

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532885
(P2004-532885A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int.Cl.⁷**A61K 39/395**
A61P 27/02

F 1

A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 P 27/02

テーマコード(参考)

F 4 C 0 8 5
U

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2003-501497 (P2003-501497)	(71) 出願人	503445423 アドバンスド・バイオセラピー・インコ- ポレーテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州9136 7ウッドランドヒルズ・スイート510・ トパンガキヤニオンブルバード6355
(86) (22) 出願日	平成14年6月4日 (2002.6.4)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月4日 (2003.12.4)	(72) 発明者	スカーコビチ, シモン アメリカ合衆国メリーランド州20852 ロツクビル・ロリンズアベニュー802
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/017677	(72) 発明者	スカーコビチ, ポリス アメリカ合衆国ロードアイランド州026 80ポータケット・ブライスデルアベニュー -18
(87) 國際公開番号	W02002/098460		
(87) 國際公開日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		
(31) 優先権主張番号	60/295,895		
(32) 優先日	平成13年6月5日 (2001.6.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	09/894,287		
(32) 優先日	平成13年6月28日 (2001.6.28)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】眼内の過免疫応答を処置するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は眼の過免疫反応を処置するための方法および組成物を含んでなり且つ使用する。ガンマインターフェロンに対する抗体を単独でおよび別の薬品と組み合わせて含んでなる組成物が記載される。インターフェロンガンマ抗体を含んでなる組成物を眼に局所的に適用して例えば移植拒絶反応のような過免疫反応、眼の自己免疫疾病、および自己免疫疾病を起こしやすいかまたはそれに関連する眼の疾病を処置する方法も本発明で開示されている。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳動物の眼にインターフェロンガンマに対する抗体を含んでなる組成物を投与することを含んでなる、哺乳動物における眼に関連する組織または器官移植の拒絶反応の処置方法。

【請求項 2】

該組成物が該眼に局所投与される、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

該哺乳動物が人間である、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

該移植が角膜移植である、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

該抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 の方法。

【請求項 6】

該抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 の方法。

【請求項 7】

該抗体がヒト化された抗体である、請求項 1 の方法。

【請求項 8】

該抗体がインターフェロンガンマに対する抗体の生物学的に活性な断片である、請求項 1 の方法。

【請求項 9】

該組成物が製薬学的に許容可能な担体中に懸濁されている、請求項 1 の方法。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】****【0001】**

「自己」対「非自己」抗原を認識する哺乳動物免疫系の能力は侵襲性微生物に対する好結果の宿主防御にとって極めて重要である。「自己」抗原は動物自身の成分と検出しうる程度に異ならないものであるが、「非自己」抗原は哺乳動物の成分と検出しうる程度に異なるすなわち異質であるものである。正常な哺乳動物免疫系は「非自己抗原」を認識し且つそれらを攻撃しそして破壊するために機能する。免疫系が「自己」抗原を「非自己」であると同定し、それにより哺乳動物自身の身体成分（すなわち、器官および／または組織）に対して免疫応答を開始する場合に、自己免疫障害、例えば、慢性関節リューマチ、インシュリン・非依存性真性糖尿病、後天性免疫不全症候群（エイズ）、多発性硬化症など、が起きる。これは哺乳動物の器官および／または組織を損傷し、そして重篤な病気または死亡をもたらしうる。

【0002】

自己免疫疾患に対する哺乳動物の素因は大部分遺伝子によるが、例えばウイルス、細菌、または化学剤のような外因性因子も役割を演じうる。自己免疫は、例えば神経組織および眼（特に水晶体または角膜）のようなリンパ球に通常は露出されない組織の中でも起きうる。通常はリンパ球に露出されない組織がこれらの細胞に露出されるようになる場合には、リンパ球がこれらの組織の表面抗原を「非自己」と認識することがありそして後から免疫応答が起きる。自己免疫は宿主の自己抗原に敏感な抗原の動物への導入の結果としても生じうる。哺乳動物自身の組織中の抗原と同様であるかまたはそれと交差反応する抗原はリンパ球をして「自己」および「非自己」抗原の両者を認識しそして破壊せしめる。

【0003】

自己免疫疾患の病因はインターフェロン類およびしばしばインターフェロン類から誘導される他のサイトカイン類の合成における混乱に関連することが示唆された（スクルコビッチ（Skurkovich）他著、ネーチャー（Nature）、1974年、217：551-552；スクルコビッチ（Skurkovich）他著、アナルス・オブ・アレルギー（Annals of Allergy）、1975年、35：356；スクルコ

10

20

30

40

50

ビッチ (Skurkovich) 他著、J・インターフェロン・リス (J. Interferon Res.)、1992年、12、Suppl. 1: S110; スクルコビッチ (Skurkovich) 他著、メド・ヒポス (Med. Hypoth.)、1993年、41: 177-185; スクルコビッチ (Skurkovich) 他著、メド・ヒポス (Med. Hypoth.)、1994年、42: 27-35; グリンゲリ (Gringari) 他著、セル・モル・バイオル (Cell. Mol. Biol.)、1995年、41(3): 381-387; グリンゲリ (Gringari) 他著、J・アクイアード・イミュン・デフィス・シンドロ (J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.)、1996年、13: 55-67) (非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7 参照)。特に、インターフェロン (IFN) ガンマは自己免疫機能不全において有意な病因役割を演ずる。IFN ガンマは細胞を刺激して高められた水準のHLA種II抗原を生成する (フェルドマン (Feldman) 他著、「インターフェロンズ・アンド・オートイミュニティ」 (" Interferons and Autoimmunity ")、IFN 、アカデミック・プレス (Academic Press)、1987年、p. 75) (非特許文献8 参照)。IFN ガンマが腫瘍壞死因子 (TNF) の生成に関与することが知られており、そして TNF も自己抗体の生成の刺激において役割を演ずることも知られている。これに関するところ、これらのサイトカイン類を調節する療法が開発された。IFN ガンマに対する抗体を用いる数種の自己免疫疾病的処置における臨床的成功が報告された (スクルコビッチ (Skurkovich) 他著、米国特許第5,888,511号) (特許文献1 参照)。

10

20

30

40

【0004】

しかしながら、自己免疫応答は例えば多発性硬化症および慢性関節リューマチのような疾病において典型的であると考えられるが、自己免疫または過免疫応答の処置が充分に探査されていないある医療分野は移植療法の分野である。移植拒絶反応から生ずる自己免疫は移植被験者において特徴的である。移植の拒絶反応は侵襲性異質抗原に対する生物の正常な反応である。特に、例えば通常はリンパ球に露出されない眼、皮膚、心臓、腎臓、肝臓、骨髄、および他の器官のような組織または器官の移植は高い割合の拒絶反応があり、その拒絶反応は大部分過免疫反応の結果である。

【0005】

眼内の組織移植の拒絶反応を包含する過免疫反応は相当重要である。角膜移植片、水晶体代替品などは、人間被験者内に移植される場合には、しばしば拒絶反応がある。さらに、眼の他の疾病、例えば、乾性角結膜炎 (ドライアイ症候群)、上強膜炎、強膜炎、モーレン潰瘍、眼球瘢痕性類天疱瘡、眼窩偽腫瘍、虹彩炎、中心性漿液性網膜症、グレーヴズ眼症、脈絡網膜炎、シェーグレン症候群、およびスティーヴェンス・ジョンソン症候群、も眼内の過免疫反応の結果でありうる。全身的感染症、例えば結核、梅毒、エイズ、トキソプラスマ感染症、およびサイトメガロウイルス網膜炎もまた、ブドウ膜炎、眼球陥没症、網膜炎、脈絡膜炎、および網膜壞死を包含するがそれらに限定されない眼の疾病を引き起こしうる。これらのタイプの過免疫反応は典型的にはぼやけた視力をもたらしそしてついには失明をもたらす。そのような過免疫応答を処置するための最近の療法は、デキサメタゾン (dexamethasone) を包含するコルチコステロイド処置および抗炎症性調剤を用いる処置を包含する。現在まで、哺乳動物の眼および他の器官内の過免疫反応を有効に処置するための好結果を収めるかもしくは長期にわたる方法または組成物はない。本発明はそのような方法および組成物を提供する。

30

40

【特許文献1】

米国特許第5,888,511号明細書

【非特許文献1】

スクルコビッチ (Skurkovich) 他著、ネーチャー (Nature)、1974年、217: 551-552: S110

【非特許文献2】

スクルコビッチ (Skurkovich) 他著、アナルス・オブ・アレルギー (Anna 50

l s o f A l l e r g y) 、 1 9 7 5 年、 3 5 : 3 5 6

【非特許文献 3】

スクリコビッチ (S k u r k o v i c h) 他著、 J · インターフェロン · リス (J . I n t e r f e r o n R e s .) 、 1 9 9 2 年、 1 2 、 S u p p l . 1

【非特許文献 4】

スクリコビッチ (S k u r k o v i c h) 他著、 メド · ヒポス (M e d . H y p o t h .) 、 1 9 9 3 年、 4 1 : 1 7 7 - 1 8 5

【非特許文献 5】

スクリコビッチ (S k u r k o v i c h) 他著、 メド · ヒポス (M e d . H y p o t h .) 、 1 9 9 4 年、 4 2 : 2 7 - 3 5

10

【非特許文献 6】

グリンゲリ (G r i n g e r i) 他著、 セル · モル · バイオル (C e l l . M o l . B i o l .) 、 1 9 9 5 年、 4 1 (3) : 3 8 1 - 3 8 7

【非特許文献 7】

グリンゲリ (G r i n g e r i) 他著、 J · アクイア - イミュン · デフィス · シンドロ (J . A c q u i r . I m m u n . D e f i c . S y n d r .) 、 1 9 9 6 年、 1 3 : 5 5 - 6 7

【非特許文献 8】

フェルドマン (F e l d m a n) 他著、「インターフェロンズ · アンド · オートイミュニティ」 (" I n t e r f e r o n s a n d A u t o i m m u n i t y ") 、 I F N 20 、 アカデミック · プレス (A c a d e m i c P r e s s) 、 1 9 8 7 年、 p . 7 5

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、 哺乳動物における眼に関連する組織または器官の拒絶反応を処置する方法に関する。この方法は、 哺乳動物の眼にインターフェロンガンマに対する抗体を含んでなる組成物を投与することを含んでなる。

【0007】

一面では、 この組成物は哺乳動物の眼に局所投与される。

【0008】

他の面では、 哺乳動物は人間である。

【0009】

さらに他の面では、 移植は角膜移植である。

【0010】

本発明のさらに他の面では、 抗体はポリクローナル抗体、 モノクローナル抗体、 ヒト化された (h u m a n i z e d) 抗体、 またはインターフェロンガンマに対する抗体の生物学的に活性な断片である。

【0011】

さらに他の面では、 組成物は製薬学的に許容可能な担体中に懸濁される。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、 眼内に自己免疫反応を有する動物へのインターフェロン (I F N) ガンマに対する抗体の投与が自己免疫反応の軽減または排除において有用であるという発見を含んでなり且つそれを利用する。眼内のそのような自己免疫反応は、 眼組織の移植片並びにシェーグレン症候群、 多発性硬化症、 サルコイドーシス、 強直性脊椎炎、 乾性角結膜炎 (ドライアイ症候群) 、 上強膜炎、 強膜炎、 モーレン潰瘍、 眼球瘢痕性類天疱瘍、 眼窩偽腫瘍、 虹彩炎、 中心性漿液性網膜症、 グレーヴズ眼症、 脈絡網膜炎、 スティーヴェンス - ジョンソン症候群、 ブドウ膜炎、 眼球陥没症、 網膜炎、 脈絡膜炎、 および網膜壞死を包含するがそれらに限定されない眼の疾患の結果として起こりうる。眼内の自己免疫反応は、 エイズ、 梅毒、 トキソプラスマ感染症、 および結核を包含するがそれらに限定されない感染性疾

40

50

病の結果としても起こりうる。自己免疫は眼内への組織の移植の結果としても起こりうる。

【 0 0 1 3 】

I FN ガンマに対する抗体が眼内の出血および滲出液集合により特徴づけられる眼の疾病的処置にも有用であることは、ここに開示された実施例からすぐ明らかになる。出血および / または滲出液は眼の前方室内で集めることができ、そしてそれらは炎症反応の特徴的な結果である。典型的には、これらの徴候は移植拒絶反応（すなわち、過免疫応答）中に起きる。しかしながら、現在知られていない哺乳動物の眼の自己免疫疾病が知られた時点で本発明の方法の使用で処置可能でありうるため、本発明はここに示されている実施例だけに限定されるものではない。

10

【 0 0 1 4 】

本発明は、哺乳動物の眼内の過免疫応答により特徴づけられる眼の疾病的処置方法を含む。簡単に述べると、この方法は冒された眼にインターフェロンガンマに対する抗体を直接適用することを含んでなる。この方法を使用して哺乳動物の自己免疫性眼疾病を処置することができるが、好ましくは哺乳動物は人間である。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法で有用なインターフェロンガンマに対する抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、合成抗体、例えばインターフェロンガンマに対する抗体の生物学的に活性な断片であることができ、或いはそれらはヒト化されたモノクローナル抗体であってもよい。本発明の方法で有用なタイプの抗体の各々の製造および使用方法をここに記載する。さらに、人間ドナーから得られるインターフェロンガンマに対するヒトの抗体を本発明で使用することもできる。

20

【 0 0 1 6 】

本発明の方法で使用される抗体がポリクローナル抗体 (IgG) である場合には、適当な動物にインターフェロンガンマまたはその断片を接種することにより抗体が生成される。インターフェロンガンマに特異的に結合する接種された動物で製造される抗体を次に動物から得られた流体から単離する。インターフェロンガンマ抗体をこの方法で、例えば山羊、羊、馬、ウサギ、およびロバを包含するがそれらに限定されない数種の非人間哺乳動物内で生成することができる。ポリクローナル抗体を生成する方法は当該技術で既知であり、そして例えばハルロウ (H a r l o w) 他 (A n t i b o d i e s) 、ア・ラボラトリー・マニュアル (A L a b o r a t o r y M a n u a l) 、ニューヨーク (N. Y.) 、コールド・スプリング・ハーバー (C o l d S p r i n g H a r b o r) 、1988年) に記載されている。これらの方法は抗体技術で一般的に使用されているため、ここでは繰り返さない。

30

【 0 0 1 7 】

本発明の方法で使用される抗体がモノクローナル抗体である場合には、抗体は例えばハルロウ他 (上記参照) およびツズンスキイ (T u s z y n s k i) 他 (ブラッド (B l o o d) 、1988年、72:109-115) に記載されているような既知のモノクローナル抗体製造工程を用いて生成される。これらの方法は当該技術で既知であるため、それらはここでは繰り返さない。一般的に、所望する抗原に対して指定されたモノクローナル抗体はここに引用されるような標準的工程を用いて抗原で免疫感作させたマウスから生成される。インターフェロンガンマの全長またはペプチド断片に対して指定されたモノクローナル抗体はハルロウ他 (上記参照) に記載された技術を用いて製造することができる。

40

【 0 0 1 8 】

本発明の方法で使用される抗体がインターフェロンガンマに対する抗体に対応する生物学的に活性な断片または合成抗体である場合には、抗体は以下の通りにして製造される：所望する抗体またはその断片をコードする核酸を適当なベクター中にクローン化する。ベクターを大量の抗体またはその断片の生成用に適する細胞内にトランスフェクトする。所望する抗体をコードするDNAを次に細胞内で発現させ、それにより抗体を製造する。所望するペプチドをコードする核酸を、当該技術で利用できそして例えばライト (W r i g h t)

50

t) 他 (クリティカル・レブ・イン・イミュノル (C r i t i c a l R e v . i n I m m u n o l .) 、 1992 年、 12 (3 , 4) : 125 - 168) およびその中に引用されている参考文献に記載されている技術を用いてクローン化しそしてシークエンシングすることができる。或いは、所望する抗体またはその断片を化学合成技術を用いて合成することもできる。抗体のアミノ酸配列が既知である場合には、所望する抗体を当該技術で既知の方法を用いて化学的に合成することができる。

【 0019 】

本発明は、 IFN ガンマエピトープと特異的に反応性であるヒト化された抗体も包含する。これらの抗体はヒト IFN ガンマを中和可能である。本発明のヒト化された抗体はヒトのフレームワークを有しそして IFN ガンマと特異的に反応性である抗体、典型的にはマウス抗体、からの 1 つもしくはそれ以上の相補性決定部位 (C R D) を有する。それ故、本発明のヒト化されたガンマ IFN 抗体はインターフェロンガンマの過剰生成を含む自己免疫反応により特徴づけられる眼の疾病および他の器官の疾患の処置において有用である。

10

【 0020 】

本発明で使用される抗体がヒト化される場合には、抗体はクイーン (Queen) 他 (米国特許第 6,180,370 号) 、ライト (Wright) 他 (上記参照) およびそこに引用される参考文献、またはグー (Gu) 他 (スロンボシス・アンド・ヘマトシスト (Thrombosis and Hematocyst) 、 1997 年、 77 (4) : 755 - 759) に記載されている通りにして生成することができる。クイーン他に開示されている方法は、ある部分、受容体ヒトフレームワーク部位をコードする DNA 部分に結合された例えはヒト IFN ガンマのような所望する抗原に結合可能なドナー免疫グロブリンからの重鎖および軽鎖相補性決定部位 (CDR) をコードする組み換え DNA 部分を発現することにより製造される所望するヒト化された免疫グロブリン類に向けられている。一般的に述べると、クイーンの特許における発明は実質的にいずれかのヒト化された免疫グロブリンの設計に向けられた適用性を有する。クイーンは、 DNA 部分が典型的には自然集合または異種プロモーター部位を包含するヒト化された免疫グロブリンコード配列に操作的に結合される発現調節 DNA 配列を含むであろう。発現調節配列は真核宿主細胞を形質転換もしくはトランスフェクトしうるベクター中の真核細胞プロモーター系ができる、または発現調節配列は原核宿主細胞を形質転換もしくはトランスフェクトしうるベクター中の原核細胞プロモーター系であることもできる。ベクターが適当な宿主に導入されたら、宿主は導入されたヌクレオチド配列の高水準発現に適する条件下に保たれ、そして所望するならヒト化された軽鎖、重鎖、軽鎖 / 重鎖二量体または無傷抗体、結合断片或いは他の免疫グロブリン形態の集合および精製を行なうことができる (ここに引用することにより本発明の内容となるベイチョク (Beychok) 著、セルズ・オブ・イミュノグロブリン・シンセシス (Cells of Immunoglobulin Synthesis) 、ニューヨーク (New York) 、アカデミック・プレス (Academic Press) 、 1979 年) 。

20

30

30

【 0021 】

種々のヒト細胞からのヒト定常部 (CDR) DNA 配列を既知の工程に従い単離することができる。好ましくは、ヒト定常部 DNA 配列は国際公開第 87/02671 号に記載されているように不死化された B 細胞から単離される。本発明の抗体の製造において有用な CDR は同様にヒト IFN ガンマに結合可能なモノクローナル抗体をコードする DNA から誘導することができる。そのようなヒト化された抗体は既知の方法を用いて、マウス、ラット、ウサギまたは他の脊椎動物を包含するがそれらに限定されない抗体を生成可能ないずれかの普遍的な哺乳動物源で生成することができる。定常部およびフレームワーク DNA 配列用に適する細胞並びに抗体が発現され且つ分泌される宿主細胞はメリーランド州、ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) のような多くの出所から得ることができる。

40

50

【0022】

以上で論じたヒト化されたIFNガンマの他に、本来のIFNガンマ抗体配列に対する別の「実質的に相同性である」修飾を当業者に既知である種々の組み換えDNA技術を用いて容易に設計しそして製造することができる。さらに、種々の異なるヒトフレームワーク部位を単独でまたは組み合わせてIFNガンマに指定された抗体をヒト化するための基礎として使用することができる。一般的に、遺伝子の修飾は種々の既知の技術、例えば部位指定突然変異(グリマン(Gillman)およびスミス(Smith)著、ジーン(Gene)、1979年、8、81-97;ロバーツ(Roberts)他著、ネーチャー(Nature)、1987年、328、731-734)、を用いて容易に行なうことができる。

10

【0023】

IFNガンマ抗体配列と実質的に相同性である配列は、参照IFNガンマ免疫グロブリン蛋白質との少なくとも約85%の相同性、普通は少なくとも約90%のそして好ましくは少なくとも約95%の相同性を示すものである。

【0024】

或いは、主要抗体構造の一部だけを含んでなるポリペプチド断片を製造することもでき、それらの断片はIFNガンマ抗体の1つもしくはそれ以上の機能を有する。これらのポリペプチド断片は当該技術で既知の方法を使用する無傷の抗体の蛋白質分解により生成することができ、或いは断片を含んでなるベクター中の所望する位置に部位指定突然変異を用いて停止コドンを挿入することによりそれらを生成することもできる。

20

【0025】

IFNガンマに対する抗体をコードするDNAは、抗体をコードするDNAに操作的に結合される適当なプロモーター調節配列により誘導される宿主細胞の中で発現される。典型的には、抗体をコードするDNAを適当な発現ベクター中に、抗体をコードする配列がプロモーター/調節配列に操作的に結合されるような方法で、クローン化する。そのような発現ベクターは典型的には宿主生物内でエピソームとしてのまたは宿主染色体DNAの一部部分としての複製コンピメントである。普通、発現ベクターは検出可能なマーカー蛋白質をコードするDNA、例えばテトラシクリンまたはネオマイシン耐性をコードする遺伝子、を含んでおり、所望するDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするであろう(米国特許第4,704,362号)。

30

【0026】

大腸菌が、本発明の抗体をコードするDNA配列の発現に特に有用な原核細胞宿主の一例である。使用に適する他の微生物宿主は枯草菌並びに他の腸内細菌、例えばサルモネラ、セラチア、および種々のシードモナス種の選択される構成員、を包含するがそれらに限定されない。ベクターが典型的には宿主細胞と相容性であるような発現調節配列を含んでなるであろう所望する宿主細胞に適する発現ベクターを作成することが可能である。ラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系、ベータ-ラクタマーゼプロモーター系、またはファージラムダから誘導されるプロモーター系を包含するがそれらに限定されない種々のプロモーター/調節配列がこれらの細胞内で遺伝子の発現用に有用である。プロモーターは典型的には、抗体のDNA配列がそれに操作的に結合されている抗体の発現を調節するであろうし、このプロモーターはオペレーター配列と場合により結合されておりそして一般的には所望する抗体の転写および翻訳を開始しそして完了させるためのRNAポリメラーゼおよびリボソーム結合部位配列などを含んでなる。

40

【0027】

酵母が、本発明の抗体をコードするDNA配列をクローン化するのに有用な真核細胞宿主の一例である。サッカロミセスが好ましい真核細胞宿主である。真核細胞中の核酸の発現を誘発するプロモーター/調節配列は3-ホスホグリセラートキナーゼプロモーター/調節剤配列および他の糖分解酵素をコードする核酸の発現を誘発するプロモーター/調節配列を包含するがそれらに限定されない。

【0028】

50

微生物の他に、本発明の抗体を発現しそして製造するために哺乳動物組織細胞培養物を使用することができる（ワインナッカー（Winnacker）、「フロム・ジーンズ・ツー・クローンズ」（“From Genes to Clones,”、ニューヨーク（N.Y.）、VCH・パブリッシャーズ・ニューヨーク（VCH Publishers New York）、1987年）。真核細胞が抗体の発現に好ましく、そしてチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、種々のCOS細胞系統、HeLa細胞、好ましくは骨髄腫細胞系統、および形質転換されたB細胞またはハイブリドーマを包含するがそれらに限定されない多くの適当な宿主細胞系統が当該技術で開発されてきた。これらの細胞中で所望する配列を発現する発現ベクターは発現調節配列、例えばDNA複製の出所、プロモーター、エンハンサー（クイーン（Queen）他著、イミュノル・レヴ（Immuno Rev.）、1986年、89、49-68）、並びに必須プロセシング配列部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、並びに転写開始および終結配列を包含しうる。好ましい発現調節配列は、免疫グロブリン遺伝子、シミアンウイルス（SV）40、アデノウイルス、シトメガロウイルス、牛パピロマウイルスなどから誘導されるプロモーターである。

10

20

30

40

【0029】

当該DNA部分を含有するベクターは既知の方法により宿主細胞中に伝達することができ、それは細胞宿主のタイプに依存して変動する。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは一般的に原核細胞用に利用され、磷酸カルシウム処理または電気穿孔は他の細胞宿主用に使用することができる。（サンブルック（Sambrook）他著、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）、ア・ラボラトリ・マニュアル（A Laboratory Manual）、ニューヨーク（NY）、コールド・スプリング・ハーバー（Cold Spring Harbor）、1989）。

20

30

【0030】

発現されると、抗体全体、それから誘導される二量体、個別の軽鎖および重鎖、または他の形態の抗体を当該技術で既知である標準的方法に従い精製することができる。そのような工程は硫酸アンモニウム沈澱、親和性カラムの使用、普通のカラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを包含するがそれらに限定されない（一般的には、R・スコーペス（R. Scopes）著、「プロテイン・ピューリフィケーション（“Protein Purification”）、ニューヨーク（N.Y.）、スプリングル・フェルラグ（Springer-Verlag、1982年参照）。少なくとも約90%～95%の同一性の実質的に純粋な抗体が好ましく、そして少なくとも98%～99%もしくはそれ以上の同一性を有する抗体が薬剤用途にとって最も好ましい。精製されたら、抗体を次に治療用に使用することができる。

30

【0031】

本発明の抗体は治療環境で製薬学的に許容可能な担体中で単独で使用することができ、或いはそれらを化学療法剤、例えば非ステロイド抗炎症薬、コルチコステロイド、または免疫抑制剤、と一緒に使用することができる。抗体またはそれから誘導される複合体は投与方式に依存して変動する製薬学的に許容される薬用量形態で製造することができる。

【0032】

それ故、本発明は眼の疾病的処置における使用のためのIFNガンマと結合する抗体を含んでなる新規な組成物を包含する。上記のように、抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化されたモノクローナル抗体、もしくはモノクローナルキメラ抗体、またはここに引用された抗体のいずれかのタイプの生物学的に活性な断片でありうる。各々のタイプの抗体の作成はここで論じられておりそして本発明の新規な方法における使用のための抗体の作成に適用される。一般的に、モノクローナルヒト化抗体は非免疫原性でありそしてその結果として免疫応答を誘発しないため、それらを使用することが好ましい。しかしながら、いずれのタイプの抗体でも本発明で使用することができる。

【0033】

本発明の方法はIFNガンマの抗体の使用に限定されることを意図しない。IFNガンマ

50

に対する抑制剤も本発明の方法で有用である。そのような抑制剤はIFNガンマの機能を阻止するペプチド類、IFNガンマ受容体、IFNガンマ受容体に対する抗体、IFNベータ、インターロイキン-10(IL-10)、およびそれらのいずれかの組み合わせを包含するがそれらに限定されない。

【0034】

本発明を実施にするために有用な薬剤組成物は1日当たり1キログラム当たり1マイクログラム～1日あたり1キログラム当たり100ミリグラムの間の薬用量を送達するように投与することができる。

【0035】

本発明の方法で有用な薬剤組成物は眼用調剤、注射調剤、または他の同様な調剤状で局所にまたは全身的に投与することができる。IFNガンマに対する抗体の他に、そのような薬剤組成物は製薬学的に許容可能な担体並びに薬品投与を強め且つ促進することが知られる他の成分を含有することができる。本発明の方法に従いガンマIFN抗体を投与するために、他の可能な調剤、例えばナノ粒子、リポソーム、再密閉した赤血球、および免疫学をベースにした系を使用することもできる。

【0036】

製薬学的に調合され且つ眼内の自己免疫反応の処置のために動物に投与することができるIFNガンマに対する抗体を含んでなる化合物をここに記載する。

【0037】

本発明は、活性成分としてIFNガンマに対する抗体を含んでなる薬剤組成物の製造および使用を包括する。そのような薬剤組成物は被験者への投与に適する形態で活性成分だけから構成されていてもよく、或いは薬剤組成物が活性成分および1種もしくはそれ以上の製薬学的に許容可能な担体、1種もしくはそれ以上の追加成分、またはこれらの数種の組み合わせを含んでなることもできる。当該技術で既知であるように、活性成分は薬剤組成物中に生理的に許容可能なエステルまたは塩の形態で、例えば生理的に許容可能なカチオンまたはアニオンと組み合わせて、存在することができる。

【0038】

ここで使用される用語「製薬学的に許容可能な担体」は、活性成分がそれと組み合わされておりそして組み合わせ後に活性成分を被験者に投与するために使用できる化学的組成物を意味する。

【0039】

ここで使用される用語「生理的に許容可能な」エステルまたは塩は、薬剤組成物のいずれの他の成分とも相容性であり、組成物を投与する被験者にとって有害でない活性成分のエステルまたは塩形態を意味する。

【0040】

ここに記載された薬剤組成物の調剤は、薬理学技術で既知であるかまたは今後開発されるいずれかの方法により製造することができる。一般的に、そのような製造方法は活性成分を担体または1種もしくはそれ以上の他の修飾成分と一緒に結合し、そして次に、必要なならまたは望まれるなら、製品を所望する単一または複数の薬用量単位に成形または包装する段階を包含する。

【0041】

ここで提供される薬剤組成物の記述は原則的に人間に対する医療用投与に適する薬剤組成物に向けられているが、そのような組成物は全ての種類の動物に対する投与に一般的に適することは当業者は理解するであろう。組成物を種々の動物に対する投与に適合させるための人間に対する投与に適する薬剤組成物の改変は良く理解されており、そして通常の専門的な動物薬理学者は通常実験だけでそのような改変を設定しそして実施することができる。

【0042】

本発明の薬剤組成物は、ばらで、単一単位薬用量として、または複数の単一単位薬用量として、製造、包装または販売することができる。ここで使用される「単位薬用量」は予め

10

20

30

40

50

決められた量の活性成分を含んでなる薬剤組成物の個別量である。活性成分の量は一般的に、被験者に投与されるであろう活性成分の薬用量またはそのような薬用量の使いやすい部分、例えばそのような薬用量の1/2もしくは1/3、に相当する。

【0043】

本発明の薬剤組成物中の活性成分、製薬学的に許容可能な担体、およびいずれかの追加成分の相対量は、処置される被験者の特性、大きさ、および状態に依存してさらに組成物を投与する方式に依存して、変動するであろう。例えば、組成物は0.1%~100% (w/w) の間の活性成分を含んでなることができる。

【0044】

活性成分の他に、本発明の薬剤組成物は1種もしくはそれ以上の追加の製薬学的活性剤をさらに含んでなることができる。特に意図する追加剤はIFNガンマ受容体、IFNガンマ受容体に対する抗体、IFNベータ、インターロイキン-10 (IL-10)、およびそれらのいずれかの組み合わせを包含する。

【0045】

本発明の薬剤組成物の調節放出性または持続放出性調剤は従来技術を用いて製造することができる。

【0046】

局所投与に適する調剤は、液体または半液体調剤、例えばリニメント剤、ローション剤、水中油滴型もしくは油中水滴型エマルジョン、例えばクリーム剤、軟膏剤もしくはペースト剤、および液剤または懸濁剤、を包含するがそれらに限定されない。局所投与可能な調剤は、例えば、約1%~約10% (w/w) の活性成分を含んでなることができ、活性成分の濃度は溶媒中の活性成分の溶解度限度ほどに高くすることもできる。局所投与用調剤は1種もしくはそれ以上のここに記載された追加成分をさらに含んでなることができる。本発明の薬剤組成物のイオン泳動投与がここでは局所投与の一形態であると考えられる。

【0047】

薬剤組成物は殺菌性の注射可能な水性もしくは油状の懸濁剤または液剤の形態で製造、包装または販売することができる。この懸濁剤または液剤は既知の技術に従い調合することができ、そして活性成分の他に追加成分、例えばここに記載された分散剤、湿潤剤、または懸濁化剤、を含んでなることができる。そのような殺菌性の注射可能な調剤は、無毒の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒、例えば水または1,3-ブタンジオール、を用いて製造することができる。他の許容可能な希釈剤および溶媒はリンゲル液、生理食塩液、および不揮発性油、例えば合成モノ-もしくはジ-グリセリド類、を包含するがそれらに限定されない。使用できる他の非経口投与可能調剤は、活性成分を微結晶形態で、リポソーム調剤で、または生体内分解性重合体系の成分として含んでなるものを包含する。持続放出または移植用の組成物は製薬学的に許容可能な重合体状または疎水性の物質、例えばエマルジョン、イオン交換樹脂、微溶性重合体、または微溶性塩、を含んでなることができる。

【0048】

本発明の薬剤組成物は眼に対する投与に適する調剤に製造、包装または販売することができる。そのような調剤は、例えば、水性または油状の液体担体中の活性成分の0.1%~1.0% (w/w) 溶液または懸濁液を包含する眼用滴剤の形態でありうる。そのような滴剤はさらに緩衝剤、塩類、または1種もしくはそれ以上のここに記載された追加成分を含んでなることができる。使用できる他の投与可能調剤は、活性成分を微結晶形態でまたはリポソーム調剤中に含んでなるものを包含する。

【0049】

ここで使用される「追加成分」は1種もしくはそれ以上の下記のものを包含するがそれらに限定されない：賦形剤、界面活性剤、分散剤、不活性希釈剤、造粒剤および崩壊剤、結合剤、潤滑剤、甘味剤、香味剤、着色剤、防腐剤、生理的に崩壊可能な組成物、例えばゼラチン、水性賦形剤および溶媒、油状賦形剤および溶媒、懸濁化剤、分散または湿潤剤、乳化剤、解乳化剤、緩衝剤、塩類、濃稠化剤、充填剤、乳化剤、酸化防止剤、抗生物質、

10

20

30

40

50

抗カビ・菌剤、安定剤、および製薬学的に許容可能な重合体状または疎水性の物質。本発明の薬剤組成物中に含むことができる他の「追加成分」は当業界で既知でありそして例えれば引用することにより本発明の内容となるゲナロ (Genaro) 編集、レミントンズ・ファーマシュー・ティカル・サイエンセス (Remington's Pharmaceutical Sciences)、ペンシルバニア州 (PA)、イーストン (Easton)、マック・パブリッシング・カンパニー (Mack Publishing Co.)、1985年に記載されている。

【0050】

この化合物は動物に対して1日に数回の頻度で投与することができ、或いはそれをそれより頻繁でなく、例えは1日に1回、1週間に1回、2週間に1回、1月に1回またはそれより頻繁でなく、例えは数ヶ月に1回もしくは1年に1回以下で、投与することもできる。投与頻度は当業者に容易に明らかになりそして多くの因子、例えは、それらに限定されないが処置しようとする疾病のタイプおよび重篤度、動物のタイプおよび年齢など、に依存するであろう。

【0051】

好ましくは、本発明の組成物は局所投与される。組成物は下瞼に軟膏剤として投与することができる。好ましくは、組成物は眼用滴剤の形態で投与される。しかしながら、IFN-ガンマに対する抗体を含んでなる組成物を非経口的に投与することもできる。

【0052】

IFN-ガンマに対する抗体は冒された眼に投与される組成物の中である範囲の濃度で存在することができる。

【0053】

IFN-ガンマに対する抗体を含んでなる組成物は冒された眼に1日に数回投与することができる。好ましくは、組成物は1日に1~5回投与され、そしてより好ましくは組成物は1日に1~3回投与される。1日当たり3回の組成物の投与が最も好ましい。

【0054】

IFN-ガンマ抗体は被験者の冒された眼に対して自己免疫反応の影響を治癒するのに必要な長さにわたり投与することができる。好ましくは、被験者は約5~約10日間にわたり処置を受ける。より好ましくは、被験者は約5~約7日間にわたり処置を受ける。IFN-ガンマ抗体を投与する全処置を繰り返すことができる。

【0055】

実施例により証明されるように、本発明は眼に関連する組織または器官の移植の拒絶反応から生ずる過免疫応答の処置において特に有用である。本発明はまた、本発明の組成物が移植手術の約1日前、手術中、および手術直後に投与される場合の移植された組織または器官の予期される拒絶反応の予防においても有用である。好ましい処置期間は約7日間である。

【0056】

冒された眼に対するIFN-ガンマ抗体の投与は、IFN-ガンマの過剰生成により引き起こされる眼および眼の神経細胞の損傷に対しても有効である。IFN-ガンマの過剰生成も眼内の自己免疫応答を誘発しうる。それ故、IFN-ガンマの過剰生成を引き起こす疾病に罹った眼に対するIFN-ガンマ抗体の投与も本発明の範囲内である。

定義

不定冠詞はここでは1つもしくは1つより多い(すなわち少なくとも1つの)その冠詞の文法上の対象をさす。例えは、「要素」は1つの要素または1つより多い要素を意味する。

【0057】

ここで使用される用語「抗体」は、抗原上で特異的エピトープの特異的に結合しうる免疫グロブリン分子をさす。抗体は天然出所からまたは組み換え出所から誘導される無傷の免疫グロブリン類であることができそして無傷の免疫グロブリン類の免疫反応性部分であることができる。抗体は典型的には免疫グロブリン分子の四量体である。本発明における抗

10

20

30

40

50

体は、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)₂、並びに単鎖抗体およびヒト化された抗体を包含する多種の形態で存在することができる（ハルロウ（Harlow）他著、ユージング・アンチボディーズ（Using Antibodies）、ア・ラボラトリー・マニュアル（A Laboratory Manual）、ニューヨーク（NY）、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、1999年；ハルロウ（Harlow）他著、ユージング・アンチボディーズ（Using Antibodies）、ア・ラボラトリー・マニュアル（A Laboratory Manual）、ニューヨーク（New York）、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、1989年；ハウストン（Houston）他著、プロセ・ナル・アカデ・サイ（Proc. Natl. Acad. Sci.）、米国（USA）、1988年、85：5879-5883；バード（Bird）他著、サイエンス（Science）、1988年、242：423-426）。

10

20

30

40

50

【0058】

ここで使用される用語「合成抗体」は、組み換えDNA技術を用いて生成される抗体、例えば、ここに記載されたバクテリオファージにより発現される抗体、を意味する。この用語は、抗体をコードするDNA分子の合成により生成されそしてそのDNA分子が抗体蛋白質または抗体を特異化するアミノ酸配列を発現する抗体を意味するとも解釈すべきであり、ここでDNAまたはアミノ酸配列は当該技術で利用でき且つ既知である合成DNAまたはアミノ酸配列技術を用いて得られる。

【0059】

用語「生物学的に活性な抗体断片」は、IFNガンマに特異的に結合する能力を保有する抗体の断片を意味する。

【0060】

「疾病」は、動物がホメオスタシスを保つことができず且つ疾病が緩和された場合に動物の健康が劣化し続ける動物の健康状態である。本出願中のこの疾病という用語の使用は疾病、障害、および症状の用語を包括することを意味する。

【0061】

疾病の「処置」は、疾病の徴候の重篤度、そのような徴候が被験者により体験される頻度、または両者が減じられるかまたは排除される時に発生する。「処置」は予期される疾病状態の予防も包括する。例えば、移植拒絶反応の処置は拒絶反応がすでに起きた後および予期される拒絶反応を予防するために移植手術後のある期間内でのIFNガンマに対する抗体を含んでなる組成物の使用を包含する。好ましい手術後期間は約7日間である。

30

【0062】

ここで使用される用語「特異的に結合する」は、IFNガンマを認識し且つ結合するが試料中の他の分子は実質的に認識または結合しない抗体を意味する。

【0063】

「自己免疫応答」は、疾病状態中に高まった免疫応答が宿主に有害であるような免疫系における変化をさす。典型的には、免疫系または他の免疫系成分、例えば宿主により製造される抗体、の細胞は「自己」抗原を外来抗原として認識する。

40

【0064】

「過免疫応答」は免疫系の1つもしくはそれ以上のサイトカイン類の過剰発現により特徴づけられる自己免疫応答をさす。

【0065】

ここで使用される「眼に関連する組織または器官」は眼を構成する組織および器官をさす。これらは解剖学教本、例えばウィリアムズ（Williams）他編集、グレイズ・アナトミー（Gray's Anatomy）、フィラデルフィア、1980年、36版、W.B.サウダーズ・カンパニー（Saunders Co.）で分類される眼の全部分を包含する。

【0066】

「角膜移植」は哺乳動物の眼内への角膜の挿入をさし、ここで挿入される角膜は哺乳動物の天然角膜でない。挿入される角膜は死体からであってよい。

【0067】

薬剤組成物が冒された領域に直接適用される場合には、それは「局所投与される」と言われる。例えば、眼用滴剤はクリーム剤および軟膏剤と同様に局所投与される。イオン泳動も局所投与の形態として包含される。

【0068】

「組み換えDNA」は天然では一緒にされない配列を有するポリヌクレオチドをさす。増加または集合させた組み換えポリヌクレオチドを適當なベクター中に含ませることもでき、そしてベクターを使用して適當な宿主細胞を形質転換させることもできる。組み換えDNAポリヌクレオチドは非コード機能（例えばプロモーター、複製の出所、リボソーム結合部位など）を行なうこともできる。

10

【実施例】

【0069】

本発明を以下の実験例を参照して詳細にさらに記載する。これらの実施例は説明目的だけに示されており、そして特に断らない限り限定しようとするものではない。それ故、本発明は以下の実施例に何ら限定されるべきでなく、むしろ、ここに示されている教示の結果として明らかになるいすれかのそして全ての変更を包括すべきである。

【0070】

以下で報告される試験の各々で、抗体のFab2断片の濃度は50mg/mlの蛋白質であった。エライサ（ELISA）により測定される場合の抗IFNガンマ活性は1:10,000の希釈度で有意なシグナルを示した。断片は液体形態であった。抗体断片の液体調合物を1つの眼当たり2～3滴、1日当たり3回、7～10日間にわたり投与した。視力における改良および他の徴候を滴剤の添加後第二または第三日毎に頻繁に観察した。

20

【0071】

最近角膜移植手術を受けた3人の被験者で臨床試験を行なった。53歳の男性被験者Gは円錐角膜を処置するために角膜移植を受けた。手術は白濁部の摘出および人工水晶体の移植を含んでいた。被験者Gはその後、視力の劣化および角膜移植片の混濁により同定される移植拒絶反応を受けた。被験者Gを標準療法で処置されたが、治療効果はなかった。標準療法は、局所的に、滴剤もしくは軟膏剤の形態で、または静脈内に、結膜下注射により、経口的に、そして筋肉内に投与される、ステロイド類、抗炎症剤、抗生物質、もしくはビタミン類、またはいすれかの組み合わせであります。山羊抗ヒトインターフェロンガンマ抗体の断片が冒された眼に眼用滴剤の形態で外来被験者基準で投与された。滴剤は1日2滴を3回、7日間の期間にわたり投与された。被験者Gは2日間の処置後に視力の有意な改良を示した。さらに、角膜移植片は混濁状態からほとんど完全な透明状態に戻りそして角膜の周辺領域も有意により透明になった。

30

【0072】

39歳の男性被験者Pは1999年に円錐角膜を処置するために角膜移植を受けた。9ヶ月後に、被験者Pは移植拒絶反応と診断されそして静脈内および眼用滴剤の両方によるデキサメタゾン（dexamethasone）の25回投与で処置した。被験者Pは別のタイプの療法も受け、そして外来被験者基準で処置を続けた。一次移植拒絶反応から6ヶ月後に、被験者Pは二次移植拒絶反応と診断された。被験者Pは外来被験者基準で一次拒絶反応用に使用されたものと同じ療法で処置された。1ヶ月後に、被験者Pの以前の療法が停止されそして眼用滴剤の形態のインターフェロンガンマに対する抗体を用いる処置を開始した。1日後に、被験者Pは視力の改良を体験そして移植された角膜の周辺領域でより透明になった。処置の次の2日間にわたり、被験者Pは完全な角膜透明性および視力の劇的な改良を示した。

40

【0073】

53歳の女性被験者Fは化膿性角膜潰瘍および帯状疱疹を処置するために角膜移植および

50

白濁部の摘出を受けた。10日後に、移植片の拒絶反応があった。被験者Fは一次移植の拒絶反応から13日後に別の角膜移植を受けた。被験者Fは複数の抗生物質、ステロイド類、抗炎症性調剤、およびアトロピン(atropine)を用いる療法を受けた。行なわれた全ての療法にもかかわらず、被験者Fは依然として移植片の周りで化膿した輪を示し、移植片 자체が曇っており、そして眼室前方が出血し且つ滲出液で満たされていた。被験者Fの冒された眼を、2滴ずつ毎日3回投与される眼用滴剤の形態のインターフェロンガンマに対する抗体を用いて処置した。投与から3日後に、被験者Fの症状が改良した。移植片の周りの化膿した輪が有意に除かれ且つ白くなり、そして角膜が有意にさらに透明になった。室前方の滲出液および出血が完全に消え、そして冒された眼は有意に正常にみえた。

10

【0074】

開示された実験結果は、IFNガンマに対する抗体を用いる眼の過免疫疾患の処置が有効であることを立証している。

【0075】

ここに引用されている各々のおよび全ての特許、特許出願、および文献の開示はそれら全体が引用することにより本発明の内容となる。

【0076】

本発明を具体的な態様を参照して開示してきたが、発明の真の精神および範囲から逸脱せずに本発明の別の態様および変更を当業者により工夫できることは明らかである。添付された請求項は全てのそのような態様および同等な変更を包含することを意図する。

20

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
12 December 2002 (12.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/098460 A1(51) International Patent Classification⁵: A61K 39/395, 39/40

(74) Agents: DOYLE, Kathryn et al.; Morgan, Lewis & Bockius LLP, 1701 Market Street, Philadelphia, PA 19103 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/17677

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

(22) International Filing Date: 4 June 2002 (04.06.2002)

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

(25) Filing Language: English

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GF, GH,

(26) Publication Language: English

GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

(30) Priority Data: 60/295,895 5 June 2001 (05.06.2001) US

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

09/894,287 28 June 2001 (28.06.2001) US

MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,

(71) Applicant (for all designated States except US): ADVANCED BIOTHERAPY, INC. [US/US]; 6355 Topanga

VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Canyon Boulevard, Suite 510, Woodland Hills, CA 91367 (US).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GII, GM,

(72) Inventors; and

KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

(75) Inventors/Applicants (for US only): SKURKOVICH, Simon [US/US]; 802 Rollins Avenue, Rockville, MD 20852 (US); SKURKOVICH, Boris [US/US]; 18 Blasdell Avenue, Pawtucket, RI 02860 (US).

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,

NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

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



WO 02/098460 A1

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING HYPERIMMUNE RESPONSE IN THE EYE

(57) Abstract: The present invention comprises and utilizes methods and compositions for treating hyperimmune reactions in the eye. Compositions comprising antibodies to gamma interferon alone and in combination with other drugs are described. Also disclosed in the invention are methods of applying a composition comprising interferon gamma antibodies topically to the eye to treat hyperimmune reactions, such as transplant rejection, autoimmune diseases of the eye, and ocular disorders incidental to or connected with autoimmune diseases.

WO 02/098460

PCT/US02/17677

TITLE OF THE INVENTION

Compositions and Methods for Treating Hyperimmune Response in the Eye

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 The ability of the mammalian immune system to recognize "self" versus "non-self" antigens is vital to successful host defense against invading microorganisms. "Self" antigens are those which are not detectably different from an animal's own constituents, whereas "non-self" antigens are those which are detectably different from or foreign to the mammal's constituents. A normal mammalian immune system functions to recognize "non-self" 10 antigens" and attack and destroy them. An autoimmune disorder such as for example, rheumatoid arthritis, insulin-independent diabetes mellitus, acquired immune deficiency syndrome (AIDS), multiple sclerosis, and the like, results when the immune system identifies "self" antigens as "non-self", thereby initiating an immune response against the mammal's own body components (i.e., organs and/or tissues). This creates damage to the mammal's organs 15 and/or tissues and can result in serious illness or death.

15 Predispnsion of a mammal to an autoimmune disease is largely genetic; however, exogenous factors such as viruses, bacteria, or chemical agents may also play a role. Autoimmunity can also surface in tissues that are not normally exposed to lymphocytes such as for example, neural tissue and the eye (particularly the lens or the cornea). When a tissue not 20 normally exposed to lymphocytes becomes exposed to these cells, the lymphocytes may recognize the surface antigens of these tissues as "non-self" and an immune response may ensue. Autoimmunity may also develop as a result of the introduction into the animal of antigens which are sensitive to the host's self antigens. An antigen which is similar to or cross-reactive with an antigen in an mammal's own tissue may cause lymphocytes to recognize and 25 destroy both "self" and "non-self" antigens.

It has been suggested that the pathogenesis of autoimmune diseases is associated 30 with a disruption in synthesis of interferons and other cytokines often induced by interferons (Skurkovich et al., Nature 217:551-552, 1974; Skurkovich et al., Annals of Allergy, 35:356, 1975; Skurkovich et al., J. Interferon Res. 12, Suppl. 1:S110, 1992; Skurkovich et al., Med. Hypoth., 41:177-185, 1993; Skurkovich et al., Med. Hypoth., 42:27-35, 1994; Gringeri et al., Cell. Mol. Biol. 41(3):381-387, 1995; Gringeri et al., J. Acquir. Immun. Defic. Syndr., 13:55-67, 1996). In particular, interferon (IFN) gamma plays a significant pathogenic role in

WO 02/098460

PCT/US02/17677

autoimmune dysfunction. IFN gamma stimulates cells to produce elevated levels of HLA class II antigens (Feldman et al., 1987, "Interferons and Autoimmunity", In: IFN γ , p. 75, Academic Press). It is known that IFN gamma participates in the production of tumor necrosis factor (TNF), and it is also known that TNF also plays a role in stimulation of production of 5 autoantibodies. In view of this, therapies to modulate these cytokines have been developed. Clinical success in treating several autoimmune diseases using antibodies to IFN gamma has been reported (Skurkovich et al., U.S. Pat. No. 5,888,511).

10 However, while an autoimmune response is considered to be typical in diseases such as multiple sclerosis and rheumatoid arthritis, one area of medicine where treatment of autoimmune or hyperimmune responses has not been fully explored is the area of transplant therapy. Autoimmunity arising from transplant rejection is typical in transplant patients. Rejection of a transplant is the organism's normal reaction to invading foreign antigens. In 15 particular, transplantation of tissues or organs such as the eye, which is not normally exposed to lymphocytes, skin, heart, kidney, liver, bone marrow, and other organs, have a high rate of rejection, which rejection is largely the result of a hyperimmune reaction.

20 Hyperimmune reactions including rejection of tissue transplants in the eye are of considerable concern. Corneal transplants, lens replacements, and the like, are frequently rejected when transplanted into a human patient. In addition, other diseases in the eye, such as for example, keratoconjunctivitis sicca (dry eye syndrome), episcleritis, scleritis, Mooren's ulcer, ocular cicatricial pemphigoid, orbital pseudotumor, iritis, central serous retinopathy, 25 Graves' ophthalmopathy, chorioretinitis, Sjogren's syndrome, and Stevens-Johnson syndrome may also be the result of a hyperimmune reaction in the eye. Systemic infections, such as tuberculosis, syphilis, AIDS, toxoplasmosis infection, and cytomegalovirus retinitis, may also cause eye diseases, including but not limited to, uveitis, enophthalmitis, retinitis, choroiditis, and retinal necrosis. These types of hyperimmune reactions typically result in blurred vision 30 and eventually blindness. Current therapies to treat such hyperimmune responses include corticosteroid treatment, including dexamethasone, and treatment with an anti-inflammatory preparation. To date, there are no successful or long-term methods or compositions for effectively treating hyperimmune reactions in the mammalian eye and other organs. The present invention provides such methods and compositions.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to a method of treating rejection of an eye-related tissue or organ transplant in a mammal. The method comprises administering to the eye of the mammal

- 5 a composition comprising antibody to interferon gamma.

In one aspect, the composition is administered topically to the eye of the mammal.

In another aspect, the mammal is human.

In yet another aspect, the transplant is a corneal transplant.

- 10 In yet another aspect of the invention, the antibody is a polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a humanized antibody, or a biologically active fragment of an antibody to interferon gamma.

In yet another aspect, the composition is suspended in a pharmaceutically acceptable carrier.

15

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention comprises and utilizes the discovery that administration of antibodies to interferon (IFN) gamma to an animal having an autoimmune reaction in the eye is useful in alleviating or eliminating the autoimmune reaction. Such autoimmune reactions in the eye may occur as a result of transplants of eye tissue and eye diseases, including but not limited to Sjogren's syndrome, multiple sclerosis, sarcoidosis, ankylosing spondylitis, keratoconjunctivitis sicca (dry eye syndrome), episcleritis, scleritis, Mooren's ulcer, ocular cicatricial pemphigoid, orbital pseudotumor, iritis, central serous retinopathy, Graves' ophthalmopathy, chorioretinitis, Stevens-Johnson syndrome, uveitis, enophthalmitis, retinitis, choroiditis, and retinal necrosis. Autoimmune reactions in the eye may also occur as a result of contracting an infectious disease, including, but not limited to AIDS, syphilis, toxoplasmosis infection, and tuberculosis. Autoimmunity may also occur as a result of transplantation of tissue into the eye.

It is immediately apparent from the Examples disclosed herein that antibodies to IFN gamma are also useful for treatment of eye diseases which are characterized by hemorrhage and exudate collection in the eye. Hemorrhage and/or exudate may collect in the anterior chamber of the eye and is a characteristic result of an inflammatory reaction.

WO 02/098460

PCT/US02/17677

Typically, these symptoms occur during transplant rejection (i.e., a hyperimmune response). However, the invention should not be construed as being limited solely to the examples provided herein, as other autoimmune diseases of the mammalian eye which are at present unknown, once known, may also be treatable using the methods of the invention.

5 The invention includes a method of treating an eye disease characterized by a hyperimmune response in the eye of a mammal. Briefly, the method comprises applying antibodies to gamma interferon directly to the affected eye. The method can be used to treat an autoimmune eye disease in any mammal; however, preferably, the mammal is a human.

The antibodies to interferon gamma useful in the methods of the invention may 10 be polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, synthetic antibodies, such as a biologically active fragment of an antibody to interferon gamma, or they may be humanized monoclonal antibodies. Methods of making and using each of the types of antibodies useful in the methods of the invention are now described. In addition, human antibodies to interferon gamma, obtained from human donors, may be employed in the invention.

15 When the antibody used in the methods of the invention is a polyclonal antibody (IgG), the antibody is generated by inoculating a suitable animal with interferon gamma or a fragment thereof. Antibodies produced in the inoculated animal which specifically bind interferon gamma are then isolated from fluid obtained from the animal. Interferon gamma antibodies may be generated in this manner in several non-human mammals such as, but not 20 limited to goat, sheep, horse, rabbit, and donkey. Methods for generating polyclonal antibodies are well known in the art and are described, for example in Harlow, et al. (1988, In: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY). These methods are not repeated herein as they are commonly used in the art of antibody technology.

When the antibody used in the methods of the invention is a monoclonal 25 antibody, the antibody is generated using any well known monoclonal antibody preparation procedures such as those described, for example, in Harlow et al. (supra) and in Tuszyński et al. (1988, *Blood*, 72:109-115). Given that these methods are well known in the art, they are not replicated herein. Generally, monoclonal antibodies directed against a desired antigen are generated from mice immunized with the antigen using standard procedures as referenced 30 herein. Monoclonal antibodies directed against full length or peptide fragments of interferon gamma may be prepared using the techniques described in Harlow, et al. (supra).

When the antibody used in the methods of the invention is a biologically active

WO 02/098460

PCT/US02/17677

antibody fragment or a synthetic antibody corresponding to antibody to interferon gamma, the antibody is prepared as follows: a nucleic acid encoding the desired antibody or fragment thereof is cloned into a suitable vector. The vector is transfected into cells suitable for the generation of large quantities of the antibody or fragment thereof. DNA encoding the desired antibody is then expressed in the cell thereby producing the antibody. The nucleic acid encoding the desired peptide may be cloned and sequenced using technology which is available in the art, and described, for example, in Wright et al. (1992, *Critical Rev. in Immunol.* 12(3,4):125-168) and the references cited therein. Alternatively, quantities of the desired antibody or fragment thereof may also be synthesized using chemical synthesis technology. If the amino acid sequence of the antibody is known, the desired antibody can be chemically synthesized using methods known in the art.

The present invention also includes the use of humanized antibodies specifically reactive with IFN gamma epitopes. These antibodies are capable of neutralizing human IFN gamma. The humanized antibodies of the invention have a human framework and have one or more complementarity determining regions (CDRs) from an antibody, typically a mouse antibody, specifically reactive with IFN gamma. Thus, the humanized gamma IFN antibodies of the present invention are useful in the treatment of eye diseases and diseases of other organs which are characterized by an autoimmune reaction which includes overproduction of interferon gamma.

When the antibody used in the invention is humanized, the antibody may be generated as described in Queen, et al. (U.S. Patent No. 6, 180,370), Wright et al., (supra) and in the references cited therein, or in Gu et al. (1997, *Thrombosis and Hematocyst* 77(4):755-759). The method disclosed in Queen et al. is directed in part toward designing humanized immunoglobulins that are produced by expressing recombinant DNA segments encoding the heavy and light chain complementarity determining regions (CDRs) from a donor immunoglobulin capable of binding to a desired antigen, such as human IFN gamma, attached to DNA segments encoding acceptor human framework regions. Generally speaking, the invention in the Queen patent has applicability toward the design of substantially any humanized immunoglobulin. Queen explains that the DNA segments will typically include an expression control DNA sequence operably linked to the humanized immunoglobulin coding sequences, including naturally-associated or heterologous promoter regions. The expression control sequences can be eukaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or

WO 02/098460

PCT/US02/17677

transfecting eukaryotic host cells or the expression control sequences can be prokaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or transfecting prokaryotic host cells. Once the vector has been incorporated into the appropriate host, the host is maintained under conditions suitable for high level expression of the introduced nucleotide sequences and as desired the collection and purification of the humanized light chains, heavy chains, light/heavy chain dimers or intact antibodies, binding fragments or other immunoglobulin forms may follow (Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, New York, (1979), which is incorporated herein by reference).

Human constant region (CDR) DNA sequences from a variety of human cells can be isolated in accordance with well known procedures. Preferably, the human constant region DNA sequences are isolated from immortalized B-cells as described in WO87/02671. CDRs useful in producing the antibodies of the present invention may be similarly derived from DNA encoding monoclonal antibodies capable of binding to human IFN gamma. Such humanized antibodies may be generated using well known methods in any convenient mammalian source capable of producing antibodies, including, but not limited to, mice, rats, rabbits, or other vertebrates. Suitable cells for constant region and framework DNA sequences and host cells in which the antibodies are expressed and secreted, can be obtained from a number of sources such as the American Type Culture Collection, Rockville, MD.

In addition to the humanized IFN gamma discussed above, other "substantially homologous" modifications to native IFN gamma antibody sequences can be readily designed and manufactured utilizing various recombinant DNA techniques well known to those skilled in the art. Moreover, a variety of different human framework regions may be used singly or in combination as a basis for humanizing antibodies directed at IFN gamma. In general, modifications of genes may be readily accomplished using a variety of well-known techniques, such as site-directed mutagenesis (Gillman and Smith, *Gene*, 8, 81-97 (1979); Roberts et al., 1987, *Nature*, 328, 731-734).

Substantially homologous sequences to IFN gamma antibody sequences are those which exhibit at least about 85% homology, usually at least about 90%, and preferably at least about 95% homology with a reference IFN gamma immunoglobulin protein.

Alternatively, polypeptide fragments comprising only a portion of the primary antibody structure may be produced, which fragments possess one or more functions of IFN gamma antibody. These polypeptide fragments may be generated by proteolytic cleavage of

WO 02/098460

PCT/US02/17677

intact antibodies using methods well known in the art, or they may be generated by inserting stop codons at the desired locations in vectors comprising the fragment using site-directed mutagenesis.

DNA encoding antibody to IFN gamma are expressed in a host cell driven by a suitable promoter regulatory sequence which is operably linked to the DNA encoding the antibody. Typically, DNA encoding the antibody is cloned into a suitable expression vector such that the sequence encoding the antibody is operably linked to the promoter/regulatory sequence. Such expression vectors are typically replication competent in a host organism either as an episome or as an integral part of the host chromosomal DNA. Commonly, an expression vector will comprise DNA encoding a detectable marker protein, e.g., a gene encoding resistance to tetracycline or neomycin, to permit detection of cells transformed with the desired DNA sequences (U.S. Pat. No. 4,704,362).

Escherichia coli is an example of a prokaryotic host which is particularly useful for expression of DNA sequences encoding the antibodies of the present invention. Other microbial hosts suitable for use include but are not limited to, *Bacillus subtilis*, and other enterobacteriaceae, such as selected member of *Salmonella*, *Serratia*, and various *Pseudomonas* species. It is possible to generate expression vectors suitable for the desired host cell wherein the vectors will typically comprise an expression control sequence which is compatible with the host cell. A variety of promoter/regulatory sequences are useful for expression of genes in these cells, including but not limited to the lactose promoter system, a tryptophan (trp) promoter system, a beta-lactamase promoter system, or a promoter system derived from phage lambda. The promoter will typically control expression of the antibody whose DNA sequence is operably linked thereto, the promoter is optionally linked with an operator sequence and generally comprises RNA polymerase and ribosome binding site sequences and the like for initiating and completing transcription and translation of the desired antibody.

Yeast is an example of a eukaryotic host useful for cloning DNA sequences encoding the antibodies of the present invention. *Saccharomyces* is a preferred eukaryotic host. Promoter/regulatory sequences which drive expression of nucleic acids in eukaryotic cells include but are not limited to the 3-phosphoglycerate kinase promoter/regulatory sequence and promoter/regulatory sequences which drive expression of nucleic acid encoding other glycolytic enzymes.

In addition to microorganisms, mammalian tissue cell culture may also be used

WO 02/098460

PCT/US02/17677

to express and produce the antibodies of the present invention (Winnacker, 1987, "From Genes to Clones," VCH Publishers, New York, N.Y.). Eukaryotic cells are preferred for expression of antibodies and a number of suitable host cell lines have been developed in the art, including Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, various COS cell lines, HeLa cells, preferably myeloma cell lines, and transformed B-cells or hybridomas. Expression vectors which express desired sequences in these cells can include expression control sequences, such as an origin of DNA replication, a promoter, an enhancer (Queen et al., 1986, Immunol. Rev., 89, 49-68), and necessary processing sequence sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional initiation and terminator sequences. Preferred expression control sequences are promoters derived from immunoglobulin genes, Simian Virus (SV) 40, adenovirus, cytomegalovirus, bovine papilloma virus and the like.

10 The vectors containing the DNA segments of interest can be transferred into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for prokaryotic cells, whereas 15 calcium phosphate treatment or electroporation may be used for other cellular hosts. (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY).

Once expressed, whole antibodies, dimers derived therefrom, individual light and heavy chains, or other forms of antibodies can be purified according to standard procedures known in the art. Such procedures include, but are not limited to, ammonium sulfate 20 precipitation, the use of affinity columns, routine column chromatography, gel electrophoresis, and the like (see, generally, R. Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Substantially pure antibodies of at least about 90% to 95% homogeneity are preferred, and antibodies having 98% to 99% or more homogeneity most preferred for pharmaceutical uses. Once purified, the antibodies may then be used therapeutically.

25 The antibodies of the invention may be used in a therapeutic setting in a pharmaceutical acceptable carrier either alone, or they may be used together with a chemotherapeutic agent such as a non-steroidal anti-inflammatory drug, a corticosteroid, or an immunosuppressant. The antibodies, or complexes derived therefrom, can be prepared in a pharmaceutically accepted dosage form which will vary depending on the mode of 30 administration.

The invention thus embodies a novel composition comprising antibodies that bind with IFN gamma for use in treatment of eye disease. As stated above, the antibodies can

WO 02/098460

PCT/US02/17677

be monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, humanized monoclonal antibodies, or monoclonal chimeric antibodies, or a biologically active fragment of any type of antibody herein recited. Generation of each type of antibody is discussed herein and applies to generation of antibodies for use in the novel methods of the invention. Generally, it is preferred 5 that monoclonal humanized antibodies are used because they are non-immunogenic, and thus, will not elicit an immune response. However, any type of antibody may be used in the present invention.

The method of the invention is not intended to be limited to use of antibodies to IFN gamma. Inhibitors to IFN gamma are also useful in the method of the invention. Such 10 inhibitors include, but are not limited to, peptides which block the function of IFN gamma, IFN gamma receptor, antibodies to IFN gamma receptors, IFN beta, interleukin-10 (IL-10), and any combination thereof.

The pharmaceutical composition useful for practicing the invention may be administered to deliver a dose of between one microgram per kilogram per day and one hundred 15 milligrams per kilogram per day.

Pharmaceutical compositions that are useful in the methods of the invention may be administered topically or systemically in ophthalmic, injectable, or other similar formulations. In addition to the antibodies to IFN gamma, such pharmaceutical compositions 20 may contain pharmaceutically-acceptable carriers and other ingredients known to enhance and facilitate drug administration. Other possible formulations, such as nanoparticles, liposomes, resealed erythrocytes, and immunologically based systems may also be used to administer the gamma IFN antibodies according to the methods of the invention.

Compounds comprising antibodies to IFN gamma that can be pharmaceutically formulated and administered to an animal for treatment of autoimmune reactions in the eye are 25 now described.

The invention encompasses the preparation and use of pharmaceutical compositions comprising antibodies to IFN gamma as an active ingredient. Such a pharmaceutical composition may consist of the active ingredient alone, in a form suitable for administration to a subject, or the pharmaceutical composition may comprise the active 30 ingredient and one or more pharmaceutically acceptable carriers, one or more additional ingredients, or some combination of these. The active ingredient may be present in the pharmaceutical composition in the form of a physiologically acceptable ester or salt, such as in

WO 02/098460

PCT/US02/17677

combination with a physiologically acceptable cation or anion, as is well known in the art.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" means a chemical composition with which the active ingredient may be combined and which, following the combination, can be used to administer the active ingredient to a subject.

5 As used herein, the term "physiologically acceptable" ester or salt means an ester or salt form of the active ingredient which is compatible with any other ingredients of the pharmaceutical composition, which is not deleterious to the subject to which the composition is to be administered.

The formulations of the pharmaceutical compositions described herein may be
10 prepared by any method known or hereafter developed in the art of pharmacology. In general, such preparatory methods include the step of bringing the active ingredient into association with a carrier or one or more other accessory ingredients, and then, if necessary or desirable, shaping or packaging the product into a desired single- or multi-dose unit.

Although the descriptions of pharmaceutical compositions provided herein are
15 principally directed to pharmaceutical compositions which are suitable for ethical administration to humans, it will be understood by the skilled artisan that such compositions are generally suitable for administration to animals of all sorts. Modification of pharmaceutical compositions suitable for administration to humans in order to render the compositions suitable for administration to various animals is well understood, and the ordinarily skilled veterinary
20 pharmacologist can design and perform such modification with merely ordinary, if any, experimentation.

A pharmaceutical composition of the invention may be prepared, packaged, or sold in bulk, as a single unit dose, or as a plurality of single unit doses. As used herein, a "unit dose" is a discrete amount of the pharmaceutical composition comprising a predetermined
25 amount of the active ingredient. The amount of the active ingredient is generally equal to the dosage of the active ingredient which would be administered to a subject or a convenient fraction of such a dosage such as, for example, one-half or one-third of such a dosage.

The relative amounts of the active ingredient, the pharmaceutically acceptable carrier, and any additional ingredients in a pharmaceutical composition of the invention will
30 vary, depending upon the identity, size, and condition of the subject treated and further depending upon the route by which the composition is to be administered. By way of example, the composition may comprise between 0.1% and 100% (w/w) active ingredient.

WO 02/098460

PCT/US02/17677

In addition to the active ingredient, a pharmaceutical composition of the invention may further comprise one or more additional pharmaceutically active agents. Particularly contemplated additional agents include IFN gamma receptor, antibodies to IFN gamma receptors, IFN beta, interleukin-10 (IL-10), and any combination thereof.

5 Controlled- or sustained-release formulations of a pharmaceutical composition of the invention may be made using conventional technology.

Formulations suitable for topical administration include, but are not limited to, liquid or semi-liquid preparations such as liniments, lotions, oil-in-water or water-in-oil emulsions such as creams, ointments or pastes, and solutions or suspensions. Topically-10 administrable formulations may, for example, comprise from about 1% to about 10% (w/w) active ingredient, although the concentration of the active ingredient may be as high as the solubility limit of the active ingredient in the solvent. Formulations for topical administration may further comprise one or more of the additional ingredients described herein. Ionophoretic administration of the pharmaceutical composition of the invention is considered a form of 15 topical administration herein.

The pharmaceutical compositions may be prepared, packaged, or sold in the form of a sterile injectable aqueous or oily suspension or solution. This suspension or solution may be formulated according to the known art, and may comprise, in addition to the active ingredient, additional ingredients such as the dispersing agents, wetting agents, or suspending 20 agents described herein. Such sterile injectable formulations may be prepared using a non-toxic parenterally-acceptable diluent or solvent, such as water or 1,3-butane diol, for example. Other acceptable diluents and solvents include, but are not limited to, Ringer's solution, isotonic sodium chloride solution, and fixed oils such as synthetic mono- or di-glycerides. Other 25 parenterally-administrable formulations which are useful include those which comprise the active ingredient in microcrystalline form, in a liposomal preparation, or as a component of a biodegradable polymer systems. Compositions for sustained release or implantation may comprise pharmaceutically acceptable polymeric or hydrophobic materials such as an emulsion, an ion exchange resin, a sparingly soluble polymer, or a sparingly soluble salt.

A pharmaceutical composition of the invention may be prepared, packaged, or 30 sold in a formulation suitable for ophthalmic administration. Such formulations may, for example, be in the form of eye drops including, for example, a 0.1% to 1.0% (w/w) solution or suspension of the active ingredient in an aqueous or oily liquid carrier. Such drops may further

WO 02/098460

PCT/US02/17677

comprise buffering agents, salts, or one or more other of the additional ingredients described herein. Other administrable formulations which are useful include those which comprise the active ingredient in microcrystalline form or in a liposomal preparation.

As used herein, "additional ingredients" include, but are not limited to, one or 5 more of the following: excipients; surface active agents; dispersing agents; inert diluents; granulating and disintegrating agents; binding agents; lubricating agents; sweetening agents; flavoring agents; coloring agents; preservatives; physiologically degradable compositions such as gelatin; aqueous vehicles and solvents; oily vehicles and solvents; suspending agents; dispersing or wetting agents; emulsifying agents; demulcents; buffers; salts; thickening agents; 10 fillers; emulsifying agents; antioxidants; antibiotics; antifungal agents; stabilizing agents; and pharmaceutically acceptable polymeric or hydrophobic materials. Other "additional ingredients" which may be included in the pharmaceutical compositions of the invention are known in the art and described, for example in Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, which is incorporated herein by reference.

15 The compound may be administered to an animal as frequently as several times daily, or it may be administered less frequently, such as once a day, once a week, once every two weeks, once a month, or even less frequently, such as once every several months or even once a year or less. The frequency of the dose will be readily apparent to the skilled artisan and will depend upon any number of factors, such as, but not limited to, the type and severity of the 20 disease being treated, the type and age of the animal, etc.

Preferably, the composition of the invention is administered topically. The composition may be administered as an ointment to the lower eyelid. Preferably, the composition is administered in the form of eye drops. However, the composition comprising antibody to IFN-gamma may also be administered parenterally.

25 The antibodies to IFN-gamma may be present in a composition to be administered to the affected eye at a range of concentrations.

A composition comprising an antibody to IFN gamma can be administered to the affected eye several times per day. Preferably, the composition is administered from one to five times per day, and more preferably, the composition is administered from one to three times per 30 day. Most preferred is administration of the composition three times per day.

IFN gamma antibodies can be administered to the affected eye of a patient for as long as necessary to remedy the effects of the autoimmune reaction. Preferably, the patient

WO 02/098460

PCT/US02/17677

receives treatment for about 5 to about 10 days. More preferably, the patient receives treatment for about 5 to about 7 days. The entire treatment of administering IFN gamma antibodies can be repeated.

As evidenced by the Examples, the present invention is particularly useful in
5 treating a hyperimmune response resulting from rejection of an eye-related tissue or organ transplant. The invention is also useful in preventing an expected rejection of a transplanted tissue or organ when the composition of the invention is administered about one day before, during, and immediately after transplant surgery. The preferred treatment period is about seven days.

10 Administering IFN gamma antibodies to the an affected eye is also effective against damage of eye and optic nerve cells caused by hyperproduction of IFN gamma.

Hyperproduction of IFN gamma can also induce an autoimmune response in the eye. Thus, the administration of IFN gamma antibodies to an eye affected with a disease that causes hyperproduction of IFN gamma is well within the purview of the present invention.

15 **Definitions**

The articles "a" and "an" are used herein to refer to one or to more than one (i.e. to at least one) of the grammatical object of the article. By way of example, "an element" means one element or more than one element.

The term "antibody," as used herein, refers to an immunoglobulin molecule
20 which is able to specifically bind to a specific epitope on an antigen. Antibodies can be intact immunoglobulins derived from natural sources or from recombinant sources and can be immunoreactive portions of intact immunoglobulins. Antibodies are typically tetramers of immunoglobulin molecules. The antibodies in the present invention may exist in a variety of forms including, for example, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, Fv, Fab and
25 F(ab)₂, as well as single chain antibodies and humanized antibodies (Harlow et al., 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426).

By the term "synthetic antibody" as used herein, is meant an antibody which is
30 generated using recombinant DNA technology, such as, for example, an antibody expressed by a bacteriophage as described herein. The term should also be construed to mean an antibody which has been generated by the synthesis of a DNA molecule encoding the antibody and

WO 02/098460

PCT/US02/17677

which DNA molecule expresses an antibody protein, or an amino acid sequence specifying the antibody, wherein the DNA or amino acid sequence has been obtained using synthetic DNA or amino acid sequence technology which is available and well known in the art.

By the term "biologically active antibody fragment" is meant a fragment of an antibody which retains the ability to specifically bind to IFN gamma.

A "disease" is a state of health of an animal wherein the animal cannot maintain homeostasis, and wherein if the disease is not ameliorated then the animal's health continues to deteriorate. Use of the term disease throughout the application is meant to encompass the terms diseases, disorders, and conditions.

"Treatment" of a disease occurs when the severity of a symptom of the disease, the frequency with which such a symptom is experienced by a patient, or both, is reduced or eliminated. "Treatment" also encompasses prevention of an anticipated disease state. For example, treatment of a transplant rejection includes use of a composition comprising antibodies to IFN gamma after rejection has already occurred, and also within a period of post-transplant surgery to prevent an anticipated rejection. The preferred period post-surgery is about seven days.

By the term "specifically binds," as used herein, is meant an antibody which recognizes and binds IFN gamma, but does not substantially recognize or bind other molecules in a sample.

"Autoimmune response" refers to an alteration in the immune system wherein the immune response mounted during a disease state is detrimental to the host. Typically, cells of the immune system or other immune system components such as antibodies produced by the host, recognize "self" antigens as foreign antigens.

A "hyperimmune response" refers to an autoimmune response characterized by an overexpression of one or more cytokines of the immune system.

As used here, "an eye-related tissue or organ" refers to the tissues and organs that constitute the eye. These include all parts of the eye as would be classified in an anatomy textbook, for example, Williams et al., eds., 1980, Gray's Anatomy, 36th ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia.

A "corneal transplant" refers to the insertion of a cornea into the eye of a mammal, where the cornea being inserted is not the natural cornea of the mammal. The cornea being inserted may be from a cadaver.

WO 02/098460

PCT/US02/17677

A pharmaceutical composition is said to be "topically administered" when it is applied directly to the affected area. Eye drops, for example, are applied topically, as are creams and ointments. Ionophoresis is also included as a form of topical administration.

"Recombinant DNA" refers to a polynucleotide having sequences that are not naturally joined together. An amplified or assembled recombinant polynucleotide may be included in a suitable vector, and the vector can be used to transform a suitable host cell. A recombinant DNA polynucleotide may serve a non-coding function (e.g., promoter, origin of replication, ribosome-binding site, etc.) as well.

10 **EXAMPLES**

The invention is further described in detail by reference to the following experimental examples. These examples are provided for purposes of illustration only, and are not intended to be limiting unless otherwise specified. Thus, the invention should in no way be construed as being limited to the following examples, but rather, should be construed to encompass any and all variations which become evident as a result of the teaching provided herein.

In each of the trials reported below, the concentration of Fab2 fragments of antibody was 50 mg/ml of protein. The anti-IFN gamma activity when measured by ELISA exhibited a significant signal at a dilution of 1:10,000. The fragments were in liquid form. The liquid formulation of antibody fragments was administered at two to three drops per eye, three times per day for seven to ten days. Improvements in visual acuity and other signs were noted often by the second or third day after administration of the drops.

Clinical trials were conducted with on three patients who had recently undergone corneal transplant surgery. Patient G, male, fifty-three years of age, underwent corneal transplantation to treat keratoconus. The surgery included extraction of a cataract and implantation of an artificial lens. Patient G subsequently had a transplant rejection reaction characterized by deteriorating vision and opacity of the corneal transplant. Patient G was treated with standard therapy without therapeutic effect. Standard therapies may be steroids, anti-inflammatories, antibiotics, or vitamins, or any combination thereof, administered either topically, in the form of drops or ointment, or intravenously, by injection under the conjunctiva, orally, and intramuscularly. Fragments of goat anti-human interferon gamma antibodies were administered to the affected eye in the form of eye drops on an outpatient basis. The drops

WO 02/098460

PCT/US02/17677

were administered at two drops three times daily, over a period of seven days. Patient G exhibited a significant improvement in visual acuity after two days of treatment. Further, the corneal transplant reverted from opacity to almost complete transparency and peripheral areas of the cornea became significantly more transparent as well.

5 Patient P, male, thirty-nine years of age, underwent corneal transplantation to treat keratoconus in 1999. Nine months later, Patient P was diagnosed with a transplant rejection reaction and was treated with twenty-five doses of dexamethasone, both intravenously and using eye drops. Patient P received other types of therapy as well, and continued treatment on an outpatient basis. Six months after the first transplant rejection, Patient P was diagnosed
10 with a second transplant rejection reaction. Patient P was treated on an outpatient basis with the same therapy used for the first rejection. One month later, Patient P's previous therapy was discontinued and treatment with antibodies to interferon gamma in the form of eye drops was initiated. One day later, Patient P experienced improvement in visual acuity and the transplanted cornea became more transparent in peripheral areas. Over the next two days of
15 treatment, Patient P exhibited complete corneal transparency and a drastic improvement of vision.

Patient F, female, fifty-three years of age, underwent corneal transplantation and extraction of a cataract to treat a purulent corneal ulcer and herpes zoster. Ten days later, the transplant was rejected. Patient F underwent another corneal transplantation thirteen days after
20 rejection of the first transplant. Patient F received therapy with multiple antibiotics, steroids, anti-inflammatory preparations, and atropine. Despite all therapies administered, Patient F persistently displayed a purulent ring around the transplant, the transplant itself was cloudy, and the anterior eye chamber was hemorrhaging and was filled with exudate. Patient F's affected eye was treated with antibodies to interferon gamma in the form of eye drops, administered at 2
25 drops three times daily. After three days of administration, Patient F's condition improved. The purulent ring around the transplant significantly cleared and became white and the cornea became significantly more transparent. Exudate and hemorrhage in the anterior chamber completely disappeared, and the affected eye appeared significantly normal.

The results of the experiments disclosed establish that treatment of hyperimmune
30 disease of the eye with antibody to IFN gamma is effective.

The disclosures of each and every patent, patent application, and publication cited herein are hereby incorporated herein by reference in their entirety.

WO 02/098460

PCT/US02/17677

While this invention has been disclosed with reference to specific embodiments, it is apparent that other embodiments and variations of this invention may be devised by others skilled in the art without departing from the true spirit and scope of the invention. The appended claims are intended to be construed to include all such embodiments and equivalent variations.

WO 02/098460

PCT/US02/17677

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of treating rejection of an eye-related tissue or organ transplant in a mammal, said method comprising administering to the eye of said mammal a composition comprising antibody to interferon gamma.
2. The method of claim 1, wherein said composition is administered topically to said eye.
- 10 3. The method of claim 1, wherein said mammal is a human.
4. The method of claim 1, wherein said transplant is a corneal transplant.
- 15 5. The method of claim 1, wherein said antibody is a polyclonal antibody.
6. The method of claim 1, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
7. The method of claim 1, wherein said antibody is a humanized antibody.
- 20 8. The method of claim 1, wherein said antibody is a biologically active fragment of an antibody to interferon gamma.
9. The method of claim 1, wherein said composition is suspended in a pharmaceutically acceptable carrier.

25

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/17677
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(97): A61K 40/082, 40/084 US CL: 434/168.1, 148.1, 149.1, 180.1; 514/914, 912 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 434/168.1, 148.1, 149.1, 180.1; 514/914, 912		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DIALOG, WEST; MEDLINE, EMBASE, BIOSIS EYK OR CORNEAL TRANSPLANT? OR GRAFT?, IFN GAMMA, ANTIBOD? OR IMMUNOGLOBULIN?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMAGAMI et al, Suppression of allograft rejection with anti-alpha beta T cell receptor antibody in rat corneal transplantation, Transplantation, 27 February 1999, Vol. 67, No. 4, pages 600-604, see entire document.	1.9
Y	WO 90/10707 A1 (JONKER et al.) 20 September 1990, see entire document.	1.9
A	SKURKOVICH et al, A disturbance of interferon synthesis with the hyperproduction of unusual kinds of interferon can trigger autoimmune disease and play a pathogenetic role in AIDS: The removal of these interferons can be therapeutic, Medical Hypothesis, 1993, Vol. 41 pgs. 177-185	1.9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubt on priority (claim) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reasons (see § 19(3)(d)) "D" document relating to an oral disclosure, no, exhibition or other events "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 29 JULY 2002		Date of mailing of the international search report 19 SEP 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20591 Facsimile No. (703) 505-9250		Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris for S. Devi, Ph.D.</i> Telephone No. (703) 508-0196

Form PCT/ISA/810 (second sheet) (July 1998)*

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU, ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB17 EE01