandidater (ACO-1 til og med 8), hver isolert fra

15 fusjon 4, ble identifisert basert på deres kapasiteter til å konsistent demonstrere noen synlig reduksjon i PBMC-influensa (fortynnet 640 ganger) mediert aktivering av MxA/luc-produksjon i RG-biotesten beskrevet her. Hybridomcellelinjer ble subklonet ved begrenset fortynning. Hybridomer produserende anti-IFN α MAb'er ble adaptert til vekst i Gibco PFHM-II (Invitrogen) og dyrket i Integra CELLline-flasker (Becton Dickinson). Supernatanter ble samlet fra celleavlukkene hver 5-7 dager og frosset ved -80°C. MAb'ene ble så rensert fra 50 ml batcher av supernatant via FPLC over protein A-

20 kolonner etterfulgt ved dialyse i PBS. De rensede MAb'ene ble alikvotert og lagret ved -80°C. ACO-1, 2, 3, 4, 5, og 8 ble isotypet ved ELISA som IgG2a (ACO-1), IgG2b (ACO-2) og IgG1 (ACO-3, 4, 5, 6 og 8). Alle disse kandidatene derivert fra fusjoner av

25 splenocytter fra mus initielt immunisert med leukocyt-IFN eller en blanding av IFN α A, B2 og F rekombinante proteiner etterfulgt ved en prefusjonspåfylling med leukocyt-IFN; fusjoner utført fra mus administrert bare rekombinant IFN α -subtyper sviktet i å gi noen kandidater i stand til å nøytralisere PBMC-influensa.

Tabell 2. Oppsummering av fusjoner

Fusjon	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
Screenet	435	1644	560	396	136	217	191	332	3911
Selektert	12	66	2	25	0	29	5	15	154
Subklonet	3	13	0	8	0	2	0	0	26
Kandidater	0	0	0	6	0	2	0	0	8

Eksempel 2. Nøytralisering av kommersielt tilgjengelig leukocytt IFN α eller PBMC-influensasupernatantbioaktivitet ved ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4 og ACO-5.

Anti-IFN α -MAB'ene som er vist til å sterkt binde og nøytralisere minst en IFN α -subtype ble valgt til å undersøke deres evne til å nøytralisere naturlig-deriverte IFNpreparater, som er kjent til å inneholde et bredt utvalg av IFN α -subtyper. For disse studiene, ble ACO-1 til og med 5 titrert i RG-biotesten mot både kommersielt tilgjengelig leukocytt IFN og PBMC-influensasupernatant preparert som beskrevet ovenfor. ACO-1, 2 og 3 blokkerte leukocytt-IFNbioaktivitet ved minst 50% ved alle tre MAB-mengder testet (200, 20 og 2 ng) (figur 3a); ACO-4 oppnådde litt mer enn 50% nøytralisering bare når 200 ng ble testet. I sammenligning, virket ACO-5 dårlig mot leukocytt-IFN, ved å maksimalt blokkere mindre enn 10% av testsignalet.

Komparativ inhibering av ulike fortynninger av PBMC-influensasupernatant ved definerte konsentrasjoner av de monoklonale antistoffene ble utført ved å benytte RG-testen beskrevet ovenfor. Den absolutte konsentrasjonen av IFN α i influensa/PBMC-supernatanten er ukjent, så bare relativ nøytraliserende kapasitet er bestemt i denne studien. Når fem MAB'er ble titrert (2 000, 200, 20 og 2 ng) mot PBMC-influensa, var imidlertid ACO-5 i stand til å nøytralisere bioaktivitet ved minst 50% ved alle, unntatt de laveste antistoffmengdene testet (figur 3b). ACO-1 viste den største kraften når testet på PBMC-influensa, ved å blokkere minst 50% ved alle fire titrerte MAB-mengder. Variansen i nøytralisering av leukocytt-IFN og PBMC-influensa ved ACO-5 kan trolig tilskrives forskjellige IFN α -subtyper og/eller deres relative konsentrasjoner tilstede i de to separate IFNkildene benyttet i våre tester.

Eksempel 3. Inhibering av rekombinant IFN α -subtypebioaktivitet ved ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5, ACO-6 og ACO-8.

De IFN α -nøytraliserende kandidatene ACO-1 til og med 6 og ACO-8 ble screenet ved både RG-testen så vel som den tradisjonelle cytopatiske effekt (CPE) inhiberingstesten

for nøytralisering av 15 rekombinante IFN α -subtyper så vel som for nøytralisering av IFN β . Rekombinante IFN α -subtypeproteiner ble oppnådd fra PBL Biomedical Laboratories (Piscataway, NJ); info@interferonsource.com, heretter "PBL"). De spesifikke aktivitetene, som bestemt ved produsenten, er vist i tabell 3.

5

Tabell 3. Rekombinante humane IFN α -subtyper benyttet i antistoffkarakteriseringene

IFN α -protein-subtype (gen)	Spesifikk aktivitet (U/mg)	Produkt # (PBL)	Lott # (PBL)	RG _{maks} enheter	RG-platå (pg av IFN)	RG midtre (pg av IFN)	CPE-platå (pg av IFN)	CPE midtre (pg av IFN)
A (2a)	3,8x10 ⁸	11100-1	2167	47,5	125	62,5	50	25
2 (2b)	2,77x10 ⁸	11105-1	2122	8,31	30	15	25	12,5
B2 (8)	4,63x10 ⁸	11115-1	2168	3,7	8	5	5	2,5
C (10)	2,31x10 ⁸	11120-1	2118	3,47	15	4	5	2,5
D [Val ¹¹⁴] (1)	7,5x10 ⁷	11125-1	2403	150	2000	750	750	375
F (21)	3,6x10 ⁸	11130-9	2169	72	200	62,5	25	12,5
G (5)	2,33x10 ⁸	11135-1	2104	116,5	500	62,5	50	25
H2 (14)	1,05x10 ⁸	11145-1	2528	131,25	1250	200	25	12,5
I (17)	1,4x10 ⁸	11150-1	1770	8,75	62,5	15	10	5
J1 (7)	2,6x10 ⁸	11160-1	2105	260	1000	200	20	10
K (6)	1,48x10 ⁸	11165-1	1359	92,5	62,5	155	25	12,5
1 [Ala ¹¹⁴] (D)	1,4 x 10 ⁸	11175-1	2106	17,5	125	15	200	100
4a (4a)	2,12x10 ⁸	11177-1	2180	10	10	2	25	12,5
4b (4b)	1,8x10 ⁸	11180-1	1424	45	250	31	100	50
WA	2,4x10 ⁸	11190-1	2107	30	125	15	25	12,5
IFN β	8,23x10 ⁷		2558	6,56				

- 10 De nøytraliserende enhetene (U) tilveiebragt ved produsenten har blitt fastsatt via en test som måler evnen av de gitte subtypene til å nøytralisere 50% (identifisert som 1 U/ml) av den cytopatiske effekten produsert ved vesikulært stomatittvirus på bovine MDBK-

celler. Gitt at IFN α -potenser i biotester er påvirket ved tallrike variabler (inkluderende testtype, individuelt preparerte batcher og mindre teknikkvariasjoner fra et laboratorie til et annet), så vel som det faktum at internasjonalt erkjente standarder for hver subtype er utilgjengelig, ble enkle lottnummere konsistent benyttet i disse studiene. U definert av produsenten av hver rekombinant som vil gi maksimal respons i RG-biotesten (RG_{maks}) ble bestemt. Renset ACO-1, 2, 3, 4, 5, 6 og 8 ble så titrert i nærvær av disse IFN α -subtypemengdene i RG-biotesten. IFN β (spesifikk aktivitet = $8,23 \times 10^7$ U/mg) ble oppnådd fra PBL.

Representative RG-biotestdata for titreringen av ACO-1 mot RG_{maks}-verdiene av de femten IFN α -subtypene er vist i figur 4a. Som beskrevet i tegnforklaringen, ble numeriske verdier fastsatt for hver ACO-1-titrering mot de angitte subtypene basert på EC₅₀-verdier bestemt for hver. ACO-1 var ikke i stand til å nøytralisere verken IFN α D eller IFN α 1, imens de andre tretten subtypene kunne bli nøytralisert ved ulike anti-stoffkonsentrasjoner. EC₅₀-resultatene i ng/ml for alle ACO-1, 2, 3, 4, 5 og 8 IFN α -nøytraliserende MAb'er er tilveiebragt i tabell 4. Prosentandelen nøytralisering er vist i tabell 5. Følgelig, viste ACO-1 og 2 seg å være like i deres kapasiteter til å nøytralisere tolv subtyper (IFN α A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, 4a, 4b og WA) ved konsentrasjoner på mindre enn 300 ng/ml av antistoff; ACO-1 nøytraliserte også IFN α K i denne utstrekningen, selv om ACO-2 ikke gjorde det. ACO-3 og 4 nøytraliserte hhv. ni (IFN α A, 2, B2, C, I, J1, K, 4a og WA) og seks (IFN α A, 2, B2, C, I, J1 og 4a) subtyper med mindre enn 300 ng/ml. ACO-8 nøytraliserte fire subtyper (IFN α 2, 1, 4a og 4b) gitt begrensningen for antistoffkonsentrasjon, imens ACO-5 sterkt nøytraliserte bare tre (IFN α A, 2 og WA). Ingen av MAb'ene var i stand til å nøytralisere IFN β (figur 4b).

Tabell 4. Nøytralisering av rekombinante IFN α -subtyper ved ACO-1, 2, 3, 4, 5 og 8 (EC₅₀ ng/ml).

IFN α -subtype	ACO-1	ACO-2	ACO-3	ACO-4	ACO-5	ACO-8
A	23,15	64,17	4,82	23,57	3,61	335,5
2	16,52	38,57	0,31	19,21	0,23	180,4
B2	8,09	6,09	1,01	172,3	-	308,2
C	0,56	2,19	3,22	152	539,3	-
D	-	-	-	-	-	373
F	145,8	54,05	-	-	704,7	349,8
G	27,07	43,29	-	-	465,8	-

H2	153,3	123,7	637,1	-	604,7	-
I	13,5	8,4	6,32	147,1	528,1	342,6
J1	168,3	212,6	206,6	-	646,5	488
K	235,2	352,9	239,5	475,3	444,8	-
1	-	-	-	-	576,7	211,1
4a	2,11	5,6	0,04	55,59	597,6	134,4
4b	5,43	7,27	-	-	669,9	271,8
WA	84,85	106,8	250,4	-	140,5	-

Tabell 5. Prosentandel nøytralisering av RG_{maks} IFNmengder ved 2 µg/ml av anti-stoff

IFNα-subtype	ACO-1	ACO-2	ACO-3	ACO-4	ACO-5	ACO-8
A	93,6	89,4	86,7	59,5	92,7	73,1
2	90,3	88	88,8	85,3	95,8	77,6
B2	87	87,5	87	75,2	29,2	77
C	91,4	92,9	85,8	70,9	28,4	30,5
D	12,5	20,8	0	8,2	30,4	42
F	83,7	88	0	1	24,9	55,2
G	92,7	95	0	0	59,6	37,3
H2	77,5	87	22,6	6,5	16,5	25,4
I	87,1	93,3	79,6	46,7	58,9	68,5
J1	83,9	81,9	45,2	2,9	20,5	31,8
K	77,9	71,2	60	12,9	53	25,2
1	0	13,5	1	5,1	46,7	75,7
4a	67,8	67,4	64	58,3	31,6	71,3
4b	93,7	92,4	9	4,8	24,2	63,2
WA	89,9	84	55,5	5,4	85,2	14,3
IFNβ	9	0	6,5	1	0	0

5

CPE-testen ble satt opp lignende RG-testen uten utransfektet A549-celler (ATCC nummer CCL-185, en human lungekarcinomcellelinje): tester ble utført i standard 96-brønners celledyrkningsplater med flat bunn. Etter preinkubering (1 time ved 37°C) av antistoffer med IFNα-subtypene og tilsetning av celler 5 timer senere, ble museencefalomyokardittvirus (EMCV) tilsatt og cellene ble inkubert i 48 timer før farging med

10

krystallfiolett for bestemmelse av gjenværende levende celler. For både RG- og CPE-testene ble mengdene av hver IFN α -subtype benyttet bestemt via titreringer på forhånd av de rekombinante IFN α -proteinene for å gi enten maksimal MxA-luciferaseinduksjon (RG) eller beskyttelse fra celledød (CPE) i testen. Dataene vist i tabell 6 representerer prosentandelen av blokkert bioaktivitet demonstrert ved hvert ACO-monoklonalt anti-stoff mot de respektive IFN α -subtypene (korresponderende gener kodende for subtype-
 5 ne er indikert i parenteser) i CPE-testen. For CPE-testen ble mengdene av hver IFN α -subtype benyttet bestemt via titreringer på forhånd av de rekombinante IFN α -proteinene for å gi enten maksimal beskyttelse fra celledød (CPE). N/D = ikke bestemt. Som vist,
 10 er ACO-1 og ACO-2 i stand til å blokkere det største antallet av IFN α -subtyper ved nivåer på 90% under testforholdene, imens ACO-6 er den mest begrensede. I de fleste tilfellene, korrelerer resultatene av RG- og CPE-testene med hverandre.

Tabell 6. Prosentandel nøytralisering av IFN α -subtypeaktivitet ved MAb'er i CPE-testen

IFN α -subtype	ACO-1	ACO-2	ACO-3	ACO-4	ACO-5	ACO-8
A (2a)	95,7	81,4	93,9	94,6	90,0	0,0
2 (2b)	80,1	75,8	96,6	92,4	93,9	0,0
B2 (8)	98,8	98,6	96,4	49,6	13,0	0,0
C (10)	99,4	98,2	92,1	65,1	21,9	0,0
D (1)	33,0	38,5	0,0	11,3	0,0	0,0
F (21)	96,6	95,4	0,0	23,5	34,5	0,0
G (5)	99,0	97,4	0,0	0,0	80,8	0,0
H2 (14)	95,9	98,3	92,6	90,7	78,9	0,0
I (17)	98,0	99,8	95,0	85,1	56,2	0,0
J1 (7)	98,1	97,3	92,8	47,1	61,1	0,0
K (6)	98,3	97,3	92,8	47,1	61,1	0,0
4a (4a)	82,9	83,6	81,3	N/D	0,0	0,0
4b (4b)	98,7	96,7	0,0	0,0	53,7	0,0
WA (16)	88,7	94,6	91,0	N/D	100	0,0
1 (1)	16,7	22,9	15,9	11,9	64,3	0,0
IFNα	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Eksempel 4. Multipleksanalyse av ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5 og ACO-6

Multipleksanalyse ble utført for å bestemme hvorvidt rommessige distinkte bindingsdomener var involvert. ACO-antistoffene ble analysert kombinasjonsmessig for deres evne til å samtidig binde IFN α -A med multipleksanalyse på et Luminex™ 100-system. Kuler koblet med umerkede ACO-antistoffer (pågriper) ble inkubert med rekombinant IFN α -A ved konsentrasjonen indikert og så eksponert for PE-merkede ACO-antistoffer (reporter). Denne undersøkelsen viste at ACO-5 kan danne multipleks med enhver av ACO'er -1, -2, -3 og -4 (se lett skygging i figur 5). Multipleksing forekommer ytterligere når ACO-4 er benyttet som et pågripende antistoff og ACO-3 et reporterantistoff. Følgelig binder ACO-5 et rommessig distinkt domene av IFN α -A enn det bundet ved ACO-1, -2, -3 og -4. På lignende måte, binder ACO-3 og ACO-4 rommessig distinkte domener av IFN α -A. Resultater med ACO-6 var negative i alle tilfeller.

Eksempel 5. Affinitetsbestemmelser for ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5 og ACO-6

Kinetisk analyse av ACO-antistoffene mot IFN α -A ble utført ved å benytte Biacore 2000 og 3000 optiske biosensorer utstyrt med CM5-sensorship og ekvilibrert med 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% P20, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,4 ved 25°C. For av ACO'er 1 til og med 6, ble antistoffer først bufferutvekslet fra Tris-glycinbuffer til 10 mM natriumacetatbuffer, pH 5,0 ved å benytte en rask avsaltingskolonne og så immobilisert på tre strømningscelleoverflater ved å benytte standard aminkoblingskjemi, mens det fjerde ble latt umodifisert for å tjene som en referanse. Endelige MAb-immobiliseringstettheter varierte fra 500-1100 RU (responsenheter). Bindingsresponser ble monitorert ettersom IFN α -A ble strømmet i titrerte mengder (0, 0,31, 0,93, 2,78, 8,33, 25,0 og 75,0 nM) over antistoffet og referansestrømningsceller ved en hastighet på 50 μ l/min. Assosiasjon av Ab/Ag-komplekset ble monitorert i 4 min. og dissosiasjonen ble monitorert i 12 min. Overflatene ble regenerert med 1/1000 H₃PO₄ (med unntak av ACO-5, som krevde 1/200 H₃PO₄) ved slutten av hver bindingssyklus. Tester ble utført i triplikat. Resultatene er vist i tabell 7. K_D-verdiene for de fem anti-IFN α MAb'ene dekket et område invers proporsjonalt til bredden av IFN α -subtyper nøytralisert ved hver MAb så vel som deres potens i å blokkere leukocyt-IFN og PBMC-influensabioaktivitet. ACO-1 viste den laveste affiniteten (5,61 x 10⁻⁹ M), mens ACO-5 viste en 14 ganger høyere affinitet (4,00 x 10⁻¹⁰ M). ACO-6 bandt ikke IFN α -A og ingen hastigheter var derfor oppnåelig.

Tabell 7. Biacore-kinetikkanalyse av ACO-1 til og med ACO-6 med IFN α -A

Antistoff	K_a ($M^{-1} s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)
ACO-1	$7,86 \times 10^4$	$4,41 \times 10^{-4}$	$5,61 \times 10^{-9}$
ACO-2	$9,87 \times 10^4$	$1,90 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^{-9}$
ACO-3	$5,12 \times 10^5$	$2,36 \times 10^{-4}$	$4,61 \times 10^{-10}$
ACO-4	$5,82 \times 10^5$	$2,74 \times 10^{-4}$	$4,71 \times 10^{-10}$
ACO-5	$5,25 \times 10^5$	$2,10 \times 10^{-4}$	$4,00 \times 10^{-10}$
ACO-6	N/A	N/A	N/A

Eksempel 6. Fastfasebinding av IFN α -subtyper ved ACO-1, ACO-2, ACO-3, ACO-4, ACO-5 og ACO-6

Fastfasebinding av alle 15 IFN α -subtyper ble evaluert for screening av MAb-spesifisitet ved ELISA-test. I korthet ble 50 μ l/brønn av 1 μ g/ml av en rekombinant IFN α -proteinsubtype belagt over natt ved 4°C på ELISA-plater (NUNC MaxiSorp™). Belagte plater ble blokkert med PBS + 1% BSA og inkubert med 50 μ l av 25 ng ACO-kandidat MAb i PBS i 1 time ved 37°C. Testene ble fremkalt ved inkubering med 50 μ l/brønn av et HRP-konjugert geit anti-mus-IgG (Jackson ImmunoResearch) ved romtemperatur i 30 minutter etterfulgt ved inkubering med 100 μ l/brønn av TMB-substratløsning (Zymed) i 15 minutter. Reaksjonen ble stoppet med 100 μ l/brønn av 1N HCl og lest ved OD₄₅₀ på en ELISA-plateleser. Prosentandeler binding ble kalkulert ved å normalisere bakgrunnssignalverdier med maksimale signalverdier over testen (observert for IFN α -4a). Resultatene er vist i tabell 8 og figur 6. Både ACO-1 og 2 bandt de identiske 12 IFN α -subtypene som de effektivt nøytraliserte i RG-biotesten ved signaler på minst to ganger større enn isotypetilpassede kontroller; binding av IFN α -subtyper B2, K, 4a og 4b demonstrerte signaler mer enn 20 ganger over kontroller. Forskjeller mellom binding og nøytraliseringskapasiteter ble imidlertid observert blant ACO-3, 4, 5 og 8. I tilfellet av ACO-3, var ELISA-signalene for subtyper B2, K og 4a de høyeste, til tross for det faktum at EC₅₀-verdien for nøytralisering av IFN α K var større enn 200 ganger høyere enn EC₅₀ for IFN α B2 og fire ganger høyere for IFN α 4a. Signifikant binding av subtype J1, som ble nøytralisert i biotesten var ikke detekterbar. Bindings- og nøytraliseringsprofilene for ACO-4 og 5 presenterte inverse forhold med hverandre. Mens ACO-4 og 5 sterkt bandt en subtype hver (hhv. IFN α 4a og 2), ACO-4 var i stand til å binde flere subtyper enn det nøytraliserte, og ACO-5 var i stand til å nøytralisere (skjønt ved høye EC₅₀-verdier) flere subtyper enn det bandt. En potensiell forklaring kan ligge i tilgjengelighetsforskjeller av de spesifikke epitopene gjenkjent ved disse to MAb'ene i

vannholdige (RG) versus fastfase (ELISA) -tester. ACO-8 sviktet i å sterkt binde enhver av IFN α -subtypene testet; det viste binding på mindre enn 20 ganger til IFN α D, 1 og 4a. ACO-6 sviktet i å binde til enhver av subtypene.

5 **Tabell 8. Binding av rekombinante IFN α -subtyper ved ACO-1, 2, 3, 4, 5 og 8**

IFN α -subtype	ACO-1	ACO-2	ACO-3	ACO-4	ACO-5	ACO-8
A	<u>6,4</u>	<u>9,8</u>	<u>8,4</u>	<u>7,2</u>	1,7	1,0
2	<u>8,7</u>	<u>7,0</u>	<u>9,8</u>	<u>9,0</u>	<u>3,4</u>	1,1
B2	24,3	32,7	39,2	<u>13,2</u>	1,3	1,1
C	<u>5,2</u>	<u>5,4</u>	<u>3,2</u>	<u>2,2</u>	1,5	1,0
D	1,2	1,4	1,0	<u>2,5</u>	1,7	<u>3,7</u>
F	<u>5,3</u>	<u>10,8</u>	1,0	<u>2,5</u>	1,7	<u>3,7</u>
G	<u>7,4</u>	<u>8,5</u>	0,9	<u>2,4</u>	1,3	1,1
H2	<u>7,5</u>	<u>10,9</u>	<u>9,0</u>	<u>4,5</u>	1,1	1,3
I	<u>7,8</u>	<u>12,5</u>	<u>8,9</u>	<u>3,9</u>	1,3	1,1
J1	<u>2,1</u>	<u>3,0</u>	1,8	<u>2,6</u>	1,4	1,1
K	23,2	22,3	27,7	<u>15,1</u>	1,4	1,1
1	1,3	1,1	1,0	<u>2,7</u>	1,6	<u>2,8</u>
4a	54,9	51,6	59,0	38,3	1,4	<u>3,3</u>
4b	22,2	26,1	1,0	<u>2,6</u>	1,4	1,4
WA	<u>3,2</u>	<u>3,3</u>	<u>6,2</u>	<u>3,2</u>	1,6	1,1

Understreket indikerer signaler større enn to ganger over tilpassede kontroller. Utheving indikerer signaler større enn 20 ganger over tilpassede kontroller. Signaler på mindre enn 2 ganger over tilpassede kontroller indikerer ikke-signifikant binding.

Eksempel 7. Blokkering av SLE-pasientserumbioaktivitet ved ACO-1, 2 og 3 monoklonale antistoffer

En antiviral test ble benyttet for å evaluere evnen av anti-IFN α MAb'ene å nøytralisere den beskyttende aktiviteten av serum fra SLE-pasienter med aktiv sykdom mot døden av A540-celler (CCL-185, ATCC) ved infeksjon med encefalomyokardittvirus (RMCV). Antistoffene som viste de bredeste IFN α -subtype, leukocyt-IFN og PBMC-influenta nøytraliseringsprofiler (ACO-1, 2 og 3) ble testet. SLE-serumet ble oppnådd fra fire aktive SLE-pasienter (identifisert som SLE-43, 133, 140 og BC) valgt på basis av IFN og granulopoiese genekspressjonssignaturer karakterisert fra deres mononukleære

blodceller. SLE-sera ble screenet for beskyttelse mot viral infeksjon i CPE-testen før MAb-nøytraliseringstesting. RG-testen ble ikke benyttet i disse analysene p.g.a. inhibering ved serumfaktorer av cellebinding til ViewPlate™ under den komparativt korte inkuberingsperioden (5 timer) av RG-biotesten versus CPE-testen (48 timer). Vero-celler (CCL-81, ATCC) ble infisert med EMCV (VR-129B, ATCC) for å preparere virale arbeidsløsninger fra supernatanter. Tester ble utført i triplikat i celledyrkningsbehandlede, 96-brønners plater med flat bunn inkubert ved 37°C + CO₂ med A549-celler (15 000 celler/brønn i 50 µl hver) over natt. Anti- IFNα MAb'er og serum fra SLE-pasienter ble så tilsatt til platen (100 µl/brønn) og preinkubert i 4 timer før tilsetning av EMCV for-
 10 tynnet til den minimale konsentrasjonen i 50 µl i stand til å drepe 100% av ubeskyttede celler i løpet av 48 timer. Inkubering ble fortsatt i 48 timer, etterfulgt ved farging med krystallfiolett og avlesning ved OD₅₇₀ i en ELISA-plateleser. Kontroller var serum alene, bare medium (-) og et pan-nøytraliserende polyklont antistoff (pAb, kanin anti-human IFNα, PBL). Resultatene vist i figur 7a-d representerer middelveien av tripli-
 15 kater. Til tross for deres lavere affiniteter, var ACO-1 og 2 i stand til å nøytralisere alle fire sera i noen grad. ACO-3 var ikke i stand til å blokkere SLE-43, 140 eller BC. Evnen for relevante isotypekontrollantistoffer til å blokkere serum i noen tilfeller (IgG2b for SLE-43, alle tre isotyper for SLE-BC) resulterte trolig fra naturlige variasjoner i andre serumbestanddeler fra en pasient til en annen som var cytotoksiske for cellene benyttet i
 20 testen.

Eksempel 8. Kryssreaktivitet av ACO-1 og ACO-2 med primat IFNα.

For å utføre prekliniske trygghets/toksikologistudier som en innledning til humane kliniske forsøk, er det nyttig å identifisere en dyremodell hvor endogen IFNα er reaktivt
 25 med det humanisert anti-IFNα-monoklonale antistoffet. Evnen av to kandidater, murine anti-humane IFNα Ab'er ACO-1 og ACO-2, til å nøytralisere primat IFNα ble testet. Spesifikt, ble evnen av antistoffene til å blokkere induksjon av et MxA-luciferasereportergen i A549-celler når stimulert med rensset makakk IFNα 4b (156 pg/brønn) bestemt. Som vist i figur 8, blokkerte antistoffene ACO-1 og ACO-2 sterkt
 30 reportergeninduksjon (hhv. A og B) mens ACO-3 er ikke i stand til å blokkere, til og med ved høye konsentrasjoner (C). Homologi mellom human og makakk IFNα er sterkt konserverv. Kommersielt tilgjengelige anti-human IFNα-antistoffer har videre blitt vist å kryss reagere med Rhesus og cynomologe homologer. Disse data antyder at primater tilveiebringer en egnet trygg screeningsmodell.

35

Eksempel 9. Sekvens av ACO-1 tunge og lette kjeder

- RT/PCR ble utført ved å benytte degenererte primersamlinger for å amplifisere mRNA fra hybridomen uttrykkende ACO-1. Tungkjedevariabel region mRNA ble amplifisert ved å benytte et sett av seks degenererte primersamlinger (HA til HG) og lettkjedevariable region mRNA ble amplifisert ved å benytte et sett av åtte degenererte primersamlinger (LA til LI). Amplifiseringsprodukter ble oppnådd med primersamlinger: HA, HB, HE, HF, LB, LC og LG. Ikke noe PCR-produkt ble amplifisert med samling LI, derfor er den lette kjeden fra kappaklyngen. Hvert produkt ble klonet og flere kloner fra hver sekvensert.
- To forskjellige tungkjedesequenser ble identifisert. Samlinger HA og HF amplifiserte en enkel sekvens som koder for en trunkert tung kjede med stoppkodon ved slutten av rammeverksregion 3. Det er derfor ikke sannsynlig at denne tunge kjeden kan danne et antistoff i stand til å binde til antigen.
- Samlinger HB og HE amplifiserte en enkel sekvens som var forskjellig fra den av HA og HF og koder for en fullengde muse V_h -region som vist i figur 9. Fullengdetungkjede DNA-sekvensen er SEK. ID. nr. 1, og fullengdeaminoesyresekvensen er SEK. ID. nr. 2. DNA-sekvensene kodende for CDR'er V_{H1} (TACACCTTCACCAACTACTGGATGCAC; SEK. ID. nr. 3), V_{H2} (GAGATTAATCCTAGCCACGGTCGTACTATCTACAATGAAAACCTTCAAGAGC; SEK. ID. nr. 5) og V_{H3} (GGGGGACTGGGACCCGCCTGGTTTGCTTAC; SEK. ID. nr. 7) er vist i italiensk skrift, mens aminosyresekvensene V_{H1} (YTFTNYWMH; SEK. ID. nr. 4), V_{H2} (EINPSHGRTIYNENFKS; SEK. ID. nr. 6) og V_{H3} (GGLGPAWFAY; SEK. ID. nr. 8) er understreket.
- To lettkjedesequenser ble identifisert. Samlinger LB og LC amplifiserte en enkel sekvens som kunne oppstilles på linje med godt dokumentert, avvikende, trunkert kappa lett kjede som er funnet i noen hybridomer. Samling LG amplifiserte en enkel sekvens som var fullengde og forskjellig fra den amplifisert i samlinger LB og LC. Lettkjedesequensen er vist i figur 10. Fullengdelettkjede DNA-sekvensen er SEK. ID. nr. 9, og fullengdeaminoesyresekvensen er SEK. ID. nr. 10. DNA-sekvensene kodende for CDR'er V_{L1} (AGTGCCGGCTCAAGTGTAAGATTCCAGCTATTTGTAC; SEK. ID. nr. 11), V_{L2} (AGCACATCCAACCTGGCTTCT; SEK. ID. nr. 13) og V_{L3} (CATCAGTGGAGTAGTTACCCATTACAG; SEK. ID. nr. 15) er vist i italiensk skrift, mens aminosyresekvensene V_{L1} (SAGSSVDSSYLY; SEK. ID. nr. 12), V_{L2} (STSNLAS; SEK. ID. nr. 14) og V_{L3} (HQWSSYPFT; SEK. ID. nr. 16) er understreket.

Analysen av sekvensene oppnådd fra hybridom ACO-1 er oppsummert i tabell 9. De variable regionene viser høy homologi med deres nærmeste humane kjønnslinjesekvenser (67% til 65%) og rammeverksekvensene har nære homologer i den humane kjønns-
 5 linjedatabasen.

Tabell 9: Klon ACO-1

	H-kjede	L-kjede
CDR^a 1 lengde	V _H 1: 9aa	V _L 1: 12aa
CDR 2 lengde	V _H 2: 17aa	V _L 2: 7aa
CDR 3 lengde	V _H 3: 10aa	V _L 3: 9aa

Musekjønnslinje	J558,33	Vk ae4
Nærmeste humane kjønnslinje^b	VH1-46 (67%)	L6 (65%)
Nærmeste humane FW1^b	VH1-46/18/8/3/2 (80%)	L20/A11/L6 (69%) L4/18a/018/012/L19/L18
Nærmeste humane FW2^b	VH1-46/69/18/2 (78%)	L12/L11/08/02/L9/L8/L5 (80%)
Nærmeste humane FW3^b	VH1-69 (65%)	A26/A10/A14 (75%)
Nærmeste humane J^b	J4 (92%)	J2 (92%)

10

^a CDR-definisjoner og sekvensnummerering i henhold til Kabat

^b Kjønnslinje ID(er) indikert etterfulgt ved prosent homologi.

Eksempel 10. Humanisering av et monoklonalt antistoff og dets karakterisering

15 Humanisert antistoff er laget ved poding av de murine komplementaritetsbestemmende regionene inn i et rammeverk av humant antistoff (CDR-poding) ved å benytte fremgangsmåter kjent i fagfeltet (Se Jones et al., (1986) "Nature", 321:522-525; Reichmann et al., (1988) "Nature", 332:323-329; Presta (1992) "Curr. Op. Struct. Biol.", 2:593-596; og Clark (2000) "Immunol. Today", 21:397-402). Det humaniserte antistoffet kan være
 20 i stand til den samme bindingen og funksjonelle parameterne som de murine monoklonale antistoffene beskrevet ovenfor.

Eksempel 11. Behandling av SLE ved å benytte humanisert monoklonalt antistoff

Mikromatriseanalyser vil bli benyttet for å monitorere IFN α -signaturen i henhold til fremgangsmåter kjent i fagfeltet og beskrevet i Bennet et al. (2003), supra og Baechler et al. (2003), supra. Dette nye verktøyet vil tjene til å laginndeles (dvs. positive IFN α -signaturinklusionskriterier), så vel som monitorere pasienter. Anvendelse av denne analysen er også nyttig for å bestemme hvilke pasienter som er egnet å behandle ved sammensetningene og fremgangsmåtene av denne oppfinnelsen. I et aspekt, vil administrasjon av et antistoff av denne oppfinnelsen utslette denne signaturen. I et aspekt, kan en fagperson bestemme når objektet av en fremgangsmåte av denne oppfinnelsen er møtt, og en effektiv mengde av antistoff har blitt levert, når definert som mengden nødvendig for at IFN α -signaturen er undertrykt ved 50% for en effektiv mengde av tid, f.eks. omkring 4 uker.

En effektiv mengde vil bli infusert, f.eks. fra omkring 1 mg/kg, den andre 2,5 mg/kg, den tredje 5 mg/kg antistoff og en fjerde, om nødvendig, vil være 10 mg/kg. Den ”kalkulerte optimale dosen” for hver pasient er definert som mengde som trykt kan bli administrert og gir minst 50% undertrykkelse av IFN α -signaturen i omkring 4 uker.

Pasienter vil bli monitorert ukentlig for IFN α -signatur. Tiden for tilbakekomst av IFN α -signaturen vil bestemme doseringsintervallet. Om 1 mg/kg dosen gir 50% reduksjon av signatur i bare 2 uker, vil f.eks. pasienten motta en andre dose på 2,5 mg/kg. Om ukentlig monitorering viste en 50% undertrykkelse av signaturen i bare 3 uker, vil pasienten motta sin tredje dose på 5 mg/kg. En maksimal dose på 10 mg/kg vil bli testet med målet av å identifisere en dose som gir 50% IFN α -signaturundertrykkelse i minst 4 uker.

Virkeevne kan bli målt ved enhver akseptabel fremgangsmåte. Akseptable fremgangsmåter inkluderer, men er ikke begrenset til, mikromatriseanalyse av PBMC’er (virkeevne er etablert ved utslettelse av interferonsignaturen), flowcytometri av PBMC’er (virkeevne er etablert ved økte T/B-lymfocytellinger), redusert plasmacytose og redusert tilstedeværelse av umodne neutrofiler eller cytokinmultipleksanalyse i serum ved anvendelse av luminexanalyse.

Biologiske anbringninger. ACO-1 til og med ACO-6 hybridomcellelinjer ble anbragt med American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC), og ble tildelt anbringningsnummerne listet opp i tabell 10 nedenfor.

Tabell 10.

Hybridomcellelinje	ATCC anbringningsnr.	Anbringningsdato
ACO-1	PTA-6557	02/08/2005
ACO-2	PTA-6558	02/08/2005
ACO-3	PTA-6599	02/08/2005
ACO-4	PTA-6560	02/08/2005
ACO-5	PTA-6561	02/08/2005
ACO-6	PTA-6562	02/08/2005

Disse anbringningene ble gjort under bestemmelsene av Budapest-traktaten ved interna-
5 sjonal erkjennelse av anbringningen av mikroorganismer for formålet av patentprosedy-
re og reguleringene derunder (Budapest-traktat). Dette sikrer opprettholdelse av en le-
vedyktig kultur av anbringningen i 30 år fra datoen av anbringning. Anbringningen vil
bli gjort tilgjengelig ved ATCC under vilkårene av Budapest-traktaten, og satt under en
overenskommelse mellom Baylor Research Institute og ATCC, som sikrer permanent
10 og ubegrenset tilgjengelighet av etterkommeren av kulturen av anbringningen til det
offentlige ved utstedelse av det aktuelle U.S. patentet eller ved å ligge åpent for det of-
fentlige av enhver U.S. eller fremmed patentsøknad, hvilken enn som kommer først, og
sikrer tilgjengelighet av etterkommeren til en bestemt ved kommisæren for patenter som
skal bli berettiget dertil i henhold til 35 U.S.C. §122 og kommisærens regler overens-
15 stemmende dertil (inkluderende 37 C.F.R. §1.14 med spesiell referanse til 866 OG 638).

Fullmektigen av den foreliggende søknaden har samtykket at om en kultur av materia-
lene som er anbragt bør eller blir tatt eller ødelagt når dyrket under egnede forhold, vil
materialene raskt bli erstattet ved bekjentgjørelse med en annen av den samme. Til-
20 gjengelighet av det anbragte materialet skal ikke bli oppfattet som en rettighet til å prak-
tisere oppfinnelsen i overtredelse av rettighetene gitt under autoriteten av enhver stats-
makt i overensstemmelse med patentlovene.

Det vil bli forstått at bestemte utførelsesformer beskrevet her er vist ved illustrasjon og
25 ikke som begrensninger av oppfinnelsen. Hovedtrekkene av denne oppfinnelsen kan bli
benyttet i ulike utførelsesformer uten å forlate rekkevidden av oppfinnelsen. Fagperso-
ner vil gjenkjenne, eller være i stand til å fastslå ved å benytte ikke mer en rutinemessig
eksperimentering, tallrike ekvivalenter av de spesifikke prosedyrene beskrevet her. Sli-

ke ekvivalenter er betraktet til å være innenfor rekkevidden av denne oppfinnelsen og er dekket ved kravene.

Alle publikasjoner og patentsøknader nevnt i redegjørelsen er indikert av nivået av fag-
5 personer i fagfeltet hvortil dette patentet tilhører.

I kravene, skal alle overgangsfraser slik som ”omfattende”, ”inkluderende”, ”bærende”,
”som har”, ”inneholdende”, ”involverende” og lignende bli forstått til å være uten be-
grensninger, dvs. å bety inkluderende, men ikke begrenset til. Bare overgangsfrasene
10 ”bestående av” og ”bestående hovedsakelig av” skal hhv. være lukkede eller halvlukke-
de overgangsfraser.

Alle sammensetningene og/eller fremgangsmåtene angitt og kravene her kan bli laget og
utført uten unødvendig eksperimentering i lys av den foreliggende angivelsen. Mens
15 sammensetningene og fremgangsmåtene av denne oppfinnelsen har blitt beskrevet på
vilkår av foretrukkede utførelsesformer, vil det være tydelig for fagpersoner at variasjo-
ner kan bli gjort til sammensetningene og/eller fremgangsmåtene og i trinnene eller i
sekvensen av trinn av fremgangsmåten beskrevet her.. Mer spesifikt, vil det være tyde-
lig at enkelte midler som er både kjemiske og fysiologisk relatert kan bli byttet ut med
20 midlene beskrevet her, mens de samme eller lignende resultater vil bli oppnådd.

P a t e n t k r a v

1.

Et antistoff eller antigenbindende fragment derav som selektivt nøytraliserer minst 40%
5 av en bioaktivitet fra minst ti interferon alfa ("IFN α ") proteinsubtyper valgt fra gruppen
bestående av proteinsubtyper A, 2, B2, C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, men nøytra-
liserer ikke signifikant minst en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtype D, der bioaktivi-
tet er aktivering av MxA-promoteren og blir målt ved å benytte RGmax IFN mengder
og 2 mikrogram per ml antistoff eller antiviral aktivitet målt ved bruk av cytopatisk ef-
10 fekt inhibisjonstest.

2.

Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, der bioaktiviteten er akti-
vering av MxA-promoteren.

15

3.

Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1 eller krav 2, der bioaktivi-
teten er antiviral aktivitet.

20

4.

Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge et hvilket som helst av de foregå-
ende krav, som selektivt nøytraliserer en bioaktivitet av IFN α -proteinsubtyper A, 2, B2,
C, F, G, H2, I, J1, K, 4a, 4b og WA, men nøytraliserer ikke signifikant bioaktiviteten av
IFN α -proteinsubtyper D og 1.

25

5.

Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1 eller krav 2, der antistoffet
nøytraliserer minst 60% av bioaktivitet av nevnte IFN α -proteinsubtypene, der bioakti-
viteten er aktivering av MxA promotoren.

30

6.

Antistoff ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, der antistoffet er et-
monoklonale antistoff.

35

7.

Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge et hvilket som helst av kravene 1

til 6, der antistoffet omfatter et tungkjedevariabelt domene av SEK. ID. nr. 2 og et lett-
kjedevariabelt domene av SEK. ID. nr. 10.

8.

- 5 Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge et hvilket som helst av kravene 1
til 7, der antistoffet binder den samme IFN α -epitopen som anti-IFN α -antistoffet produ-
sert ved hybridomen som har ATCC anbringningsnr. PTA-6557.

9.

- 10 Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge et hvilket som helst av kravene 1
til 8, der det antigenbindende fragmentet er et Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fv- eller sFv-
fragment.

10.

- 15 Et antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge et hvilket som helst av kravene
1 til 9, omfattende minst en lettkjede omfattende CDR'ene:

V_L1 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 12;

V_L2 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 14;

V_L3 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 16; og

20

minst et tungkjede omfattende CDR'ene:

V_H1 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 4;

V_H2 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 6; og

V_H3 som har aminosyresekvensen av SEK. ID. nr. 8.

25

11.

Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 10 der antistoffet omfatter en
homo-tetramer struktur bestående av to disulfidforbundede antistofftungkjede-
lettkjedepar.

30

12.

Antistoff ifølge krav 10 antistoffet omfatter et lineært antistoff.

13.

- 35 Et antistoff som binder den samme IFN α -epitopen som anti-IFN α -antistoffet produsert
ved hybridomen som har ATCC anbringningsnr. PTA-6557.

14.

Et antistoff produsert ved en hybridom som har ATCC anbringningsnr. PTA-6557.

5 15.

Humanisert antistoff ifølge krav 1 derivert fra antistoffet ifølge krav 14.

16.

10 En vertscelle omfattende en nukleinsyre kodende for antistoffet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene.

17.

En hybridom som produserer et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 14.

15 18.

En sammensetning omfattende et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravne 1 til 14, der sammensetningen valgfritt er en farmasøytisk sammensetning og ytterligere omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer.

20 19.

Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 14 til bruk i behandling av en sykdom eller tilstand selektert fra systemisk lupus erytematosus (SLE), Graft versus Vert sykdom (GVHD), type 1 diabetes, AIDS, lupus, psoriasis og autoimmun tyroiditt.

25

SEQUENCE LISTING

<110> Baylor Research Institute
 Banchereau, Jacques
 Prilliman, Kiley
 Pascual, Virginia
 Palucka, Anna Karolina

<120> ANTI-INTERFERON ALPHA MONOCLONAL ANTIBODIES AND METHODS FOR USE

<130> ARG032WO

<140> Not Yet Assigned

<141> 2006-02-09

<150> US 60/652,233

<151> 2005-02-10

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 1

cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag ctg tcc tgt aag gct tct ggc tac acc ttc acc aac tac 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att 144
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga gag att aat cct agc cac ggt cgt act atc tac aat gaa aac ttc 192
 Gly Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc atc aca gcc ttc 240
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Phe
 65 70 75 80

atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

gca aga ggg gga ctg gga ccc gcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg 336
 Ala Arg Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

act ctg gtc act gtc tct gca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 2

<211> 119

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Phe
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 3
 tacaccttca ccaactactg gatgcac

27

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 5
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 5
 gagattaatc ctagccacgg tcgtactatc tacaatgaaa acttcaagag c

51

<210> 6
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
 1 5 10 15

Ser

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 7
 gggggactgg gacccgcctg gtttgcttac

30

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<400> 9

caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gct tct cct ggg
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

48

gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc ggc tca agt gta gat tcc agc
 Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Asp Ser Ser
 20 25 30

96

tat ttg tac tgg tac cag cag aag cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg
 Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

144

att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

192

ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

240

gct gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat cag tgg agt agt tac cca
 Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95

288

ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aaa ttg gaa ata aaa cgg
 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

327

<210> 10
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Asp Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 11
 agtgccggct caagtgtaga ttccagctat ttgtac

36

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12

Ser Ala Gly Ser Ser Val Asp Ser Ser Tyr Leu Tyr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 13
 agcacatcca acctggcttc t

21

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 15
 catcagtgga gtagttaccc attcacg

27

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

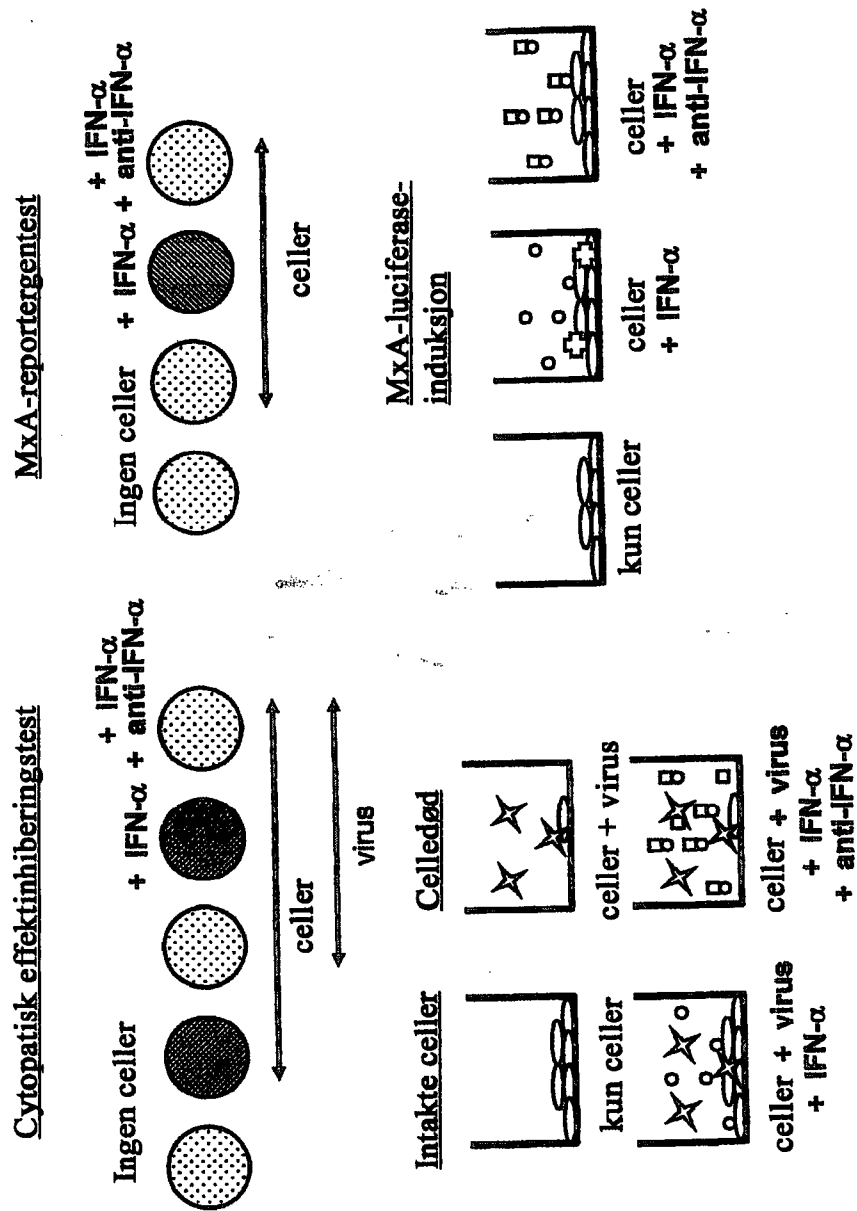


FIG. 1

2/12

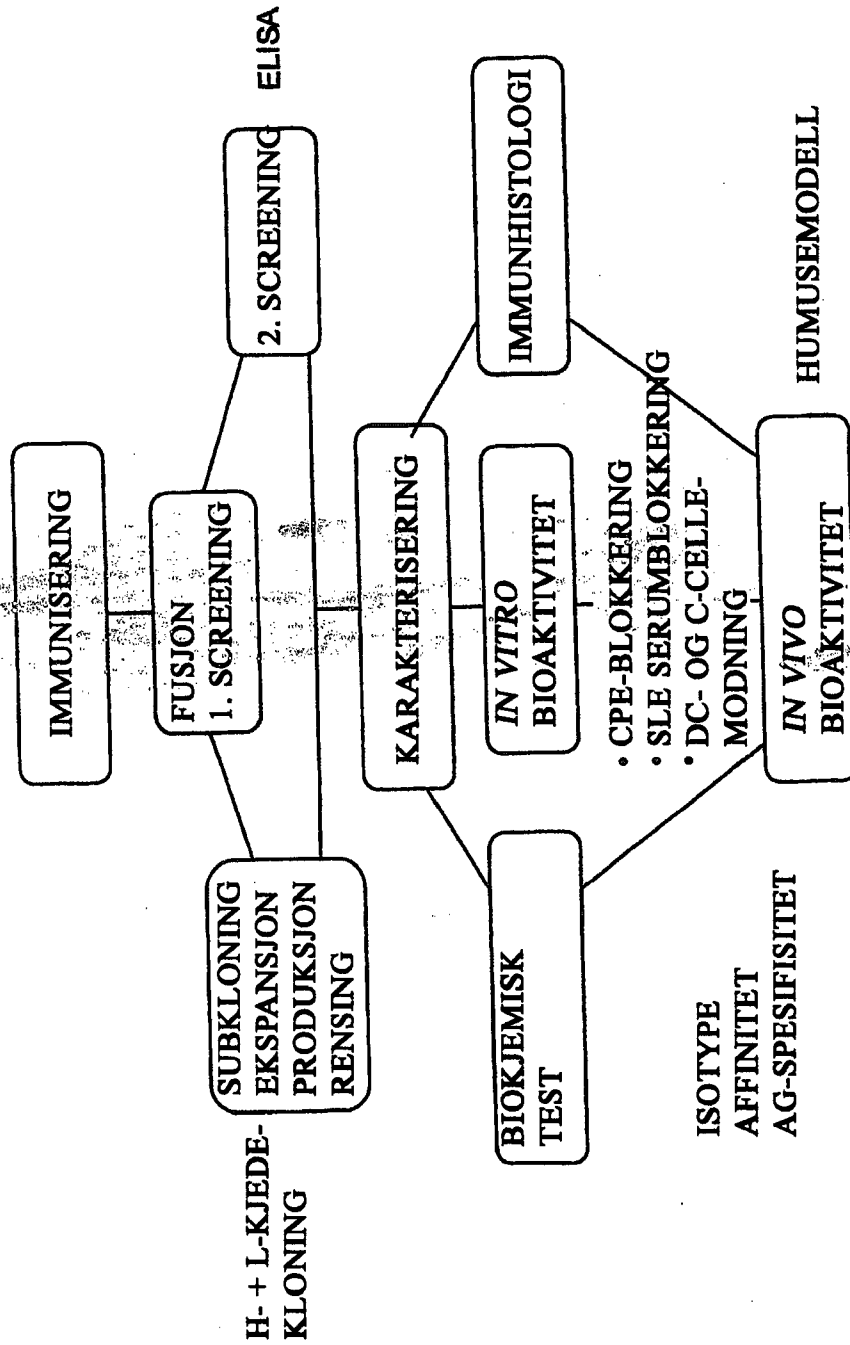


FIG. 2

3/12

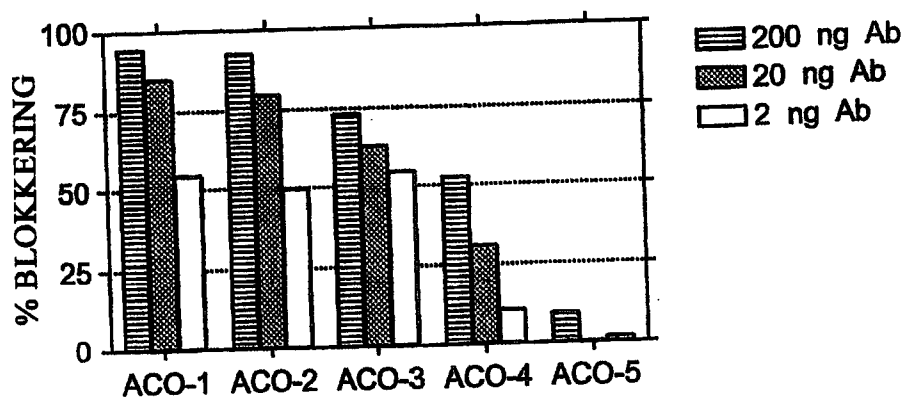


FIG. 3A

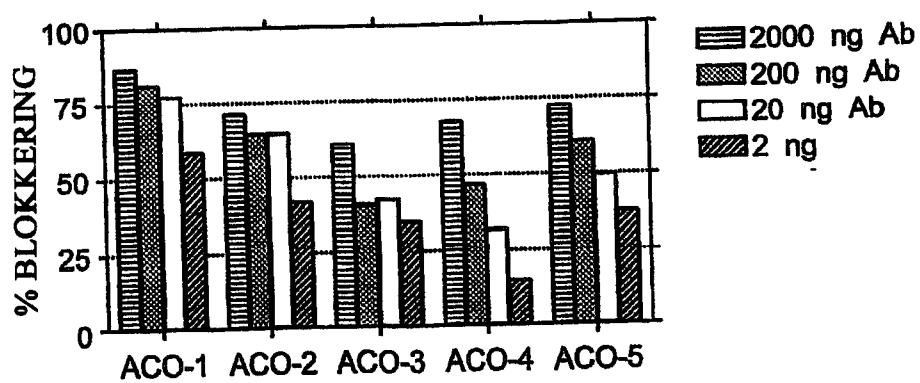


FIG. 3B

4/12

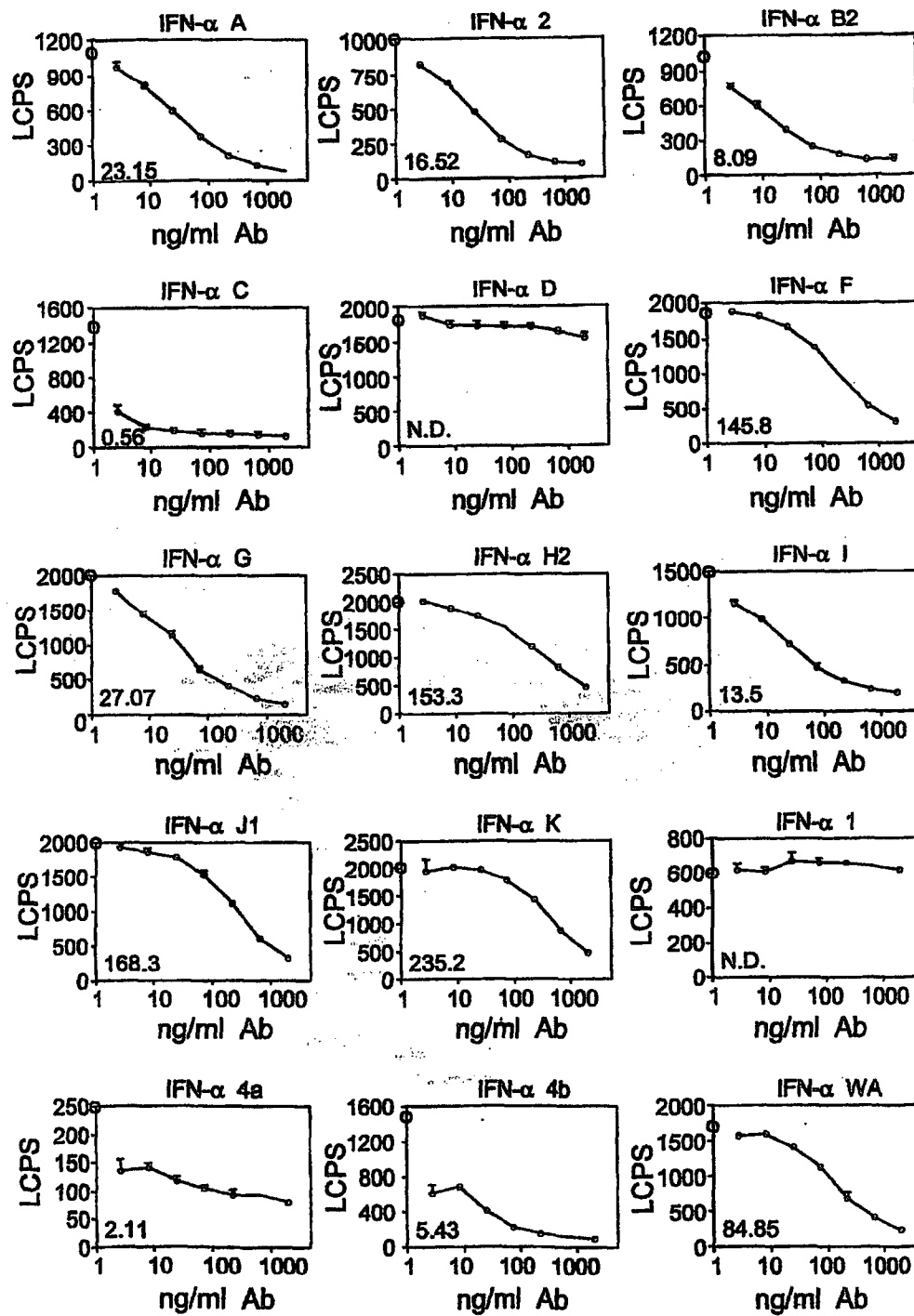


FIG. 4A

5/12

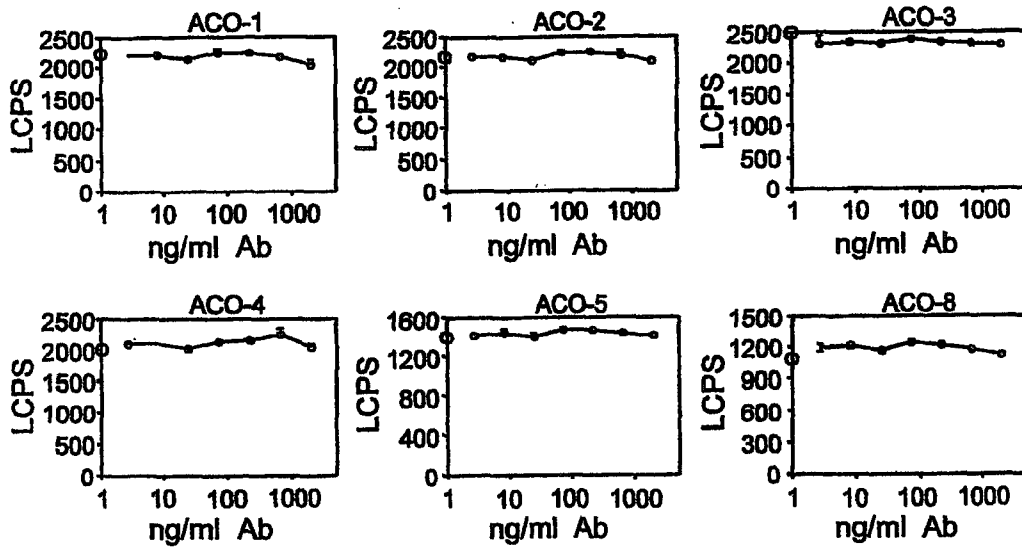


FIG. 4B

pg/mL	Innfangn.		Reporter	ACO-	ACO-	ACO-	ACO-
	ACO-1	ACO-					
0	7	2	5	1	5	1	
1000	8	2	5	1	8	1	
0	5	3	8	3	5	2	
1000	8	3	6	3	8	2	
0	9	4	26	4	15	4	
1000	8	4	21	4	14	4	
0	32	5	36	5	10	5	
1000	256	5	160	5	642	5	
0	11	6	11	6	7	6	
1000	9	6	9	6	5	6	

pg/mL	Innfangn.		Reporter	ACO-	ACO-	ACO-	ACO-
	ACO-4	ACO-					
0	7	1	46	1	37	1	
1000	10	1	520	1	34	1	
0	6	2	10	2	17	2	
1000	9	2	558	2	10	2	
0	9	3	3	3	7	3	
1000	586	3	618	3	8	3	
0	8	5	11	4	14	4	
1000	636	5	484	4	15	4	
0	7	6	4	6	13	5	
1000	11	6	3	6	14	5	

FIG. 5

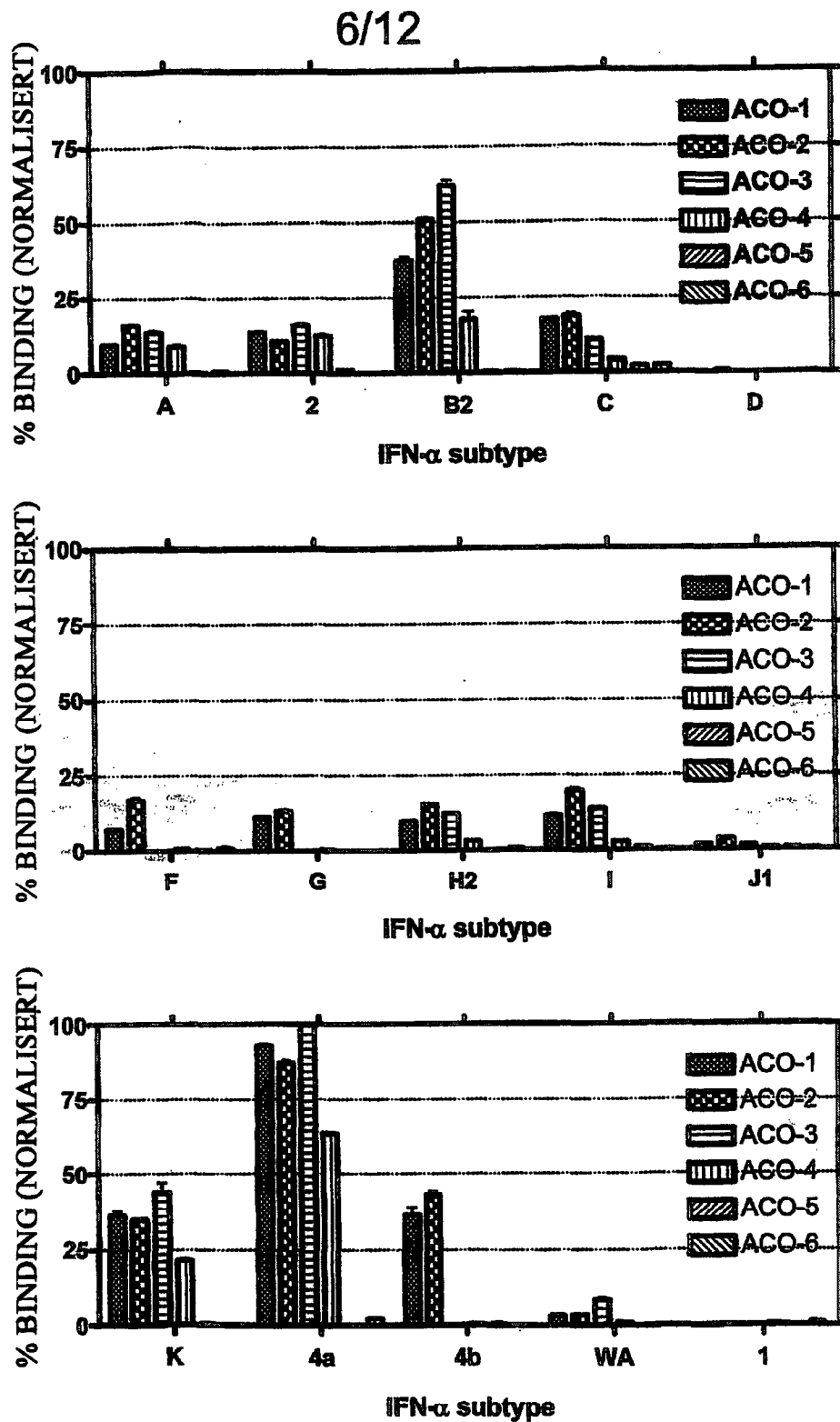
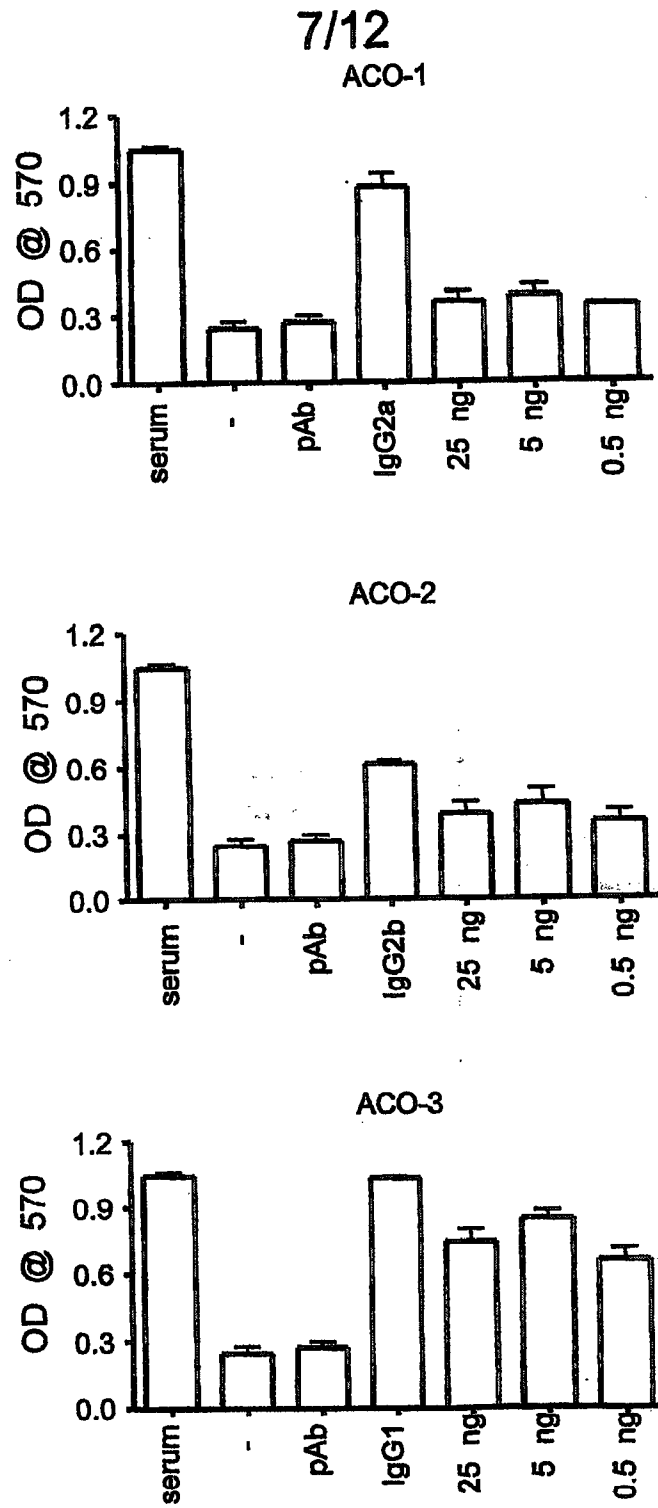


FIG. 6

**FIG. 7A**

8/12

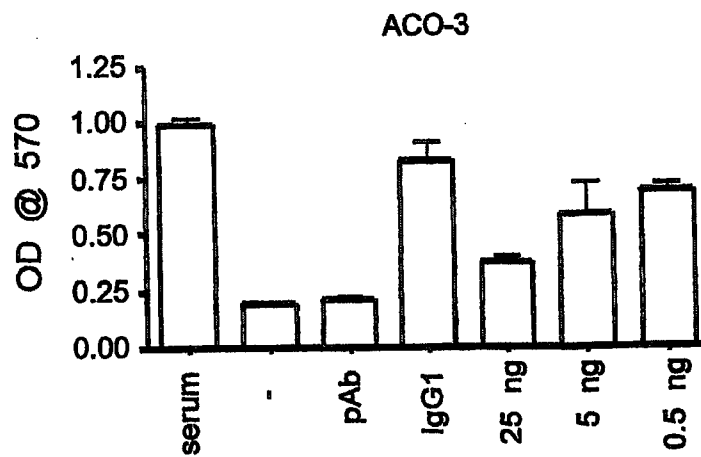
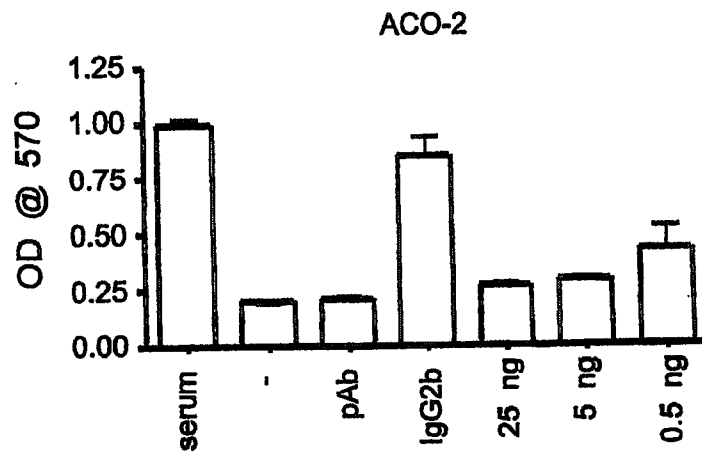
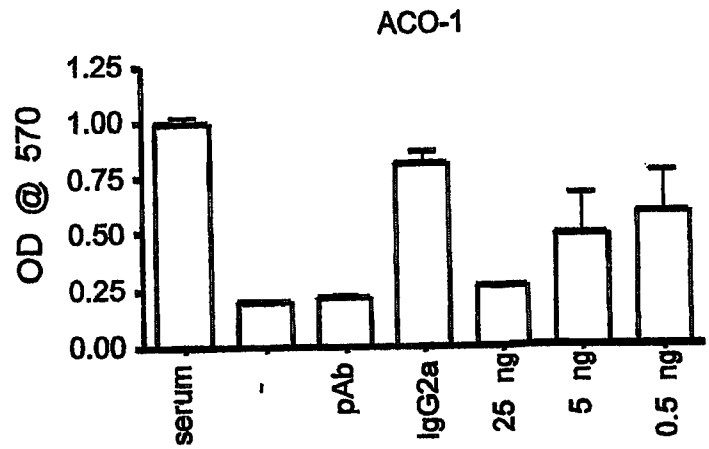


FIG. 7B

9/12

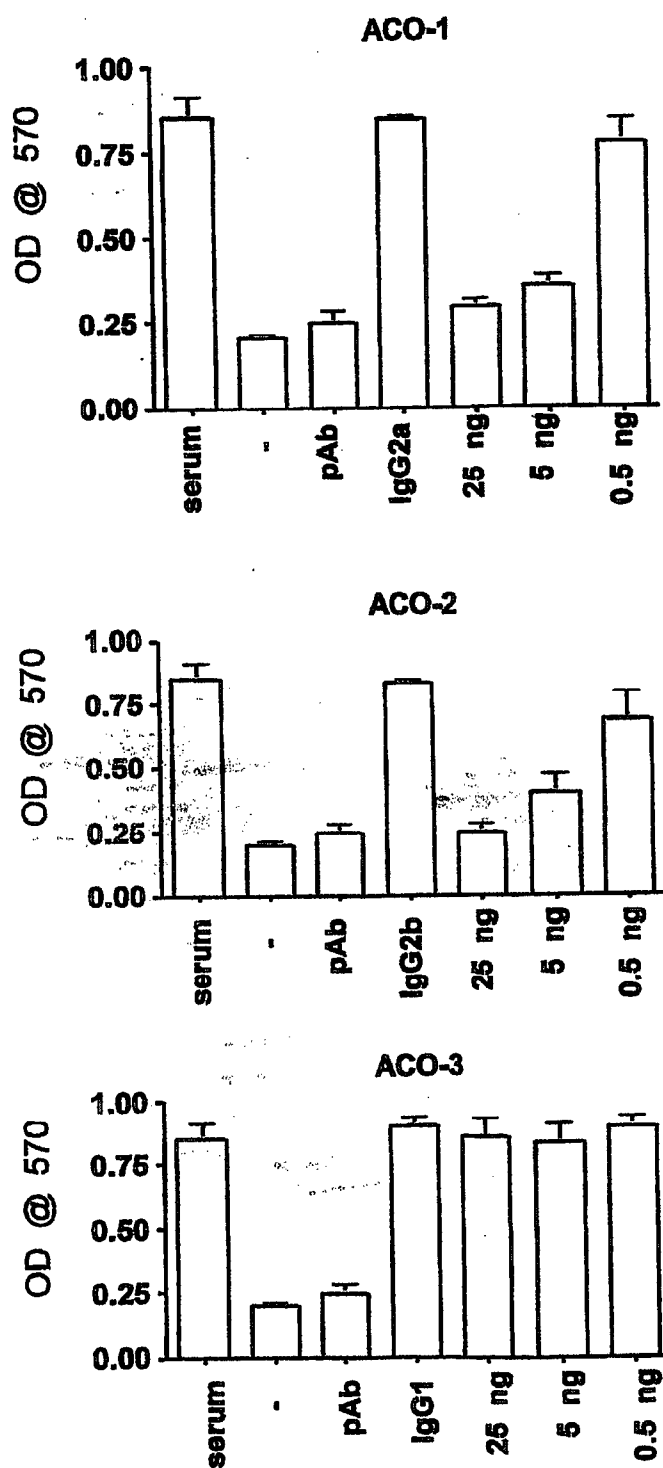
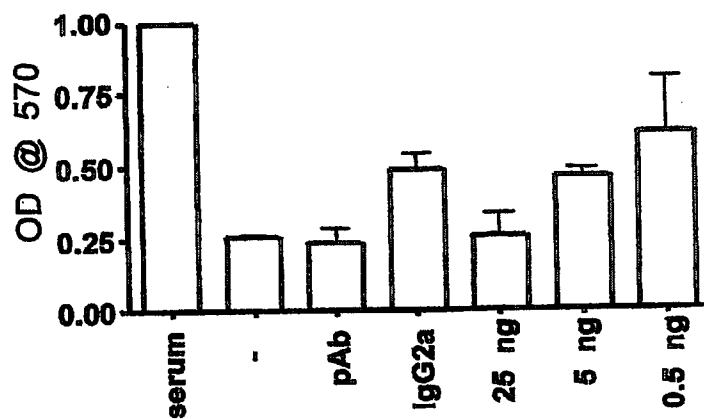


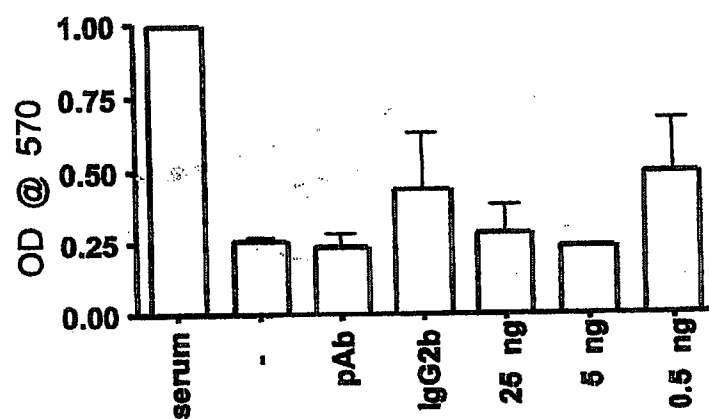
FIG. 7C

10/12

ACO-1



ACO-2



ACO-3

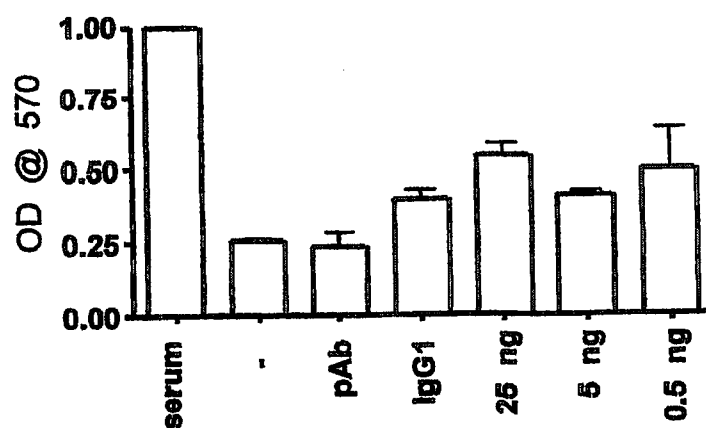
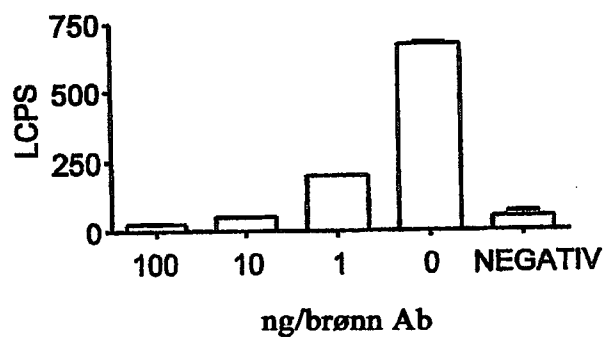
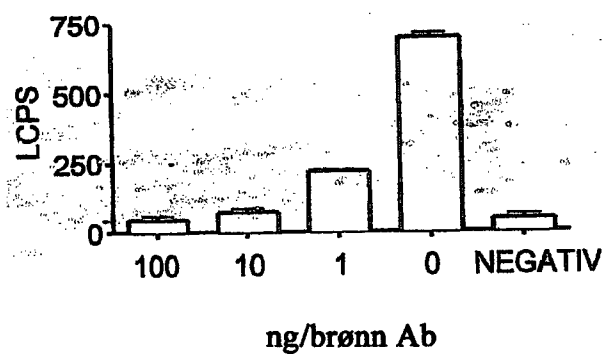
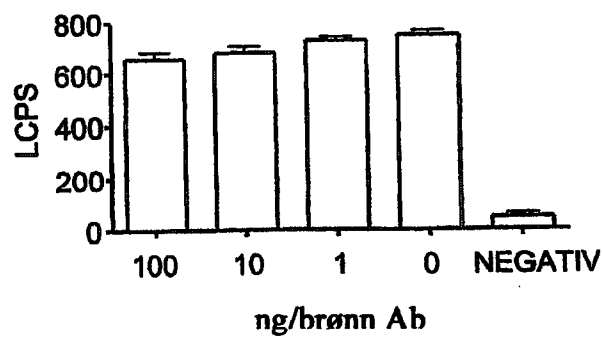


FIG. 7D

11/12

**FIG. 8A****FIG. 8B****FIG. 8C**

12/12

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG
Q V Q L Q Q P G A E L V K P G A S V K L

TCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGG
S C K A S G Y T F T N Y W M H W V K Q R

V_{R1}

CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAAATCCTAGCCACGGTCGTACTATCTAC
P G Q G L E W I G E I N P S H G R T I Y

V_{R2}

AATGAAAACCTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCATCACAGCCTTC
N E N F K S K A T L T V D K S S I T A F

ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGGA
M Q L S S L T S E D S A V Y F C A R G G

CTGGGACCCGCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
L G P A W F A Y W G Q G T L V T V S A

V_{R3}

SEQ ID NO:1

SEQ ID NO:2

FIG. 9

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCTTCTCCTGGGGAGAAGGTCAAC
Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T

TTGACCTGCAGTGCCGGCTCAAGTGTAGATTCCAGCTATTTGTACTGGTACCAGCAGAAG
L T C S A G S S V D S S Y L Y W Y Q Q K

L1

CCAGGATCCTCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT
P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P

L2

GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAG
A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E

GCTGAAGATGCTGCCTCTTATTTCTGCCATCAGTGGAGTAGTTACCCATTACGTTCCGC
A E D A A S Y F C H Q W S S Y P F T F G

L3

TCGGGGACAAAATTGGAAATAAAACGG SEQ ID NO:9
S G T K L E I K R SEQ ID NO:10

FIG. 10