

(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2004-519475

(P2004-519475A)

(43) 公表日 平成16年7月2日(2004.7.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	F 2 G 0 5 4
A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 39/395	U 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 7/00	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 114 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-567137 (P2002-567137)	(71) 出願人	503247975
(86) (22) 出願日	平成14年1月8日 (2002.1.8)		ペイラー リサーチ インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月9日 (2003.7.9)		アメリカ合衆国 テキサス州 75204
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/000343		ダラス リヴ オーク 3434
(87) 国際公開番号	W02002/067760	(74) 代理人	100059959
(87) 国際公開日	平成14年9月6日 (2002.9.6)		弁理士 中村 稔
(31) 優先権主張番号	60/260, 541	(74) 代理人	100067013
(32) 優先日	平成13年1月9日 (2001.1.9)		弁理士 大塚 文昭
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一
		(74) 代理人	100074228
			弁理士 今城 俊夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対象における自己免疫疾患の治療法及び *in vitro* 診断アッセイ

## (57) 【要約】

本発明は、インターフェロンアンタゴニスト及び F l t 3 リガンド ( F l t 3 L ) アンタゴニストを投与することにより、対象における自己免疫疾患を治療する方法を提供する。本発明は、1種又は複数のインターフェロンアンタゴニスト、及び1種又は複数の F l t 3 L アンタゴニストを含有する組成物、自己免疫疾患発症の対象リスクを決定するための *in vitro* アッセイ、並びに特にこのアッセイで使用するためのキットも提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象における自己免疫疾患を治療する方法であり、対象へ、有効量の、(a) I 型インターフェロンの活性を低下する少なくとも 1 種のインターフェロンアンタゴニスト、及び (b) Flt3L の活性を低下する少なくとも 1 種の Flt3 リガンド (Flt3L) アンタゴニストを投与し、これにより自己免疫疾患を治療することを含む、方法。

## 【請求項 2】

自己免疫疾患が、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、強直性脊椎炎、関節炎、再生不良性貧血、ベーチェット病、糖尿病、移植片対宿主病、グレーブス病、溶血性貧血、低グロブリン血症、高 IgE 症候群、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、多発性硬化症 (MS)、重症筋無力症、乾癬、狼瘡及びそれらのいずれかの組合せからなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 3】

狼瘡が、全身紅斑性狼瘡 (SLE) 又は薬剤誘発性狼瘡である、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

糖尿病が、真性糖尿病、I 型糖尿病、II 型糖尿病、若年型糖尿病又はそれらのいずれかの組合せである、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 5】

関節炎が、リウマチ性関節炎、若年性リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎又はそれらのいずれかの組合せである、請求項 2 記載の方法。

20

## 【請求項 6】

自己免疫疾患が SLE である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

対象が、哺乳類である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

哺乳類が、ヒト、霊長類、ラット、イヌ、ネコ又はマウスである、請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 9】

インターフェロンアンタゴニストが、抗体、抗体の抗原結合性フラグメント、ポリペプチド、ペプチド擬態、ペプチドをコードしている核酸、有機分子及びこれらのもいずれかの組合せからなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

30

## 【請求項 10】

インターフェロンアンタゴニストが、可溶性 IFN- $\gamma$  受容体を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 11】

インターフェロンアンタゴニストが、抗-IFN- $\gamma$  抗体又はそれらの抗原結合性フラグメントを含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 12】

Flt3L アンタゴニストが、抗体、抗体の抗原結合性フラグメント、ポリペプチド、ペプチド擬態、ポリペプチドをコードしている核酸、有機分子及びこれらのもいずれかの組合せからなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

40

## 【請求項 13】

Flt3L アンタゴニストが、可溶性 Flt3 受容体を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 14】

Flt3L アンタゴニストが、抗-Flt3L 抗体又はそれらの抗原結合性フラグメントを含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 15】

抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、抗-イディオタイプ抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体及びこれらのもいずれかの組合せを含む、請求項 9、11、12 又は 14 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 16】

50

インターフェロンアンタゴニスト及び F l t 3 L アンタゴニストが、ひとつの分子の一部である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

インターフェロンアンタゴニストの有効量が、約 1 ~ 約 10 倍モル過剰のインターフェロンを含有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

F l t 3 L アンタゴニストの有効量が、約 1 ~ 約 10 モル過剰の F l t 3 L を含有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 19】

組成物の投与が、病巣内、腹腔内、筋肉内又は静脈内注射；リポソーム - 媒介型送達；又は、局所的、鼻腔内、経口、眼内又は耳内送達による、請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 20】

I 型インターフェロンが、インターフェロン - ( I F N - ) 又は I F N - である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 21】

インターフェロンアンタゴニストが、I 型インターフェロンのその受容体との結合を低下する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 22】

インターフェロンアンタゴニストが、インターフェロン - 依存型情報伝達を低下する、請求項 1 記載の方法。 20

【請求項 23】

インターフェロンアンタゴニストが、インターフェロンの血清レベルを低下する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 24】

インターフェロンアンタゴニストが、インターフェロン受容体結合アッセイにより測定された、細胞からのインターフェロン分泌を低下する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 25】

インターフェロンアンタゴニストが、インターフェロン受容体結合アッセイにより測定された、血清中のインターフェロンの生体利用性を低下する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 26】

インターフェロンアンタゴニストが、単球分化アッセイにより測定された、対象における I 型インターフェロンを産生する細胞の出現を低下する、請求項 1 記載の方法。 30

【請求項 27】

インターフェロンアンタゴニストが T N F である、請求項 1 又は 11 記載の方法。

【請求項 28】

抗原提示が可能な樹状細胞への単球の分化を阻害する、治療的組成物であり：

( a ) I 型インターフェロンの活性を低下する少なくとも 1 種のインターフェロンアンタゴニスト、及び

( b ) F l t 3 L の活性を低下する少なくとも 1 種の F l t 3 リガンド ( F l t 3 L ) アンタゴニストを含有する組成物。 40

【請求項 29】

I 型インターフェロンが、インターフェロン - ( I F N - ) 又は I F N - である、請求項 28 記載の組成物。

【請求項 30】

組成物が、更に担体を含有する、請求項 28 記載の組成物。

【請求項 31】

インターフェロンアンタゴニストが、抗体、抗体の抗原結合性フラグメント、ポリペプチド、ペプチド擬態、ポリペプチドをコードしている核酸、有機分子及びこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される、請求項 28 記載の組成物。

【請求項 32】

インターフェロンアンタゴニストが、可溶性 I F N - 受容体を含む、請求項 2 8 記載の組成物。

【請求項 3 3】

インターフェロンアンタゴニストが、抗 - I F N - 抗体又はそれらの抗原結合性フラグメントを含む、請求項 2 8 記載の組成物。

【請求項 3 4】

インターフェロンアンタゴニストが、T N F である、請求項 2 8 記載の組成物。

【請求項 3 5】

F l t 3 L アンタゴニストが、抗体、抗体の抗原結合性フラグメント、ペプチド、ペプチド擬態、ペプチドをコードしている核酸、有機分子及びこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される、請求項 2 8 記載の組成物。 10

【請求項 3 6】

F l t 3 L アンタゴニストが、可溶性 F l t 3 受容体を含む、請求項 2 8 記載の組成物。

【請求項 3 7】

F l t 3 L アンタゴニストが、抗 - F l t 3 L 抗体又はそれらの抗原結合性フラグメントを含む、請求項 2 8 記載の組成物。

【請求項 3 8】

抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、抗 - イディオタイプ抗体、ヒト化抗体、又は霊長類化抗体を含む、請求項 3 1、3 3、3 5 及び 3 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 3 9】

インターフェロンアンタゴニスト及び F l t 3 L アンタゴニストがひとつの分子の一部である、請求項 2 8 記載の組成物。 20

【請求項 4 0】

組成物が、2 種又はそれ以上のインターフェロンアンタゴニスト及び F l t 3 L アンタゴニストを含有する、請求項 2 8 記載の組成物。

【請求項 4 1】

ひとつのインターフェロンアンタゴニストが T N F である、請求項 4 0 記載の組成物。

【請求項 4 2】

組成物が、抗 - I F N - 抗体、抗 - F l t 3 L 抗体及び T N F を含有する、請求項 4 0 記載の組成物。 30

【請求項 4 3】

自己免疫疾患発症に関する対象のリスクを決定する、i n v i t r o アッセイであり：

( a ) 血清試料を対象から得る工程；

( b ) 血清試料中の I F N - 及び F l t 3 リガンド ( F l t 3 L ) を定量する工程；及び

( c ) この I F N - 及び F l t 3 L の量を、自己免疫疾患の対象から得た血清中の I F N - 及び F l t 3 L の量と比較し、これにより該対象の自己免疫疾患発症のリスクを決定する工程を含む、アッセイ。

【請求項 4 4】

自己免疫疾患発症のリスクが、I F N - 及び F l t 3 L の量が、自己免疫疾患である対象のそれらの量の約 3 0 % 範囲内である場合に生じる、請求項 4 3 記載の方法。 40

【請求項 4 5】

前記リスクが、該範囲が約 2 0 % である場合に増大する、請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 6】

前記比較が、年齢を合致させた対象について行われる、請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 7】

F l t 3 L 及び I F N - に特異的に結合する組成物を、対象の生物試料中の F l t 3 L 及び I F N - を検出するのに有効量含む、対象の自己免疫疾患発症のリスクを決定するため又は対象の自己免疫疾患の状態を経過観察するためのキット。

【請求項 4 8】

生物試料が、血液試料及び血清試料である、請求項 4 7 記載のキット。

【請求項 4 9】

組成物が、F l t 3 L に結合するモノクローナル抗体及び I F N - に結合するモノクローナル抗体を含む、請求項 4 7 記載のキット。

【請求項 5 0】

キットが更に、1種又は複数の試料に結合した組成物の量を検出するための1種又は複数の試薬を含む、請求項 4 7 記載のキット。

【請求項 5 1】

組成物が、検出可能なマーカーにより標識されている、請求項 4 7 記載のキット。

【請求項 5 2】

検出可能なマーカーが、蛍光マーカー、放射性マーカー、酵素マーカー、比色分析用マーカー、化学発光マーカー及びそれらの組合せからなる群より選択される、請求項 5 1 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、その全内容が本願明細書に参照として組入れられている、2001年1月9日に  
出願された米国特許出願第60/260,541号に優先して請求されるものである。

【0002】

(発明の技術分野)

本発明は、自己免疫疾患の治療及び自己免疫疾患に関連した診断アッセイに関する。

【0003】

(発明の背景)

自己免疫疾患は、破綻しかつ無能になる疾患であり、かつ患者自身の免疫系が患者自身の体又は組織を攻撃することにより、それ自身に背く場合に引き起される。自己免疫疾患の一例は、全身紅斑性狼瘡(SLE)であり、これは多臓器の関与及び自己反応性T細胞及びB細胞の存在を含む免疫学的異常を特徴とする。ヌクレオソームに対する自己抗体は、SLEの顕著な特徴であるように思われ、かつこれは死滅しつつある(アポトーシス)細胞の不適切な操作が、SLE発症の重要な病因事象を示し得ることを示唆している。SLEは、免疫系の体液性及び細胞性経路(limb)の両方の調節不能から生じ、その最初の変化は、免疫エフェクター、すなわち樹状細胞(DC)を登録しかつ制御する細胞レベルでのことであることが示されている。

【0004】

樹状細胞(DC)は、T細胞媒介型免疫応答を誘起する特定化された抗原提示細胞である(Steinman, R. M., Ann. Rev. Immunology, 9: 271-296 (1991)、及びBanchereauら、Ann. Rev. Immunol., 18: 767 (2000))。DCは、免疫応答を誘導及び維持し、かつ死細胞を捕獲し、かつそれらの抗原をCD4<sup>+</sup>T細胞に提示し、その後B細胞を含むそれらの免疫エフェクターを活性化することが示されている。骨髄のDC前駆体は、高い貪食能を伴う未熟細胞としてそれらが存在する組織に戻る循環血中前駆体を生じる。組織が損傷を受けた時点で、DCは抗原(Ag)を捕獲し、引き続きリンパ系器官へ移動し、そこでこれらは稀なAg-特異的T細胞を選択し、これにより免疫応答を開始する。DCは、抗原をCD4<sup>+</sup>T細胞に提示し、これは次にCD8<sup>+</sup>T細胞及びB細胞のような抗原-特異的なものに加え、マクロファージ、好酸球及びNK細胞のような非特異的なものを含む免疫エフェクターを調節する。DCは更に、B細胞を直接活性化し、かつそれらの形質細胞への*in vitro*における分化を誘導することもできる。

【0005】

3種のDC前駆体("DCpre")サブセットが、血液を循環する:(1)CD14<sup>+</sup>単球、(2)CD11c<sup>+</sup>骨髄系DCpre、及び(3)CD11c<sup>-</sup>形質細胞系(リンパ球系)DCpre。単球は、未熟DC又はマクロファージ(M)の特徴を提示し

10

20

30

40

50

ている細胞へ分化することができる。未熟DCは、CD40L及び/又はLPSによる処理時、もしくはTNF、IL-1及びIL-6を含むサイトカインと共に培養された場合に、成熟DCとなる。CD11c<sup>+</sup> 骨髄系DCpreは、局所的サイトカイン環境に応じて、間質DC (intDC)、ランゲルハンス細胞 (LC) 又はM<sub>1</sub>を生じる。

【0006】

CD11c<sup>-</sup> IL-3R<sup>+</sup> リンパ球系DC前駆体は、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の主な給源である。高レベルのIFN- $\gamma$  は、狼瘡血清において認められることが多い (Kimら、Clin. Exp. Immunol.、70:562-269 (1987))。更に、IFN- $\gamma$  処置は、自己抗体の出現、最終的にはSLEを含む自己免疫疾患の発症を誘導することが多い (Ronnbblumら、J. Intern. Med. 10、227:207-210 (1990))。抗-IFN- $\gamma$  抗体がSLE患者において報告されている (Suitら、Clin. Exp. Rheumatol.、1:133-135)。

【0007】

形質細胞系DCは、IFN- $\gamma$  を産生し、これは次に骨髄系DCの分化並びにB細胞の増殖及び活性化に影響を及ぼすことが報告されている。Spitsら (J Exp Med、192(12):1775-84 (2000)) 及びBlomら (J Exp Med、192(12):1785-96 (2000)) は、CD11c<sup>-</sup> 形質細胞系DCは、ヒトにおけるリンパ球系起源であることを報告している。Siegalら (Science、284:1835 (1999)) は、リンパ球系DC (形質細胞系DC) は、失活した単純ヘルペスウイルスに曝露された場合に多量のIFN- $\gamma$  を産生することを報告している。Cellaら (Nature Medicine、5(8):868-70 (1999)) は、リンパ球系DC (形質細胞系DC) は、インフルエンザウイルスに加え、CD40ライゲーションに反応して、大量のIFN- $\gamma$  を産生することを報告している。

【0008】

SLEにおける自己抗体 (autoAb) は、3つの大きいカテゴリーに特徴付けることができる: (1) 抗-核及び抗-二本鎖DNA抗体; (2) 上皮細胞及び血小板の表面に対して示されたautoAb (抗-リン脂質/2糖タンパク質); 及び、(3) 造血細胞の表面上の分子に対して示されたautoAb (例えば、Cabraal及びAlarcón-Segoviaの論文の総説を参照のこと、Curr. Opin. Rheumatol.、10:409 (1998))。細胞及び/又は組織抗原-抗体相互作用により引き起された直接の損傷に加え、多くの疾患症状が、組織への免疫複合体の沈着による間接的損傷に起因している。この機序は、SLE、腎炎、関節炎、及び血管炎のいくつかの形に寄与することが示されている (Lahita, R.G., Systemic Lupus Erythematosus, Academic Press社、(1999); Kammer, G.M. 及びG.C. Tsokos., Lupus, Humana Press社 (1999))。Fc受容体 ("FcR") 及びC3b-受容体 ("C3b-R") 機能不全を含む免疫複合体クリアランスの欠損、更には補体タンパク質及びC-反応性タンパク質の遺伝的欠損 (これらは全て、抗-DNA/ヌクレオソーム複合体の除去における本質的プレーヤーである) は、SLE発症に寄与し得る (Lahita, R.G., Academic Press社、(1999); Kammer, G.M. 及びG.C. Tsokos., Humana Press社、(1999))。B細胞は、SLE病理発生において主要な役割を果たし、かつこれらは自己抗体産生及び高グロブリン血症に寄与している。

【0009】

Hooksら (N. Engl. J. Med.、301:5 (1979)) は、SLEを含む自己免疫疾患の患者における循環血中の免疫インターフェロンの存在を説明している。Kimらは、IFN- $\gamma$  レベルが、臨床活動度の指標と相関していることを明らかにしている。Prebleら (J. Exp. Med.、157:214 (1983))

及び von Wussowら (Arthritis Rheum., 32:914 (1989)) は、IFN- $\gamma$  により特異的に誘導される2種のタンパク質である、高レベルの2-5Aシンセターゼ及びMXタンパク質は、血清IFN- $\gamma$ 陽性及び血清IFN- $\gamma$ 陰性の両方のSLE患者の単核細胞中に認められることを明らかにしている。Vallinら (J. Immunol., 163:6306 (1999)) は、IFN- $\gamma$  誘導因子は、未熟DCを特徴とするリンパ球に作用することを明らかにしている。Batteuxら (Eur. Cytokine Netw., 10:509 (1999)) は、SLE血清によるIFN- $\gamma$  産生の誘導は、FcRII (CD32) に左右されることを明らかにしている。

#### 【0010】

ひとつのIFN- $\gamma$  療法の合併症は、自己免疫障害の誘導 (症例の約4%~19%) であり、最も一般的には、甲状腺機能障害である (Ehremsteinら、Arthritis Rheum., 36:279 (1993); Okanoueら、J. Hepatol., 25:283 (1996); Ronnblomら、Ann. Intern. Med., 115:178 (1991); Kalknerら、Qjm., 91:393 (1998))。実際に、Schillingら (Cancer, 68:1536 (1991)) は、IFN- $\gamma$  療法は、0.15%~0.7%の頻度で、SLEも誘導することを明らかにしている。全ての症例は、抗-核抗体及び抗-DNA抗体の誘導又は力価の顕著な上昇に関連している。

#### 【0011】

I型糖尿病は、IFN- $\gamma$  が重要な原因病理学的役割を果たす別の自己免疫疾患である。Foulisら (Lancet, 2:1423 (1987)) 及びHuangら (Diabetes, 44:658 (1995)) は、豚島によるIFN- $\gamma$  の発現と、ヒトにおける自己免疫糖尿病の発症の間の強力な相関関係を明らかにしている。更にChakrabartiら (J. Immunol., 157:522 (1996)) は、トランスジェニックマウスモデルにおいて、豚ランゲルハンス島のB細胞によるIFN- $\gamma$  の発現が糖尿病を引き起こすことを明らかにしている。加えて、Fabrisら (Lancet, 340:548 (1992)) 及びGuerciら (Lancet, 343:1167 (1994)) は、IFN- $\gamma$  療法が、ヒトにおいてI型糖尿病を引き起こし得ることを明らかにしている。

#### 【0012】

FMS-様チロシンキナーゼ3 ("Flt3") は、KIT (c-kit RTK)、FMS (M-CSF RTK) 及び血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体も含む多くのIII型チロシンキナーゼ受容体ファミリーである。各々、幹細胞因子及びM-CSFであるKIT受容体及びFMS受容体に関するリガンド同様、Flt3受容体は、Flt3-リガンド ("Flt3L") と称されるコグネイト分子により活性化される。Flt3は、c-fms受容体及びc-kit受容体に関連したチロシンキナーゼ受容体の変形である (Rosnetら、Oncogene, 6, 1641-1650 (1991))。Flt3Lは、DCの拡張及び抗腫瘍免疫応答の成立を促進することが示されている造血性サイトカインである (米国特許第5,554,512号「Flt3受容体リガンド」参照)。Flt3Lは、前駆細胞及び幹細胞の増殖及び分化を調節することがわかっている (Blazarら、Biology of Blood and Marrow Transplantation, 7:197-207 (2001)) 及び米国特許第5,843,423号参照)。単球細胞培養物のFlt3L処置は、絶対数 (absolute number) の骨髓系-及びリンパ球系-関連DCにおける顕著な拡張並びにドナーの脾T細胞の割合の低下を招くことが示されている (Blazarら)。

#### 【0013】

本出願において言及された刊行物 (米国特許、公開されたPCT出願、科学分野の参考文献、書籍、マニュアルなどを含む) の全ての内容は、その全体が、本出願に参照として組入れられている。

10

20

30

40

50

## 【0014】

## (発明の概要)

本発明は、有効量の ( a ) I 型インターフェロンの活性を低下する少なくとも 1 種のインターフェロンアンタゴニスト、及び ( b ) F l t 3 L の活性を低下する少なくとも 1 種の F l t 3 リガンド ( F l t 3 L ) アンタゴニストを対象へ投与し、これにより対象における単球の樹状細胞への分化を低下し、かつ自己免疫疾患を治療することを含む、対象の自己免疫疾患を治療する方法に関する。

## 【0015】

本発明は同じく、 ( a ) I 型インターフェロンの活性を低下する少なくとも 1 種のインターフェロンアンタゴニスト、及び ( b ) F l t 3 L の活性を低下する少なくとも 1 種の F l t 3 リガンド ( F l t 3 L ) アンタゴニストを含有する、抗原提示が可能な樹状細胞への単球の分化を阻害する治療的組成物にも関する。このような組成物は、S L E、並びに糖尿病、関節炎、A I D S、乾癬及び甲状腺炎を含むがこれらに限定されるものではない他の I F N - 媒介型自己免疫疾患を含むが、これらに限定されるものではない自己免疫疾患の治療のための治療的組成物を構成している。

10

## 【0016】

本発明は同じく、 ( a ) 対象から血清試料を得ること ; ( b ) 血清試料中の I F N - 及び F l t 3 リガンド ( F l t 3 L ) を定量すること ; 並びに、 ( c ) I F N - 及び F l t 3 L の量を、自己免疫疾患を有する対象の血清中の I F N - 及び F l t 3 L の量と比較し、これにより対象の自己免疫疾患発症のリスクを決定することを含む、自己免疫疾患を発症する対象のリスクを決定するための i n v i t r o アッセイにも関連している。

20

## 【0017】

本発明は更に、対象の生物試料中の F l t 3 L 及び I F N - を検出するのに有効な F l t 3 L 及び I F N - に特異的に結合する組成物がある量含む、対象の自己免疫疾患発症リスクを決定する又は対象における自己免疫疾患の状態を経過観察するためのためのキットにも関する。このキットは、 ( a ) F l t 3 L に結合するモノクローナル抗体及び ( b ) I F N - に結合するモノクローナル抗体を含有する組成物を含む。更に、この組成物は検出可能である。このキットは、1 種又は複数の試料に結合した組成物の量を検出するための 1 種又は複数の試薬を含むことができる。

30

## 【0018】

## (詳細な説明)

本発明は、 ( a ) I 型インターフェロンの活性を低下する 1 種又は複数のインターフェロンアンタゴニスト、及び ( b ) F l t 3 L の活性を低下する 1 種又は複数の F l t 3 リガンド ( F l t 3 L ) アンタゴニストの有効量を対象へ投与し、これにより対象における単球の樹状細胞への分化を低下し、かつ自己免疫疾患を治療することを含む、対象の自己免疫疾患を治療する方法が示されている。加えて本発明は、抗原提示が可能である樹状細胞 ( D C ) への単球分化を阻害するのに有用な組成物であり、 ( a ) インターフェロン活性を低下する少なくとも 1 種のインターフェロンアンタゴニスト、及び ( b ) F l t 3 リガンドの活性を低下する少なくとも 1 種の F l t 3 リガンドアンタゴニストを含有する組成物を提供する。例えば、この組成物のひとつの成分は、I 型インターフェロン ( 例えば I F N - ) とその受容体の間の結合又は相互作用を低下又は阻害するアンタゴニストであることができる。この組成物は、F l t 3 L 及びその受容体の間の結合又は相互作用を低下又は阻害するアンタゴニストも含有する。

40

## 【0019】

本願明細書において使用される「S L E - D C」は、単球を、S L E 患者から得た血清 ( 「S L E 血清」 ) と共に培養することにより得られた樹状細胞を意味する。

本願明細書において使用される「インターフェロンアンタゴニスト」は、対象の細胞又は i n v i t r o 細胞における I 型インターフェロンの活性又は機能を低下することが可能である、抗体、抗体の抗原結合性フラグメント、ポリペプチド、ペプチド擬態、ポリペプチドをコードしている核酸、有機分子又はそれらのいずれかの組合せを包含している。

50

## 【0020】

本願明細書において使用される「ポリペプチド」は、機能には関係なく、あらゆる長さのペプチド及びタンパク質を包含している。

本願明細書において使用される「I型インターフェロン」は、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、及びIFN- $\tau$ を含む。Oritaniらの論文(Cytokine Growth Factor Rev.、12(4):337-48(2001))は、その他のI型インターフェロンの例の説明を提供している。

## 【0021】

インターフェロンアンタゴニストは、I型インターフェロン(例えばIFN- $\alpha$ )とその受容体の間の相互作用を妨害し、これは抗原提示細胞となるDCへの単球の分化を低下することにより、抗原提示細胞産生の減少を生じる。抗原提示細胞産生の低下は、1種又は複数の異なる機序により実現することができるが、これが生じる正確な機序は本発明にとっては重要ではない。例えば、TNF及び/又はアンタゴニスト性抗-TNF受容体抗体は、pDCのI型IFN非産生細胞への分化を促進することにより、I型インターフェロン分泌を低下することができる。

10

## 【0022】

化合物が、本発明において有用なインターフェロンアンタゴニストであるかどうかの確定を行うことができるアッセイは数多くある。これらのアッセイは、当業者に公知である。ひとつのアッセイは、試験される化合物が、DCへの単球分化に適した条件下で単球培養物に添加される、樹状細胞分化アッセイである。これらの条件は、SLE血清又はインターフェロンのいずれかを添加し、単球にDCへの分化を誘導させることを含む。従って化合物が、該化合物が添加されていない培養物中の単球の分化と比べて、インターフェロン及び/又はSLE血清が起動した単球のDCへの分化の阻害を引き起す場合は、結果的にこの化合物は、インターフェロンアンタゴニストである。

20

## 【0023】

別のインターフェロンアンタゴニストである化合物を同定するアッセイは、標識されたインターフェロンの細胞上の受容体への結合の阻害を測定する結合アッセイである。化合物が、インターフェロンのその受容体への又はインターフェロン受容体を有する細胞への結合を阻害することができるならば、この化合物は、インターフェロンアンタゴニストである。

30

## 【0024】

加えて、化合物がインターフェロンアンタゴニストであるかどうかを決定するアッセイは、例えばウイルスのような、通常インターフェロンの産生及び/又は分泌を誘導する引き金に反応して細胞により産生されたインターフェロンの阻害を測定するアッセイである。従って化合物及び引き金(例えば、ウイルス)の存在下で、通常インターフェロンを産生する細胞が、インターフェロンを産生しないか、又は低下したレベルでインターフェロンを産生する場合は、結果的にこの化合物はインターフェロンインヒビターである。

## 【0025】

化合物がインターフェロンアンタゴニストであるかどうかを決定する別のアッセイは、腫瘍細胞生存アッセイである。インターフェロンは、直接の増殖阻害及び/又は腫瘍細胞死の誘導による抗-腫瘍活性を有する。このようなインターフェロンに易感受性である腫瘍細胞の例は、黒色腫細胞株を含む。この腫瘍細胞生存アッセイは、インターフェロン及びインターフェロンアンタゴニストの存在下で培養されている、そうでなければ易感受性の黒色腫細胞の生存を測定する。従って、試験される化合物が含まれない同一の培養物と比べ、腫瘍細胞が試験される化合物を含む培養物中で生存している場合は、結果的にこの化合物はインターフェロンアンタゴニストである。

40

## 【0026】

別の化合物がインターフェロンアンタゴニストであるかどうかを同定するアッセイは、例えば、MXAタンパク質を含むインターフェロン-誘導可能なタンパク質及びインターフェロン制御因子の(タンパク質及び/又はRNAレベルでの)発現を定量するアッセイで

50

ある。従って、試験される化合物は、培養物へ添加され、かつ特定化されたインターフェロン - 誘導可能なタンパク質のタンパク質レベル及びRNAレベルが測定される。この化合物の添加が、タンパク質及び/又はmRNA発現のレベルを低下する場合は、結果的にこの化合物は、インターフェロンアンタゴニストである。

【0027】

別の化合物がインターフェロンアンタゴニストであるかどうかを決定するアッセイは、*in vitro* 防御アッセイである。通常インターフェロンの細胞培養物への添加は、その細胞を、細胞培養物へ導入されたウイルスの細胞溶解活性から保護し、その結果その培養物中の細胞の生存を延長する。従ってインターフェロンアンタゴニストの添加は、防御を廃絶し、かつ細胞生存は延長されないであろう。その結果、インターフェロンの抗-ウイルス活性の阻害が測定される場合は、結果的にこの化合物はインターフェロンアンタゴニストである。この阻害測定は、ウイルスに易感受性の細胞の死滅を決定することを基礎としている。

10

【0028】

インターフェロンアンタゴニストの例は、IFN- に特異的に結合するモノクローナル抗体を含むが、これらに限定されるものではない。別のインターフェロンアンタゴニストの例は、可溶性IFN- 受容体である。この可溶性受容体は、循環血中I型インターフェロンへの結合に有用であり、従ってこれがその天然の受容体と結合すること及びDCへの単球分化の進行を引き起こすことを防ぐ。別の本発明の態様において、インターフェロンアンタゴニストは、IFN- 受容体へ結合するが、このような結合のダウンストリーム作用は引き起こさないような有機分子、すなわち非-機能的受容体リガンド擬態であることができる。このような有機分子は、受容体活性化を引き起こすことなく、この受容体のIFN- 結合ポケットに特異的に結合することができ、その結果そのように結合することができるIFN- と置き換わり、これにより受容体を無効とする。更なる本発明の態様において、インターフェロンアンタゴニストは、インターフェロン又はFlt3L又は両方と特異的に結合するモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)を含むペプチドである。更に別の本発明の態様において、インターフェロンアンタゴニストは融合ペプチドである。

20

【0029】

本発明において有用なインターフェロンアンタゴニストは、多くの異なる機序によりI型インターフェロンの活性を低下することができ、かつ本発明はいずれか特定の機序に左右されるものではない。本発明のインターフェロンアンタゴニストは、低下した*in vivo* 活性を有するか又は有さないような修飾されたIFN- を含むが、これらに限定されるものではない。I型インターフェロンによる抗原提示細胞の作成の破壊に関して、このインターフェロンアンタゴニストは、インターフェロンのシグナル伝達経路における多くの異なる接点において、I型インターフェロン活性に作用することができる。いくつかの例において、このアンタゴニストは、インターフェロンタンパク質それ自身の活性をブロックし；I型インターフェロン受容体の活性をブロックし；インターフェロンの受容体への結合を阻害し；I型インターフェロンのシグナル伝達及び/又は情報伝達をブロックし；通常I型インターフェロンを産生する細胞からのその放出をブロックし；通常I型インターフェロンを産生する細胞の生成をブロックし；かつ、通常I型インターフェロンを分泌する細胞からのその分泌をブロックすることができる。通常インターフェロンを産生する細胞の分化又は生成の阻害は、TNF及び/又はアゴニスト性抗-TNF受容体(複数)抗体及び/又は細胞へのTNF-様シグナル伝達を提供する分子投与から生じることができる。この種の化合物は、本発明により提供されたインターフェロンアンタゴニストの例である。加えて、抗原提示細胞の分化及び増殖に必要なI型インターフェロン補因子の失活は、別の本発明のインターフェロンアンタゴニストの可能性のある機序である。

30

40

【0030】

本願明細書において使用される「Flt3Lアンタゴニスト」は、Flt3L活性を低下

50

することが可能である、抗体、抗体の抗原結合性フラグメント、ポリペプチド、ペプチド擬態、ポリペプチドをコードしている核酸、有機分子又はそれらのいずれかの組合せを包含している。例えば、F l t 3 Lアンタゴニストは、前駆細胞の樹状細胞への分化を阻害するように、F l t 3リガンド( " F l t 3 L " )とその受容体の間の相互作用を妨害することができる。抗原提示細胞の生成の低下は、1種又は複数の異なる機序により実現することができる。例えば、F l t 3 Lは、衰えないDC活性化に寄与することができ、これは次にS L Eにおける自己-抗原提示を起動することができ、従ってF l t 3 Lは治療的介入の標的である。F l t 3 Lは恐らく、自己免疫疾患の治療に有用なF l t 3 L機能のアンタゴニストを作成するS L E自己免疫疾患の発症又は持続において役割を果たしているであろう。

10

**【0031】**

ある態様において、治療的有効量のインターフェロンアンタゴニストを確定するアッセイは、*in vitro*における治療を受ける対象から採取した血清へのインターフェロン受容体の結合の低下に必要なインターフェロンアンタゴニスト量を決定することである。この例において、50%の*in vitro*結合の低下に必要な濃度は、*in vivo*において治療効果があるであろう。F l t 3 Lに関する同様のアッセイを実行し、特定の対象又は患者についてのF l t 3 Lアンタゴニストの有効量を決定することができる。

**【0032】**

化合物が、本発明において有用なF l t 3 Lアンタゴニストであることを同定するために行うことができるアッセイは数多く存在する。ひとつのアッセイは、試験される化合物を、DCへの単球分化に適した条件下で、単球の培養物に添加する樹状細胞分化アッセイである。この条件は、単球のDCへの分化を誘導するための、単球培養物へのF l t 3 Lの添加を含む。従って、この化合物が、該化合物が添加されない単球培養物と比較して、DCへの単球分化の少なくとも50%の阻害を引き起す場合、この化合物はF l t 3 Lアンタゴニストである。

20

**【0033】**

化合物がF l t 3 Lアンタゴニストであるかどうかを決定する別のアッセイは、標識されたF l t 3 Lのその受容体への結合の阻害を決定するアッセイである。このアッセイにおいて、検出可能な標識物はF l t 3 Lへ付着され、かつこの標識されたF l t 3 Lは、該化合物の存在下及び非存在下でその受容体へ結合することができる。この化合物の存在がF l t 3 Lの受容体への結合の減少を生じる場合、結果的にこの化合物はF l t 3 Lアンタゴニストである。

30

**【0034】**

化合物がF l t 3 Lアンタゴニストであるかどうかを決定するのに有用な別のアッセイは、*in vitro*増殖アッセイである。ヒト造血前駆細胞は、それらの分化及び/又は増殖を誘導するために、F l t 3 Lと共に培養される。試験される化合物は、一部の培養物に添加され、かつ他のものは化合物を含まない。この化合物を伴う培養物と伴わない培養物の間で比較を行い、増殖及び分化の量を決定する。ヒト造血前駆細胞のF l t 3 Lで起動された増殖及び/又は分化の阻害が存在するならば、結果的にこの化合物はF l t 3 Lアンタゴニストである。

40

**【0035】**

化合物がF l t 3 Lアンタゴニストであるかどうかを決定するのに有用な別のアッセイは、*in vitro*増殖アッセイである。ヒト因子(*human factor*)-依存型B細胞株は、培養物にこの化合物を添加又は非添加し、培養される。このような細胞株の例は、F l t 3を発現するように操作された細胞株である。添加された化合物を伴う培養物が、ヒト因子-依存型B細胞株のF l t 3 L起動した増殖の少なくとも50%阻害を示す場合は、結果的にこの化合物はF l t 3 Lアンタゴニストである。

**【0036】**

試験される化合物がF l t 3 Lアンタゴニストであるかどうかを決定するのに有用な別のアッセイは、*in vivo*アッセイである。マウスにF l t 3 Lが投与され、かつ樹状

50

細胞を含むそれらの造血細胞が *in vivo* において増大される。これらのマウスは、試験される化合物が投与されるか又は投与されないかのいずれかであり、かつマウスの造血細胞のレベルが測定される。従ってマウスにおける *in vivo* の樹状細胞を含む造血細胞の Flt3L-媒介型の増大の阻害は、この化合物が Flt3L アнтаゴニストであることを示している。

**【0037】**

Flt3L アнтаゴニストの一例は、Flt3L に特異的に結合するモノクローナル抗体である。Flt3L アнтаゴニストの別の例は、可溶性 Flt3L 受容体である。この可溶性受容体は、Flt3L がその天然の受容体と結合し、かつ DC への単球分化の進行を引き起すのを防ぐために、循環血中 Flt3L に結合するのに有用である。本発明のひと 10  
つの態様において、Flt3L アнтаゴニストは、Flt3L 受容体に結合するが、このような結合のダウストリーム作用を引き起さない有機分子、すなわち、受容体リガンド擬態であることができる。このような有機分子は、この受容体の Flt3L 結合ポケットに特異的に結合し、さもなければそのように結合している Flt3L と置き換わる。本発明の Flt3L アнтаゴニストは、前述のモノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR) を含むポリペプチド、又はそれらの融合ペプチドも含む。

**【0038】**

本願明細書において使用される用語「ヒトモノクローナル抗体」(HuMAb) は、ヒト B 細胞から得られる HuMAb (例えば、この抗体は、不死化及び/もしくは活性化されたヒト B 細胞を培養することにより、又はこのような HuMAb をコードしているヒト B 20  
細胞 cDNA から組換え的に調製され、並びにこの抗体は、その生物学的活性を変更することができる分子、例えば、受容体又はリガンド、酵素、毒素、担体などに結合されるかのいずれかである)、並びにあるイソタイプの本発明の HuMAb (例えば、IgG<sub>4</sub>) の可変部分の、別のイソタイプのヒト抗体 (例えば、ヒト IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA、IgD、IgM 又は IgE) の定常領域との再結合により作出された抗体を意味する。これらの HuMAb を作成する組換え法は、当該技術分野において公知である (米国特許第 5,959,085 号参照)。

**【0039】**

インターフェロンアンタゴニスト及び Flt3L アнтаゴニストの組合せの使用は、DC 形成を低下するために非常に少ない数の各分子を使用する利点を達成することができる。 30  
このような相乗作用は、本発明の方法及び組成物において各アンタゴニストの治療的有効量の減少を可能にする点が有利である。

**【0040】**

本発明のひとつの態様において、インターフェロンアンタゴニストもしくは Flt3L ア 40  
ンタゴニストのいずれか又は両方は、ポリペプチドであることができる。このポリペプチドは、ペプチド擬態、合成ポリペプチド、天然ポリペプチドの誘導體、修飾されたポリペプチド、標識されたポリペプチド、又は非天然のペプチドを含むポリペプチドであることができる。このポリペプチドは、天然には認められない手掌性を有する、すなわち D-アミノ酸又は L-アミノ酸である、全体的又は部分的に非天然のポリペプチドであることができる。このようなペプチドにおける非天然の連結の使用は、半減期を延長し、かつこのペプチドを天然の酵素による分解から保護する。

**【0041】**

別の本発明の態様において、自己免疫疾患は、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、強直性脊椎炎、関節炎、再生不良性貧血、ベーチェット病、糖尿病、移植片対宿主病、グレーブス病、溶血性貧血、低グロブリン血症、高 IgE 症候群、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、多発性硬化症 (MS)、重症筋無力症、乾癬、狼瘡及びそれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。

**【0042】**

糖尿病は、真性糖尿病、I 型糖尿病、II 型糖尿病、若年型糖尿病又はそれらのいずれかの組合せであることができるが、これらに限定されるものではない。関節炎は、リウマチ 50

性関節炎、若年型リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎又はそれらのいずれかの組合せであることができるが、これらに限定されるものではない。狼瘡は、全身紅斑性狼瘡（SLE）又は薬剤誘発性狼瘡である。

**【0043】**

本発明の態様において、対象は哺乳類である。この哺乳類は、ヒト又は霊長類であることができる。対象は、ヒト患者であるか、又はヒト免疫疾患の症状を示し従ってヒト疾患の動物モデル、例えばマウスのトランスジェニック疾患モデル又は霊長類疾患モデル又はヒト免疫系で再構成されたSCIDマウスにおいて確立されたヒト疾患モデルである動物であることができる。この哺乳類は、ヒト、霊長類、ラット、イヌ、ネコ、ブタであることができるが、これらに限定されるものではない。本発明の別の局面において、対象は、マウス対象、ウシ対象、霊長類対象、ウマ対象、ブタ対象、又はイヌ対象である。本発明の別の局面において、この対象はSLEに罹患している。

10

**【0044】**

本発明のひとつの態様において、インターフェロンアンタゴニストは、抗-IFN-抗体又はそれらの抗原結合性フラグメントを含む。別の本発明の態様において、インターフェロンアンタゴニストはTNFである。更に本発明の別の態様において、Flt3Lアンタゴニストは、抗-Flt3L抗体又はそれらの抗原結合性フラグメントである。ある本発明の態様において、本組成物の構成要素であることができる抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、抗-イディオタイプ抗体、ヒト化された抗体、霊長類化された抗体及びそれらの組合せである。

20

**【0045】**

別の本発明の態様において、インターフェロンアンタゴニスト及びFlt3Lアンタゴニストは、ひとつの分子の一部である。本発明のある態様において、インターフェロンアンタゴニストの有効量は、対象の血清中のインターフェロン量よりも約1～約10倍モル過剰の範囲である。本発明の別の局面において、Flt3Lアンタゴニストの有効量は、対象の血清中のFlt3Lの量よりも約1～約10倍モル過剰の範囲である。

**【0046】**

本発明の方法は、組成物を対象へ投与することを含み、ここでこの組成物は、抗原提示活性を有するDCへの骨髄系DC成熟のIFN-による誘導を阻害する。本組成物の投与は、静脈内、硬膜下注射、経口、局所的、経皮膚、皮下、非経口又はエアゾールによることができる。本発明の組成物の対象への投与は、病巣内、腹腔内、筋肉内又は静脈内注射；点滴；リポソーム媒介型送達；又は、局所的、点鼻、経口、眼内又は耳内送達を包含している。更なる態様において、投与は、気管支内投与、直腸内又は鞘内投与を含む。本発明の組成物は、毎時、毎日、毎週、毎月、毎年（例えば持続放出型において）に送達されるか、もしくは一回送達として送達される。この送達は、例えば静脈内送達のように、一定期間の連続送達であることができる。送達の好ましい経路及び時期を、当業者は容易に決定することができる。

30

**【0047】**

本発明のひとつの態様において、インターフェロンアンタゴニストは、I型インターフェロンのその受容体への結合を低下する。別の態様において、インターフェロンアンタゴニストは、対象の細胞上の受容体へのインターフェロン結合後のシグナル伝達を妨害する。別の態様において、インターフェロンアンタゴニストは、対象内の細胞によるインターフェロンの産生を低下する。別の態様において、インターフェロンアンタゴニストは、対象の細胞によるインターフェロン分泌を低下する。更に別の態様において、インターフェロンアンタゴニストは、対象におけるインターフェロンの生体利用性を低下する。更なる態様において、インターフェロンアンタゴニストはTNFである。

40

別の本発明の態様において、この組成物は更に担体を含む。別の本発明の態様において、担体は、水性担体、リポソーム、又は脂質担体を含む。

**【0048】**

本発明の組成物を構成している化合物は、少なくとも部分的に非天然であるペプチド擬態

50

化合物（複数）であることができる。このペプチド擬態化合物は、F l t 3 L もしくは F l t 3 L 受容体又は I 型インターフェロンもしくは I 型インターフェロン受容体のアミノ酸配列の一部の小分子擬態であることができる。この化合物は、擬態のために、増大した安定性、効能、効力及び生体利用性を有する。更に、この化合物は減少した毒性を有することができる。ペプチド擬態化合物は、増強された小腸粘膜透過性を有することができる。この化合物は、合成により調製することができる。本発明の化合物は、L - 、D - 又は非天然のアミノ酸、 - 二置換されたアミノ酸、N - アルキルアミノ酸、乳酸（アラニンの等電点アナログ）を含むことができる。この化合物のペプチド骨格は、P S I - [ C H = C H ] で置き換えられた少なくとも 1 個の結合を有することができる。この化合物は更に、トリフルオロチロシン、p - C l - フェニルアラニン、p - B r - フェニルアラニン、ポリ - L - プロパルギルグリシン、ポリ - D , L - アリルグリシン、又はポリ - L - アリルグリシンを含む。

10

## 【0049】

本発明のひとつの態様は、ペプチド擬態化合物であり、ここでこの化合物は、適当な擬態で交換された結合、ペプチド骨格またはアミノ酸成分を有する。アミノ酸擬態に適している非天然のアミノ酸の例は、 - アラニン、L - - アミノ酪酸、L - - アミノ酪酸、L - - アミノイソ酪酸、L - - アミノカプロン酸、7 - アミノヘプタン酸、L - アスパラギン酸、L - グルタミン酸、システイン（アセトアミドメチル）、N - - B o c - N - - C B Z - L - リシン、N - - B o c - N - - F m o c - L - リシン、L - メチオニンスルホン、L - ノルロイシン、L - ノルバリン、N - - B o c - N - C B Z - L - オルニチン、N - - B o c - N - - C B Z - L - オルニチン、B o c - p - ニトロ - L - フェニルアラニン、B o c - ヒドロキシプロリン、B o c - L - チオプロリンがある。

20

## 【0050】

ある態様において、この化合物は、遊離アミノ基が誘導体化により失活されているペプチドである。例えば、このペプチドは、アリアル誘導体、アルキル誘導体または無水物誘導体であることができる。このペプチドは、アセチル化することができる。ペプチドは、その正味電荷を中和するように誘導体化される。

## 【0051】

本発明の組成物のひとつの態様は、I 型インターフェロンまたは F l t 3 L のいずれかをコードしている mRNA を切断することが可能であるリボザイムである。C e c h らの米国特許第 4 , 9 8 7 , 0 7 1 号 ; A l t m a n らの米国特許第 5 , 1 6 8 , 0 5 3 号 ; H a s e l o f f e t らの米国特許第 5 , 2 5 4 , 6 7 8 号、H a m p e l らの公開された欧州特許出願である欧州特許第 3 6 0 , 2 5 7 号を参照のこと。ひとつの態様において本発明の治療的組成物は、組換え体であり並びに I 型インターフェロン mRNA 及び / 又は F l t 3 L mRNA を切断するように操作されているリボザイムである。本発明の別の局面において、この組成物は、I F N - をコードしている mRNA 及び F l t 3 L をコードしている mRNA の両方を切断することが可能なリボザイムである組換えられた核酸を含むことができる。加えて、本発明は、F l t 3 L 又は I 型インターフェロンのいずれかをコードしている mRNA に結合し、かつこのような mRNA のタンパク質への翻訳を阻害することが可能であるアンチセンス核酸を提供する。

30

40

## 【0052】

本発明は、樹状細胞が、S L E 及び他の自己免疫疾患の原因病理の重要な因子であること、及び、樹状細胞及び / 又はそれらの産物がそれ自体 S L E 及び他の自己免疫疾患の治療にとって重要な標的であることを提供する。自己免疫疾患の例として、S L E は、リンパ球系 D C が、I F N - を含む大量のサイトカインを放出し、これが引き続き骨髄系 D C を活性化し、自己免疫反応の引き金を引きかつ持続するような疾患である。この D C サブセット間の相互作用は、( 1 ) 主に核抗原に対する、自己抗体の広いスペクトルを持つ顕著な B 細胞変更、( 2 ) 自己反応性 C D 4 + T 細胞、及び ( 3 ) S L E 患者の血清中に認められた高レベルの I 型インターフェロンに関する説明を提供している。これらの知見

50

は、SLE及び他の自己免疫疾患の原因病理における樹状細胞の重大な関与を裏付けている。

【0053】

図1は、本願明細書において明らかにされたような制御されないIFN-放出及びそのSLE病理発生における役割を例証している。SLEの始まりの損傷は、形質細胞系(リンパ球系)DCが、制御様式でIFN-分泌の引き金を引く要素である。この引き金となる要素は、ウイルス、細菌、真菌及びそれらの産物、例えばCpGDNAなどに加え薬物を含む。非制御のIFN-放出は、慢性ウイルス感染症のような永久的形質細胞系(リンパ球系)DCアクチベーター、又は例えば、FcR多型又は補体成分の不在を通じて、循環血から適切にクリアランスされない免疫複合体から始まる。形質細胞系DCは、T細胞への引き金要素の提示を可能にする成熟DCへと分化する。放出されたIFN-(他のサイトカイン類である可能性あり)は、SLE血液中に上昇量存在するアポトーシス細胞を捕獲する、単球を含む骨髓系DCの循環血中前駆体の活性化を誘導する。骨髓系DCは、アポトーシス細胞をプロセッシングし、かつそれらの抗原を自己反応性T細胞及び/又はB細胞へと提示する。自己反応性T細胞は、ここでアポトーシス細胞が負荷されたDCと共に、自己反応性B細胞を更に活性化する。これらは、DCの補助により、形質細胞へと分化する。IFN-は、SLEにおいて循環血B細胞の特徴である部分的胚中心表現型(CD38の誘導)を刺激することができるので、これも、自己反応性のB細胞の生成に直接寄与する。

【0054】

健常ドナーの血液由来の最も豊富な骨髓性DCの前駆体である単球を用い、SLE患者由来の血清を使用し免疫原性DCを誘導する方法が開発された。このようなDCは、アポトーシス細胞を捕獲しかつそれらの抗原を自家CD4+T細胞へ提示し、その結果それらの活性化及び増殖を起動することができるような活性抗原提示細胞である。このような事象の配列は、SLEにおける病原性の事象を説明している。このようなDCの形成は、狼瘡血清中のI型インターフェロンのブロックにより妨害することができ、かつこれはDC前駆体のI型インターフェロンと一緒に培養により再生され得る。形質細胞系(リンパ球系)DCの産物は、骨髓系DCの分化を誘導し、その結果抗原提示を支持し、かつ結果的病原性の過程を起動する。

【0055】

ある本発明の態様において、本発明の治療的組成物は、ふたつの構成要素、(1)Flt3Lアンタゴニスト及び(2)インターフェロンアンタゴニストを含む。別の本発明の態様において、これらの構成要素は、Flt3L及びIFN-又は他のI型インターフェロンの各々に対するアンタゴニスト性又は競合性ペプチドを含む融合タンパク質のようなひとつの化合物又は分子へ融合される。すなわち、融合ペプチドは、Flt3L活性の競合的インヒビターのペプチドである部分及びIFN-活性の競合的インヒビターのペプチドを含むことができる。別の本発明の局面において、この組成物は、Flt3L及びIFN-の各々に対するモノクローナル抗体、各抗体の抗原結合性フラグメント(CDR断片など)、又はこれらの抗体の活性(抗原結合性)断片を含む融合タンパク質を含む。別の本発明の局面において、この組成物は、Flt3Lとその受容体の間の相互作用を妨害することが可能であり、かつIFN-の活性を妨害することが可能である有機小分子から成ることができる。本発明のある局面において、この組成物は、Flt3L及びIFN-に特異的に結合するモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)を含むことができる。

【0056】

IFN-のようなI型インターフェロン又はFlt3Lのアンタゴニストとして有用なポリペプチドは、代表的受容体の結合部位から誘導されたポリペプチドであることができる。加えて、非機能性IFN-又はFlt3L(受容体結合に競合するが、受容体を持つ細胞における反応の引き金をひかないポリペプチド)が合成され得る。このような非機能性ペプチドの一例は、受容体に結合する完全な能力を伴うが、受容体を持つ細胞を活

10

20

30

40

50

性化する能力は伴わないペプチドである。このようなポリペプチドの通常のアミノ酸配列への置換又は付加又は欠失が存在することができる。保存的アミノ酸置換は以下を含む：アラニンについて置換されたバリン；アルギニンについてのリシン；アスパラギンについてのグルタミン；アスパラギン酸についてのグルタミン；システインについてのセリン；グルタミンについてのアスパラギン；グルタミン酸についてのアスパラギン酸；グリシンについてのプロリン；ヒスチジンについてのアルギニン；イソロイシンについてのロイシン；リシンについてのアルギニン、メチオニンについてのロイシン、フェニルアラニンについてのロイシン；プロリンについてのグリシン、セリンについてのトレオニン；トレオニンについてのセリン；トリプトファンについてのチロシン；チロシンについてのフェニルアラニン及びバリンについてのロイシン。

10

**【0057】**

本発明は、抗原提示細胞の産生を促進するためにI型インターフェロンの能力をブロックすることを含む、自己免疫疾患を治療する新規方法を提供する。更に本発明は、患者の自己免疫疾患発症の相対リスクを評価し及び/又は患者の疾患進行を経過観察するための *in vitro* 診断アッセイも提供する。本発明は、対象における自己免疫疾患の治療に有用な組成物の調製における、(a) I型インターフェロンの活性を低下するインターフェロンアンタゴニスト (I型インターフェロンとその受容体の間の結合を低下するような)、及び(b) Flt3Lの活性を低下するFlt3リガンド (Flt3L) アンタゴニスト (Flt3Lとその受容体の間の結合を低下するような)の使用も提供する。

**【0058】**

本発明のひとつの態様において、少なくとも1種のインターフェロンアンタゴニスト及び少なくとも1種のFlt3Lアンタゴニストは、個別の時点で対象へ投与される。別の態様において、これらは、同時に投与される。例えば、ひとつのアンタゴニストは午前中に、及びひとつは午後投与することができる。これらのアンタゴニストの投与の時期及び頻度は、同等でなければならないことはない。

20

**【0059】**

本願明細書において示されたように、I型インターフェロン又はI型インターフェロン含有血清は、DCを含むが、これらに限定されるものではない抗原提示細胞の産生に必要な因子である。このような抗原提示細胞は、本発明において、捕獲されたアポトーシス細胞からの抗原提示により、自家CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を起動することが示されている。本発明において、この分化、抗原捕獲及び抗原提示の過程は、I型インターフェロン活性のブロックにより低下される。この治療法は、自己免疫疾患進行の阻害(治療的用途)に加え、適当な遺伝的背景及び疾患発症の高リスクを有する患者における疾患発症の阻害(予防的用途)による疾患の治療に使用することができる。

30

**【0060】**

I型インターフェロンタンパク質及び/又はFlt3Lのブロックは、抗原提示細胞を産生するそれらの能力を中和する抗体(複数)を使用することを含むが、これらに限定されるものではない。I型インターフェロン受容体又はFlt3L受容体のブロックは、抗原提示細胞の産生につながる、リガンドとその受容体(複数)の間の相互作用を特異的に妨害する抗体、ペプチド又は化学物質の使用を含むが、これらに限定されるものではない。本発明において有用な阻害性であるアンタゴニスト(すなわち、本発明の組成物)を送達する方法は、タンパク質及びこのタンパク質をコードしているベクターを含むが、これらに限定されるものではない。

40

**【0061】**

本発明のひとつの態様において、I型インターフェロン及び/又はFlt3Lの機能をブロックするペプチドをコードしている核酸が対象へ投与される。例えば、ウイルスベースのベクター(遺伝子導入ベクターの例)は、これらの核酸の対象への送達に使用することができる。その結果このペプチドの翻訳が *in vivo* において生じる。この遺伝子導入ベクターは、宿主細胞内において複製することができる構築体のいずれかであることができ、かつプラスミド、DNAウイルス、レトロウイルス、更には単離されたヌクレオチド

50

分子を含むが、これらに限定されるものではない。例えばレトロウイルス又はアデノウイルスベクターを使用することができる。アデノウイルスは、発現ベクターとして、特にヒトの遺伝子療法に関して、注目が増してきている (Berkner, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:39-66 (1992))。このようなベクターは、ウイルスゲノムの全て又は一部、例えば長い末端反復配列 ("LTR")、プロモーター (例えば、CMVプロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター)、エンハンサーなどを含む。場合によっては、ベクターは、1種より多いウイルスの要素を含むことができる。本発明において使用することができるアデノウイルスの例は、当該技術分野において周知であり、かつ40種を超える異なるヒトアデノウイルス、例えばAd12 (亜属A)、Ad3及びAd7 (亜属B)、Ad2及びAd5 (亜属C)、Ad8 (亜属D)、Ad4 (亜属E)、Ad40 (亜属F)を含む (Wigandら、「Adeno Virus DNA」、Doerfler編集、Martinus Nijhoff Publishing社、ボストン、408-441ページ (1986))。アデノウイルスベクター作出法は、当該技術分野において周知である (Berknerら、Nucleic Acids Res., 11:6003-6020 (1983); van Dorenら、Mol. Cell. Biol., 4:1653-1656 (1984); Ghosh-Choudhuryら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 147:964-973 (1987); McGroartyら、Virology, 163:614-617 (1988); 及び、Gluzmanら、「Eukaryotic Viral Vectors」、Gluzman, Y. 編集、187-192ページ、Cold Spring Harbor Laboratory社、(1982))。得られるベクターは、(例えば、トランスフェクション又は形質転換、又は感染、又は注入などにより)対象中の*in vivo*であるか又は*in vitro*である宿主細胞に導入される。遺伝子導入ベクターのリポソーム媒介型導入も、本発明において行うことができる。

#### 【0062】

対象における自己免疫疾患の治療において本発明を実行するための細胞への遺伝子導入に使用することができるウイルスベクターの他の例は、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV) のようなレトロウイルス; JC、SV40、ポリオーマ、アデノウイルスのようなパポウイルス; エプスタイン-バーウイルス (EBV); パピローマウイルス、例えばウシパピローマウイルス I 型 (BPV); ワクシニア及びポリオウイルス; レンチウイルスベクター、並びに他のヒト及び動物のウイルスを含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0063】

本発明において有用な I 型インターフェロン及び FLT3L のシグナル伝達及び情報伝達の経路のブロックは、関連のあるシグナル伝達及び/又は情報伝達の経路を特異的に標的化する化学物質の使用を含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0064】

本発明において有用な I 型インターフェロンの放出及び/又は産生のブロックは、(1) 特異的化学物質を使用する細胞による I 型インターフェロン合成のブロック; (2) I 型インターフェロンを産生する細胞の標的化、その結果としての I 型インターフェロン産生の低下、並びに (3) 細胞による I 型インターフェロンの産生又は放出を低下又は阻害するための、産生及び/又は放出のシグナル伝達に必要な受容体の標的化を含むが、これらに限定されるものではない。本発明のある局面において、これらの細胞は、形質細胞系樹状細胞である。別の本発明の局面において、本発明の組成物により標的化された I 型インターフェロンを産生する細胞は、様々な分化段階 (例えば、骨髓前駆細胞及び血液前駆体) での繊維芽細胞、内皮細胞及び形質細胞系樹状細胞を含むが、これらに限定されるものではない。前述のようなその機能を低下するための組成物による細胞の標的化は、造血前駆細胞からの形質細胞系樹状細胞の分化が生じる時のこのような分化の特異的ブロックを含むが、これに限定されるものではない。

## 【0065】

本発明の組成物によるI型インターフェロンの産生及び/又は放出をシグナル伝達するために必要な受容体の標的化は、細胞上のマンノース受容体及び/又はCD32の機能をブロックするための組成物の使用を含むが、これらに限定されるものではない。

## 【0066】

ひとつの局面において、本発明は、対象における自己免疫疾患の状態を経過観察するための、又は対象が自己免疫疾患発症のリスクがあるかどうかを同定するために有用である *in vitro* 診断アッセイを提供する。この診断アッセイは、(1)試験される対象からある量の血清を得る工程；(2)いずれか公知の方法を用い(例えば、Flt3L及びIFN- $\gamma$  に特異的な抗体によるELISAの使用など)、対象の血清試料中のFlt3Lレベル及びIFN- $\gamma$  レベルを決定する工程；(3)対象血清において測定されたFlt3Lレベル及びIFN- $\gamma$  レベルを、年齢が合致しかつ性別が合致した正常な健常対象から得た血清試料中に存在することが決定された各因子のレベルと比較する工程；(4)試験される対象から測定されたレベルが、健常な対象の値よりも高いか又は低いかを確定し、これにより対象の自己免疫疾患の状態を経過観察するか又は自己免疫疾患発症に関する対象のリスクについて評価する工程を含む。

10

## 【0067】

本発明は更に、(a)対象から血清試料を得る工程；(b)血清試料中のIFN- $\gamma$  及びFlt3リガンド(Flt3L)を定量する工程；及び、(c)工程(b)において測定したIFN- $\gamma$  及びFlt3Lを、健常対象から採取した血清及び自己免疫疾患の患者から採取した血清中で測定したIFN- $\gamma$  及びFlt3Lの量と比較し、これにより該対象の自己免疫疾患発症リスクを決定する工程を含む、自己免疫疾患の発症に関する対象のリスクを決定するための *in vitro* アッセイに関する。自己免疫疾患発症の高リスクは、自己免疫疾患患者に関する測定量の30%範囲内であるような前記工程(b)の量により示される。このリスクは、量が20%である場合に増大する。別の本発明の局面において、これらの対象は年齢を合致することができる。

20

## 【0068】

本発明は、対象からの生物試料中のFlt3L及びIFN- $\gamma$  に特異的に結合する組成物を含む対象の自己免疫疾患の発症リスクを決定するため又は対象における自己免疫疾患の状態の経過観察のためのキットにも関し、ここでこの組成物は検出可能である。この検出可能なマーカーは、蛍光マーカー、放射性マーカー、酵素マーカー、比色分析用マーカー、化学発光マーカー又はこれらのいずれかの組合せを含むが、これらに限定されるものではない。

30

## 【0069】

本発明のひとつの態様において、生物試料は、血液試料又は血清試料である。本発明の別の態様において、組成物は、(a)Flt3Lに結合するモノクローナル抗体、及び(b)IFN- $\gamma$  に結合するモノクローナル抗体の混合物を含む。本発明の更なる局面において、キットは更に、1種又は複数の試料に結合した組成物の量を検出及び比較するための、1種又は複数の試薬を含む。別の本発明の態様において、このキットは更に、自己免疫疾患の発症の相対リスク又は自己免疫疾患の相対的状态に対し、生物試料に結合した組成物の量を相関させるための成分を含む。別の本発明の態様において、組成物は検出可能なマーカーにより標識されている。この検出可能なマーカーは、蛍光マーカー、放射性マーカー、酵素マーカー、比色分析用マーカー、化学発光マーカー又はこれらのいずれかの組合せであるが、これらに限定されるものではない。このキットは、診断アッセイが比較的同等の細胞数又は血清容量を比較していることを確実にするために、試料間で標準化又は正規化するための成分も含むことができる。

40

## 【0070】

本発明は、(a)対象から血清試料を得る工程；(b)血清試料中のIFN- $\gamma$  及びFlt3リガンド(Flt3L)を定量する工程；及び、(c)IFN- $\gamma$  及びFlt3Lの量を、自己免疫疾患対象の血清中のIFN- $\gamma$  及びFlt3Lの量と比較し、これにより

50

、自己免疫疾患発症に関する該対象のリスクを決定する工程を含む、自己免疫疾患発症に関する対象のリスクを決定するための、*in vitro*アッセイを提供する。

【0071】

加えて本発明は、(a)対象から血清試料を得る工程；(b)単球分化に適した条件下で、*in vitro*において血清を単球と混合する工程；(c)対象血清の、抗原を提示することが可能な樹状細胞への単球の分化を誘導する能力を測定する工程；及び、(d)工程(c)で測定された能力を、(i)健常対象から採取した血清の能力、及び(ii)自己免疫疾患に罹患した対象から採取した血清の能力と比較し、これにより自己免疫疾患発症に関する該対象のリスクを決定する工程を含む、自己免疫疾患を発症する対象のリスクを決定するための*in vitro*アッセイも提供する。

10

【0072】

別の局面において本発明は、自己免疫疾患発症の患者のリスクを決定しかつ経過観察するための、*in vitro*診断アッセイである。この診断アッセイは、患者が自己免疫疾患を発症するリスクを評価するために、患者血清の*in vitro*における単球の樹状細胞への分化を誘導する能力を測定する。これに関して、患者の血清が、公知の正常基準（数名の年齢が合致し、性別が合致した健常な個人からの血清を使用することにより決定され得る）よりもより効果的に単球の樹状細胞への分化を誘導するならば、このアッセイは、自己免疫疾患患者の疾患再燃を予測し、及び/又は患者が、自己免疫疾患発症のリスクがあるかどうかの詳細な診断評価が必要であることの指標となる。加えてこの診断アッセイは、患者が既に自己免疫疾患であると診断されている場合には、患者の疾患状態の経過観察に有用であり、患者は本発明の診断アッセイを、自宅で又は他の都合の良い場所で、自己免疫疾患の進行又は改善を経過観察し、並びにそれに従い患者の治療方式を調節するために、利用することができる。

20

【0073】

この組成物の有効量は、使用される実際の組成物によって決まるであろう。この実際的な有効量は、化合物のサイズ、化合物の生物分解性、化合物の生体活性、及び化合物の生体利用性を基にしている。この化合物が迅速に分解されず、生体利用可能で高い活性がある場合は、有効であるためにはより少ない量が必要とされる。この有効量は、当業者により決定され；これは、化合物の形状、化合物のサイズ及び化合物の生体活性により決まるであろう。当業者は、バイオアッセイにおいて生体活性を決定し、その結果有効量を決定するために、化合物に関する経験的活性試験を慣習的に行うことができる。

30

【0074】

本発明は、治療的有効量のポリペプチド組成物及び化合物を、適当な希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント及び/又は担体と共に含有する、医薬組成物を提供する。このような組成物は、液体であるか、もしくは凍結乾燥されるか又はさもなければ乾燥された処方であることができ、かつ様々な緩衝剤成分（例えば、Tris-HCl、酢酸、リン酸）、pH及びイオン強度の希釈剤、表面への吸収を防止するためのアルブミン又はゼラチンのような添加剤、界面活性剤（例えば、TWEEN（登録商標）20、TWEEN（登録商標）80、Pluronic F68、胆汁酸塩）、可溶化剤（例えば、グリセロール、ポリエチレングリコール）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存剤（例えば、チメロサール、ベンジルアルコール、パラベン）、増量剤又は張度改良剤（例えば、乳糖、マンニトール）、化合物へのポリエチレングリコールのような高分子の共有結合、金属イオンとの錯体形成、又は化合物の、ポリ乳酸、ポリグリコール酸ヒドロゲルのような高分子化合物の粒状調製物の中へのもしくは上への取込み、又はリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層もしくは多層ベシクル、赤血球ゴーストもしくはスフェロプラスト上への取込みを含む。このような組成物は、化合物又は組成物の物理的状態、溶解度、安定性、*in vivo*放出速度、及び*in vivo*クリアランス速度に影響を及ぼすであろう。組成物の選択は、その組成物の物理的及び化学的特性によって決まるであろう。

40

【0075】

50

制御型又は持続型放出組成物は、親油性デポー（例えば、脂肪酸、ワックス、油）内の処方を含む。

更に本発明により包括されるのは、ポリマー（例えば、ポロキサマー又はポロキサミン）により被覆された粒状組成物、及び組織 - 特異的受容体、リガンドもしくは抗原に対する抗体に結合された、もしくは組織 - 特異性受容体の又はいずれか他の組織 - もしくは細胞 - 標的化ペプチドのリガンドに結合された、治療的組成物である。別の本発明の治療的組成物の態様は、非経口、肺内、鼻腔及び経口を含む様々な投与経路に関する、粒状の保護的コーティング、プロテアーゼインヒビター又は透過性増強剤を取込んでいる。

【0076】

化合物が投与される場合、これは循環血から迅速にクリアランスされることが多く、従って比較的短い寿命の薬学的活性を引き出す。結果的に、治療的効能を持続するためには、生体活性化合物の比較的大用量の頻回注射が必要であることがある。ポリエチレングリコール（PEG）のような水溶性ポリマー、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン又はポリプロリンとの共有結合により修飾された化合物は、対応する未修飾の化合物よりも、静脈内注射後の血中で実質的により長い半減期を示すことがわかっている。このような修飾は、水溶液中のこの化合物の溶解度を増大し、凝集を排除し、化合物の物理的及び化学的安定性を増強し、かつ化合物の免疫原性及び反応性を大きく低下することがある。結果的に、所望の *in vivo* 生物活性を、このようなポリマー - 化合物の付加物の、未修飾の化合物よりもより少ない頻度又はより少ない用量での投与により、達成することができる。

【0077】

ポリエチレングリコール（PEG）の化合物への結合は、PEGは哺乳類における毒性が非常に低いので、特に有用である（Carpenterら、1971）。例えば、アデノシンデアミナーゼのPEG付加物は、米国において、重症の合併症である免疫不全症候群の治療のための臨床使用が認可されている。PEGの共役によりもたらされる第二の利点は、異種（heterologous）化合物の免疫原性及び抗原性の効果的低下である。例えば、ヒトペプチドのPEG付加物は、重度の免疫応答を惹起するリスクを伴わずに、他の哺乳類種の疾患の治療に有用となることができる。本発明のポリペプチド又は組成物は、該ポリペプチドに対する又は該ポリペプチドを生成し得る細胞に対する宿主免疫応答を低下又は防止するために、マイクロカプセル封入装置内で送達することができる。本発明のポリペプチド又は組成物は、リポソームのような膜内にマイクロカプセル封入することにより送達することもできる。

【0078】

例として、PEGのようなポリマーは、治療的組成物のペプチド中の1個又は複数の反応性アミノ酸残基、例えば、アミノ末端アミノ酸の - アミノ基、リシン側鎖の アミノ基、システイン側鎖のスルフヒドリル基、アスパルチル及びグルタミル側鎖のカルボキシル基、カルボキシ - 末端アミノ酸の - カルボキシル基、チロシン側鎖、又はある種のアスパラギン、セリン又はトレオニン残基に結合した糖鎖の活性化された誘導体に都合良く結合され得る。

【0079】

タンパク質との直接反応に適したPEGの多くの活性化された形が説明されている。タンパク質アミノ基との反応に有用なPEG試薬は、カルボン酸の活性エステル又はカルボン酸誘導体、特に脱離基がN - ヒドロキシスクシンイミド、p - ニトロフェノール、イミダゾール又は1 - ヒドロキシ - 2 - ニトロベンゼン - 4 - スルホン酸エステルであるものを含む。マレイミド又はハロアセチル基を含むPEG誘導体は、タンパク質と無関係の（protein free）スルフヒドリル基の修飾に有用な試薬である。同様に、アミノヒドラジン又はヒドラジド基を含むPEG試薬は、タンパク質中の糖基の過ヨウ素酸酸化により生成されたアルデヒドとの反応に有用である。

【0080】

10

20

30

40

50

ある好ましい態様において、医薬担体は液体であることができ、かつこの医薬組成物は溶液の形状である。別の同等に好ましい態様において、医薬として許容できる担体は固形物であり、かつこの組成物は散剤又は錠剤の形状である。更なる態様において、医薬担体はゲルであり、この組成物は坐剤又はクリーム剤の形状である。更なる態様において、活性成分は、医薬として許容できる経皮貼付剤の一部として処方することができる。

**【0081】**

固形担体は、矯味矯臭剤、滑沢剤、可溶化剤、懸濁化剤、充填剤、直打用滑沢剤、圧縮助剤、結合剤又は錠剤の崩壊剤としても作用することができる1種又は複数の物質を含み得；更にこれはカプセル封入物質であることもできる。散剤において、担体は、微粉碎された活性成分と混合されている微粉碎された固形物である。錠剤において、活性成分は、適 10  
当な割合で必要な圧縮特性を有する担体と混合され、並びに所望の形状及びサイズに圧縮される。散剤及び錠剤は、活性成分を最大99%含有することが好ましい。適当な固形担体は、例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、乳酸、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、ポリビニルピロリドン、低融点ワックス及びイオン交換樹脂を含む。

**【0082】**

液体担体は、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤及び加圧した組成物の調製において使用される。活性成分は、水、有機溶媒、両方の混合物のような医薬として許容 20  
できる液体担体、又は医薬として許容できる油分もしくは脂質中に、溶解又は懸濁することができる。液体担体は、他の適当な医薬添加剤、例えば可溶化剤、乳化剤、緩衝剤、保存剤、甘味剤、矯味矯臭剤、懸濁化剤、増粘剤、着色剤、粘度調節剤、安定化剤又は浸透圧調節剤などを含有することができる。経口及び非経口投与に適した液体担体の例は、水（部分的に、前記添加剤、例えばセルロース誘導體、好ましくはカルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を含有する）、アルコール（一価アルコール及び多価アルコール、例えばグリコールを含む）及びそれらの誘導體、並びに油分（例えば、分画されたココナツ油及び落花生油）を含む。非経口投与については、担体は、オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルのような油状のエステルであることもできる。滅菌液体担体が、非経口投与用の無菌の液体組成物において有用である。加圧型組成物のための液体担体は、ハロゲン化炭化水素又は他の医薬として許容できる噴射剤であることができる。

**【0083】**

無菌の液体又は懸濁液である液体医薬組成物は、例えば、筋肉内、鞘内、硬膜外、腹腔内 30  
又は皮下注射により利用することができる。無菌液は、静脈内投与することもできる。この活性成分は、滅菌した水、生理食塩水又は他の適当な滅菌した注射用媒質を用い、投与時に溶解又は懸濁することができる無菌の固形組成物として調製することもできる。担体は、必要かつ不活性の結合剤、懸濁化剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、甘味剤、保存剤、色素及び着色剤を含むことが意図されている。

**【0084】**

本発明の治療的組成物の活性成分（すなわち、Flt3Lアンタゴニスト及びインターフェロ 40  
ンアンタゴニスト）は、例えば等張液を作成するのに十分な生理食塩水又はブドウ糖、胆汁酸塩、アラビアゴム、ゼラチン、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート80（エチレンオキシドと共重合されたソルビトールのオレイン酸エステル及びその無水物）などのような、他の溶質又は懸濁化剤を含有する、無菌の液剤又は懸濁剤の形状で経口投与することができる。

**【0085】**

活性成分は、液体又は固形組成物のいずれかの形状で経口投与することもできる。経口投 50  
与に適した組成物は、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、錠剤及び散剤のような固形の形状、並びに液剤、シロップ剤、エリキシル剤及び懸濁剤のような液体の形状を含む。非経口投与に有用な形状は、無菌の液剤、乳剤及び懸濁剤を含む。

**【0086】**

特に記さない限りは、本発明の実践は、当該技術分野の範囲内である、分子生物学、微生

10

20

30

40

50

物学、組換えDNA技術、及び免疫学の通常の技術を利用するであろう。このような技術は、下記の文献に説明されている：例えば、Sambrook、Fritsch、及びManiatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、(1989)；DNA Cloning、第I及びII巻(D. N. Glover編集、1985)；Oligonucleotide Synthesis、(M. J. Gait編集、1984)；Nucleic Acid Hybridization(B. D. Hames及びS. J. Higgins編集、1984)；Animal Cell Culture(R. K. Freshney編集、1986)；Immobilized Cells and Enzymes(IRL press社、1986)；Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning(1984)；一連の、Methods In Enzymology(S. Colowick及びN. Kaplan編集、Academic Press社)；並びに、Handbook of Experimental Immunology、第I-IV巻(D. M. Weir及びC. C. Blackwell編集、1986、Blackwell Scientific Publications社)。

【0087】

本願明細書において使用される単語「又は」は、特定のリストの一員を意味し、かつそのリストの一員のあらゆる組合せを含む。

本願明細書において使用される単数形「ひとつの(a, an)」及び「この(the)」は、本文において特に明確に指摘しない限りは、複数の意味も含む。

【0088】

本発明は更に、下記実施例を参照し説明されるであろう；しかし、本発明は、このような例に限定されないことは、理解されなければならない。むしろ、本発明を實踐する上で現在最良の態様を説明している本発明の説明を考慮し、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、当業者は多くの修飾及び変更を行うであろう。「特許請求の範囲」と同等の意味及び範囲内である全ての変更、修飾及び変化は、その範囲内であると見なされるべきである。

【0089】

実施例1：SLE血清は樹状細胞様特性を持つ細胞への単球の分化を誘導する 30

正常な単球を、SLE血清に*in vitro*において曝した：12～24時間以内に、単球のクラスター化が認められ；かつ、24～48時間以内に、クラスター化された細胞は、DC培養物を暗示する細かい細胞質突起を示した(図2A及び2B)。SLE血清のみが、12～24時間以内に単球のクラスター化を誘導し、かつベール状(*veiled*)の細胞形態を獲得した(図2A-2Bと、図2CのAS比較)。

【0090】

SLE血清：SLEに関するアメリカリウマチ学会(ACR)の診断基準を満たした患者から、インフォームドコンセントを得た後、血液を採取した。全血を、EDTA又はヘパリンを含有するチューブに採取し、かつ直ぐに100 × g、4 での遠心により分離した。血漿を収集し、トロンピン(Jones Pharma社、MO)処理し、使用時まで-80 で保存した。疾患活動性は、血液標本を得た日に決定し、SLE疾患活動性指標(SLEDAI)スコアを用いて評価した(Lahita, R. G., 1999, Systemic Lupus Erythematosus, Academic Press社、第3版)。

【0091】

細胞培養及び表現型分析：単球は、Ficoll-Paque(登録商標)勾配の後、精製した抗-CD3、抗-CD19、抗-CD56及び抗-グリコホリンA抗体を用い、T細胞、B細胞及びNK細胞を枯渇することにより、引き続きの免疫磁気による枯渇(Dynabead)により、血液単核細胞から単離した。濃厚化したCD14<sup>+</sup>単球を、6ウェルプレート(1 × 10<sup>6</sup> / ウェル)で、GM-CSF 100 ng / mL及びIFN - 50

1000 UI/mL;又は、GM-CSF 100 ng/mL及びIL-4 20 ng/mL;又は、狼瘡血清;又は、自家血清の存在下で、3日間培養した。3日目に、細胞を収集し、かつ抗-CD14-PE抗体、抗-CD83-PE抗体、抗-HLA-DR-PrCP(ペリディニククロフィルタンパク質)抗体、抗-マンノース-受容体-PE抗体、抗-CD80PE(フィコエリトリン)抗体、抗-CD86-PE抗体、抗-CD40-PE抗体、抗-CD16-PE抗体、抗-CD32-PE抗体、抗-CD64-PE抗体及び抗-CD1a-FITC抗体により、染色した。

#### 【0092】

正常ドナー由来の濃厚化したCD14<sup>+</sup>単球は、20%狼瘡血清又は自家血清の存在下で、培養した(1×10<sup>6</sup>/ウェル)。単球は、SLE-DCと共に培養し、3日目に細胞を収集し、ある細胞表面分子の発現についてフローサイトメトリーにより評価した。フローサイトメトリー分析は、CD14のダウンレギュレーション、並びにMHCクラスII、共刺激分子:CD40、CD86及びCD80、CD83に加え、マンノース-受容体、CD32及びCD36の増加した発現を明らかにした(図3)。マクロファージ(M)ではなく、DCの形態及び表現型を有する細胞への単球分化の誘導は、SLE血清中で増殖されたそれらのDCに限定された。実際に、自家血清も同種異系の血清もこのような表現型を誘導しなかった(図2C)。

10

#### 【0093】

下記抗原に対するモノクローナル抗体(mAb)を利用した:CD14、HLA-DR(Becton Dickinson社);CD86、CD40、HLA-ABC、CD1a(Dako, Carpinteria社、CA);CD80、CD83(Beckman Coulter/Immunotech社、ニューヨーク)。

20

#### 【0094】

SLE血清が誘導した細胞は、抗原捕獲受容体を展示し、かつ抗原を捕獲する能力はDCの重要な特性であるので、培養物中で分化された細胞は、可溶性抗原を捕獲することができるかどうかを決定した。この目的のために、SLE血清培養した単球を、FITC-デキストランと共にインキュベーションした。図4A-4Eに示したように、SLE血清-誘導した細胞は、FITC-デキストランの取込みにおいて、GM-CSF/IL-4誘導したDCと同程度有効であった。

#### 【0095】

培養物中で分化した細胞のエンドサイトーシス活性を、100µg/mL FITC-デキストランと共に細胞を37で1時間インキュベーションすることにより決定した。対照として、一部の細胞を、氷上で、FITC-デキストランと共にインキュベーションした。これらの細胞は、冷PBS/FCSで洗浄し、かつフローサイトメトリーにより分析した。

30

#### 【0096】

その結果、形態、表現型及び抗原捕獲は、SLE血清が単球の、抗原の捕獲が可能な細胞、すなわちCD14、マンノース受容体及びCD36のような抗原捕獲分子を発現している細胞(未熟DC及びMの特徴)、並びにHLA-DR、共刺激分子及びCD83を含む抗原提示に重要な分子、及び成熟DCのマーカーを発現している細胞への分化を指示していることを示した。

40

#### 【0097】

次に、SLE血清と共に培養された単球が、全ての抗原提示細胞の間でDCに独自の特性であるナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を誘導することができるかどうかを決定した。図5に示したように、自家血清と共に培養された単球は、同種異系のCD4<sup>+</sup>Tリンパ球の限定された増殖を誘導したのに対し、SLE血清と共に培養された単球は、DCの*in vitro*における標準の特性である、GM-CSF/IL-4 DCに類似した強力なT細胞増殖を誘導した。図6は、SLE-DC又はAS血清中で培養されたDCのいずれかにより誘導されたT細胞により産生されたT細胞サイトカインのレベルを図示している。SLE-DCは、T細胞のIFN-産生は誘導したが、IL-10は誘導せず(無視

50

できるレベルを除く)、従って、I型分極(polarization)(Th1)を明らかにしている。SLE血清、AS血清、GM-CSF/IFN- $\gamma$ 又はGM-CSF/IL-4のいずれかと共に培養した単球は、洗浄し、かつ同種異系のCD4<sup>+</sup>T細胞と共に播種した。5日培養した後上清を収集し、かつ一晚PHAで再刺激した。サイトカイン放出は、ELISAアッセイによりアッセイし、かつIL-10及びIFN- $\gamma$ は、縦軸上に、pg  $\times 10^3$ /mLで示した。その結果、活性化したCD4<sup>+</sup>Tリンパ球は、高レベルのインターフェロン- $\gamma$ 、低レベルのIL-10を分泌し、及びIL-4は分泌せず、I型分極と一致した。

#### 【0098】

T細胞増殖及びサイトカインアッセイ：DCは、cRPMI+10%ヒトAB血清中、 $1 \times 10^5$ 個の新たに単離したCD4<sup>+</sup>同種異系のT細胞と共に漸増用量で5日間、もしくはナイーブCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>同種異系のTリンパ球と共に培養した。自家T細胞増殖をアッセイするために、GM-CSF/IFN- $\gamma$ 又はGM-CSF/IL4又は狼瘡細胞を、DNA-ボディで4時間パルスし、かつ漸増用量で $1 \times 10^5$ 個の自家T細胞と共に培養した。細胞は、最後の16時間、 $0.5 \mu\text{Ci}$  [<sup>3</sup>H]チミジン/ウェルでパルスした(New England Nuclear社、ボストン、MA)。サイトカイン分析に関しては、上清を培養後5日目に収集し、かつこれらの細胞を新鮮培地中PHAで24時間再刺激した。サイトカインの放出を、ELISAキットによりアッセイした(R&D Systems社、ミネアポリス、MN)。

10

#### 【0099】

実施例2：SLE-DCは捕獲されたアポトーシス細胞から抗原を提示する

免疫系によるアポトーシス細胞の非-正常かつ不適切なプロセッシングは、SLEにおける病原性事象のひとつと見なされる。従って次にSLE-DCは、捕獲されたアポトーシス細胞から抗原を提示することができるかどうかを決定した。この目的のために、SLE-DCは、培養物中のアポトーシス細胞断片を捕獲することができることが示された(図7A-7B)。

20

#### 【0100】

SLE-DCは、黒色腫細胞由来のアポトーシスボディを含むDNAも捕獲することができる。図8A及び8Bは、同種異系のアポトーシス細胞の捕獲及び自家CD4<sup>+</sup>T細胞に対するそれらの抗原提示を示している。SLE-DCは、DNAを含むアポトーシスボディを捕獲し(図8A)、かつCD4<sup>+</sup>T細胞増殖の誘導により示されるような、自家CD4<sup>+</sup>T細胞に対するそれらの抗原を提示した(図8B)。AS血清、SLE血清及びGM-CSF/IL-4により誘導されたHLA-DR<sup>+</sup>単球は、7AAD標識されたDNA-ボディ(線照射(150Gy)により殺傷された黒色腫細胞株)を捕獲した。アポトーシスボディの捕獲を可能にするために、抗原提示細胞を、殺傷された細胞と混合し、かつ37°Cで1時間インキュベーションした。その後これらの負荷されたSLE-DCを、フローサイトメトリーにより選別し、かつ自家CD4<sup>+</sup>T細胞と共に培養した。T細胞増殖は、5日後に決定した。

30

#### 【0101】

これらの負荷されたSLE-DCはその後、自家CD4<sup>+</sup>T細胞と共に培養した。図8Bに示したように、負荷されたSLE-DCは、自家CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を誘導することができた。従ってSLE血清は、単球に、アポトーシス細胞からプロセッシングされた抗原を捕獲及び提示することができる機能性DCへの分化を誘導する。

40

#### 【0102】

実施例3：IFN- $\gamma$ を含む活動性SLE血清のみが単球がSLE-DCになることを誘導する

全てのSLE血清が、単球にDCへの分化を指示することができるかどうかを決定するために、実験を行った。単球は、それらの混合型白血球応答又は混合型リンパ球反応(MLR)を刺激する能力について試験される19種の異なるSLE血清と共に培養した。表1に示したように、自家血清と共に培養した単球は、非常に低いT細胞増殖(陰性対照)の

50

みを誘導し、かつGM-CSF/IL-4と共に培養した単球は、DC誘起された100%MLR(陽性対照)を産出し、この平均増殖は7.5%(±6.4%、n=5)であることがわかった。SLE血清と共に培養した単球を同じ方法で評価し、カットオフ値を20%増殖(自家血清で培養物した単球の平均+2SD)とみなすと、19種の血清が誘導した単球の中の11種が、アロ刺激性DCとなり、平均増殖は41%±15%であった。皮膚筋炎患者からの血清は、この歪み(skew)では再生することができず、かつ皮膚筋炎患者はSLE患者と同じステロイド方式で治療されたので、SLE血清の作用は、ステロイドとは無関係であると結論付けた。更に2名の新たに診断された治療を受けていない患者が、単球をSLE-DCへ効率的に分化した。重要なことは、SLE-DCにより誘導された11種の血清の中で、IFN- $\gamma$ レベルについて試験された7種の血清が、190pg/mLより多いIFN- $\gamma$ を含んだのに対し、SLE-DCを誘導することができないほとんどの他の血清は、このアッセイにおいて検出される値(12pg/mL)よりも低いIFN- $\gamma$ を含むことである(表1)。更に、SLE血清のDC誘導能は、疾患活動性に関連していた。図9A-9Bにおいて、グラフは、SLE疾患活動性のSLE-DCの誘導活性に対する関係を示している。単球は、活動型狼瘡(SLE疾患活動性指標(SLEDAI)>6)の患者又は非活動型狼瘡(SLEDAI<6)の患者から採取した11種の異なるSLE血清と共に培養し、かつ産生された細胞を、T細胞増殖を誘導するそれらの能力について試験した。対照として単球を、GM-CSF及びIL-4と共に培養した。縦軸は、誘導されたアロ刺激能の割合(%)を示した。その結果、SLE血清の単球分化をDCへと歪める能力は疾患-特異的であり、かつIFN- $\gamma$ のレベルと相関していた。

10

20

## 【0103】

表1: IFN- $\gamma$ 含有SLE血清は、単球に、混合リンパ球反応刺激能の獲得を誘導する

血清	MLR	IFN- $\alpha$ レベルpg/ml	SLEDAI
SLE1	53%	ND	20
SLE2	58%	>500	8
SLE3	27%	192	12
SLE4	28%	ND	24
SLE5	33%	>500	12
SLE6	5%	<12.5	2
SLE7	45%	733	14
SLE8	34%	410	17
SLE9	26%	>500	10
SLE10	4%	<12.5	6
SLE11	12.5%	25	6
SLE12	70%	>500	12
SLE13	4%	<12.5	4
SLE14	50%	ND	4
SLE15	10%	<12.5	6
SLE16	16%	78	6
SLE17	30%	>500	8
SLE18	60%	>500	17
SLE19	7.5%	<12.5	14
SLE20	4%	<12.5	2
AS (n=8)	7%	<12.5	
若年型関節炎 (n=2)	3%	<12.5	
皮膚筋炎 (n=3)*	4%	<12.5	
GM/IL4	100%		

10

20

30

40

50

## 【0104】

単球を、異なるSLE血清と共に培養し(表1、第1欄)、かつ産生された細胞を、それらの同種異系のT細胞増殖を誘導する能力について試験した(混合型リンパ球反応{第2欄、表1、MLR})。対照として、単球を、GM-CSF及びIL-4と共に培養し、かつ100%標準として使用した。SLE血清と共に培養した単球のアロ刺激活性は、T細胞増殖の割合(%)として表現し、GM-CSF及びIL-4と比較し、かつ血清中IFN- $\alpha$ レベル(第3欄、表1)及び疾患活動性(SLEDAI、第4欄、表1)と関連づけた。SLEDAIは、9群の臨床及び臨床検査評価からなり、これは臓器系の評価：CNS、血管、腎、骨格筋、漿膜、皮膚、免疫学的及び血液学的評価を含む。NDは、実施せずを意味し、ASは、健常ドナー由来の自家血清を意味し、SLEは、SLE患者由

来の血清を意味する。

【0105】

実施例4：SLE血清のSLE-DCを誘導する能力はIFN- のブロックにより破棄される

単球の抗原提示細胞産生への分化を歪めるDCの能力は、SLE血清中のIFN- のレベルに関連していた。SLE-DCの表現型は、GM-CSF及びIFN- により誘導されることを暗示しており、かつその結果、SLE血清を、抗-IFN- 中和抗体と共に予備インキュベーションした。このような血清と共に培養した細胞を、それらのMLR誘導能として測定した、それらの単球のDCへの分化の誘導能について試験した。SLE血清の機能的DCの誘導能は、IFN- の中和により阻害されたが、そのイソタイプ対照（図10に示した）のみではなく、他のIL-4、CD40-L及びIL-10に対する遮断抗体によっても阻害されず、これはIFN- が、SLE-DCの誘導に必須であることを示している。図10は、SLE患者から得た単球細胞培養物血清中におけるIFN- のブロックを例示している。インターフェロン遮断抗体の添加は、同種異系のCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を誘導する能力の大きい低下を生じた。これらの結果は、SLE血清のDCを誘導する活性が、IFN- により左右され、かつ単球培養に使用されるSLE血清中のIFN- のブロックにより破棄されることを示している。精製した単球は、SLE血清、又は飽和濃度のIFN- 遮断Ab（SLE ab）（BioSource社）で30分間予備インキュベーションした血清、又はイソタイプ対照（SLE対照）の対応する濃度と共に培養した。3日後、細胞を、同種異系のCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を誘導する能力について評価した。

10

20

【0106】

実施例5：SLE患者はIFN- 高血清レベルを有する

小児SLE患者のIFN- の血清レベルを測定した。図11に示したように、SLE患者から採取した血清は、健常対象（対照）から得た血清よりも非常に高レベルのIFN- を有した。血清をSLE患者から採取した。この血清を、ヒトインターフェロンに関する国際参照基準（米国立衛生研究所（NIH）承認）を基にしたELISAキット（BioSource社、製造業者の推奨に従い使用）を使用し、IFN- に関してアッセイした。比色反応を、HRP及びTNBを用いて発色した。450nmでの吸光度を、マイクロプレートリーダーにより決定した。このアッセイの拡大範囲プロトコルを用い、100～5000pg/mLの範囲の血清レベルを決定することができる。

30

【0107】

実施例6：PBMC SLE患者はウイルス引き金に反応してIFN- を分泌する

インフルエンザウイルスに曝露した場合に、SLE患者のPBMCは、インフルエンザウイルスに曝露された健常成人のPBMCから放出されたIFN- レベルと比べ、高レベルのIFN- を放出した（図12参照）。

【0108】

実施例7：IFN- は単球上のBAFF/Bly s発現及びPBMC上のBCMA発現を誘導する

BAFF/Bly s-L（TNFファミリーに属するB細胞活性化因子）と称されるTNFファミリーの新規メンバーが、DC及びT細胞上で発見され、かつこれはB細胞上のふたつの受容体、すなわちBCMA及びTACIに結合し、かつそれらの増殖及び免疫グロブリン分泌を誘導する。従って、IFN- が、各細胞型上で両分子（すなわち、BCMA及びTACI）の発現を調節するかどうかを決定した。図13A-13Bに示されたように、IFN- は、リアルタイムPCRにより決定されたように、単球において高レベルのBAFF/Bly sを誘導するが、他の因子は誘導しない。更にIFN- は、正常PBMC上にBCMA発現を誘導する。

40

【0109】

実施例8：In vitro診断アッセイにおける単球分化の誘導に関する患者血清のスクリーニング

50

患者由来の血清は、その後の分化をI型インターフェロンの中和によりブロックすることができるような樹状細胞への単球分化を誘導するその能力についてスクリーニングした。

【0110】

実施例1に詳述した手順に従い、患者血清を得た。実施例1に述べた手順に従い、患者血清のアリコート、正常な患者からの精製した単球アリコートに添加した。約3日後、単球の樹状細胞への分化の程度を、当該技術分野において公知の手段により評価した。アッセイ法の例は、直接の形態学的分析、フローサイトメトリーによる表現型分析、FITC-デキストラン取込みにより測定可能な抗原捕獲、及びチミジン取込みによる測定可能な同種異系のナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞の誘導がある。この*in vitro*診断アッセイは、その患者から採取した血清の試料により得られた結果を分類するための、公知の標準セットを含む。簡単に述べると、正常患者、すなわち自己免疫疾患に罹患していないことがわかっている患者からの血清に、このアッセイを行い、かつ得られた結果を自己免疫疾患発症に関する低リスクの標準指標として使用する。同様に、SLEのような自己免疫疾患を有することがわかっている患者の血清を採取し、このアッセイにおいて使用し、かつ得られた結果を、自己免疫疾患発症に関する高リスクの基準指標として使用する。I型インターフェロンによりブロックすることができる高程度の樹状細胞への単球分化を支持する患者血清は、自己免疫疾患発症のリスクの高い患者であるとみなされる。単球分化の「高程度」は、患者の血清を使用するアッセイにおける単球分化の量の、先に確立された高リスク値、低リスク値及び他の中リスク値に関する標準との比較により決定される。自己免疫疾患発症リスクの各レベルは、本アッセイにおいて認められた単球分化のレベルに関連づけられる。患者血清が、I型インターフェロンによりブロックされ得る高程度の単球の樹状細胞への分化を支持しないならば、この患者の自己免疫疾患発症のリスクのレベルは、ほとんどないか又はリスクがない。自己免疫疾患と診断された患者について、このアッセイによる患者血清の定期的評価は、疾患再燃又は進行に関する経過観察の方法を提供する。

【0111】

実施例9：TNFはpDCによるI型インターフェロン分泌を阻害する

Kadowakiら(J. Exp. Med. 192: 1785-96 (2000))は、自己分泌IFN- $\gamma$ は、pDC生存を支持する一方で、自己分泌TNF- $\alpha$ は、IFN- $\gamma$ を産生することができない成熟pDCへのそれらの成熟を誘導することを明らかにした。従って、中和TNF抗体の正常pDC培養物への添加が、ウイルス引き金に反応したそれらのIFN- $\gamma$ 産生を維持するかどうかを決定するために研究を行った。

【0112】

これらの研究のために、pDCを、CD11c陰性細胞及びCD123陽性細胞のフローサイトメトリー選別により、CD34<sup>+</sup>造血前駆細胞の培養物から単離した。単離したpDCは、50,000細胞/ウェル/200 $\mu$ Lの濃度で、インフルエンザウイルス(5 $\mu$ L)及び対照抗体又は中和抗-TNF抗体のいずれかと共に培養した(初代培養)。初代培養24時間の後、これらのプレートを遠心し、上清を収集し、かつこれらの細胞を新鮮な培地において、新たな用量(5 $\mu$ L)の流感(flu)ウイルスと共に再培養した(二次培養)。更に24時間の二次培養後、上清を収集し、かつIFN- $\gamma$ レベルの存在について評価した。

【0113】

図14A-14Cは、形質細胞系DC(pDC)によるIFN- $\gamma$ 分泌のTNF調節を示している。CD34<sup>+</sup>造血前駆細胞のFlt3L(100ng/mL)及びトロンボポエチン(TPO)(30ng/mL)と一緒に培養により*in vitro*において産生された精製したDCは、濃度50,000細胞/ウェルで、精製したインフルエンザウイルス(5 $\mu$ L)と共に、対照抗体(5 $\mu$ g/mL)又は中和抗-TNF抗体(5 $\mu$ g/mL)のいずれかと共に、もしくは外因性TNF(100ng/mL)と共に培養した(初代培養)。24時間培養後、これらのプレートを遠心し、上清を収集し、かつこれらの細胞を新鮮な培地において、新たな用量のインフルエンザウイルスと共に再培養した(二次培

養)。更に24時間の培養後、上清をIFN- $\gamma$ レベルの評価のために収集した。図14Aに示したように、中和抗-TNF抗体の添加は、二次培養物中のIFN- $\gamma$ の3-倍増加した放出を生じた。対照的に、TNFの添加は、pDCの初代培養において最大70%のIFN- $\gamma$ 放出の阻害を生じた(図14B参照)。図14Cに示したように、初代培養上清中のIFN- $\gamma$ の濃度は、100ng/mLから40ng/mLへ減少した。

#### 【0114】

この研究は、いかにして未熟pDCは、TNF(又はアゴニスト性抗-TNF受容体結合物質)中のインキュベーションによりIFN- $\gamma$ 分泌をブロックすることができるかに関する図16に要約した限定的でない理論を提供している。従って、TNFと共にインキュベーションされたpDCは、成熟pDCとなるよう促進され、これはIFN- $\gamma$ を分泌しない。

10

#### 【0115】

##### 実施例10: TNFはpDC個体発生を阻害する

次に、TNFのpDCに対する作用は、それらの成熟/IFN- $\gamma$ 産生について制限されるかどうか、もしくは骨髄系樹状細胞分化の調節に関与している主要なプロ炎症性サイトカインであるTNFも同じくpDCの造血前駆細胞からの分化に影響を及ぼすかどうかを決定する研究を行った。これらの研究において、CD34+CD45RA-造血前駆細胞を、フローサイトメトリーにより、純度90%以上で選別し、引き続きFlt3L(100ng/mL、R&D社)、トロンボポエチン(TPO、30ng/mL、R&D社)、及びインターロイキン-6(IL-6、25ng/mL、R&D社)又は腫瘍壊死因子(TNF、100ng/mL、R&D社)のいずれかの存在下で培養し、第一週の培養は2/5 x 10<sup>5</sup> ~ 5 x 10<sup>5</sup>/ウェルの密度であった。その後これらの細胞を洗浄し、更に約3週間、Flt3L(100ng/mL)のみと共に培養した。

20

#### 【0116】

図15は、TNFは、骨髄系DCを選別し、形質細胞系DCの分化をブロックすることを示す、フローサイトメトリー実験の結果を示している。pDC分化は、CD11cネガティブCD123ポジティブ染色により同定された、pDCによる細胞表面マーカー発現のフローサイトメトリー分析により決定した。従って、第一週のTNF添加は、CD123+CD11c-pDCへの前駆細胞分化の完全な阻害を生じ、かつCD123-DC11c+骨髄系DCへの分化へ歪曲された。従って、TNF及び/又はアゴニスト性抗-TNF受容体抗体は両方とも、前駆細胞細胞上のTNF受容体を刺激するが、これらはpDCの分化をブロックし、かつ前駆細胞の骨髄系DCへの分化を再指示する。

30

#### 【0117】

本研究は、いかにしてIFN- $\gamma$ の産生及び分泌は、前駆細胞のTNF(又は、アゴニスト性抗-TNF受容体結合物質)への曝露によりブロックされ得るかに関する図16に示した限定的でない理論を提供している。このような曝露は、インターフェロンを産生し得るpDCの出現の阻害につながり、その結果インターフェロンの産生及び分泌をブロックする。

#### 【0118】

##### 実施例11: Flt3LレベルはSLEに罹患した対象の血清中で上昇される

前記実施例において説明されたように、衰えないDC誘導は、SLEにおける自己免疫応答の破綻を起動し、かつ本願明細書に記されたように、IFN- $\gamma$ 及びFlt3Lを共に標的化することにより制御され得ると考えられる。しかし本願明細書において「DC-ポエチン」と称される他のサイトカインは、*in vivo*において抗原提示細胞へ分化するために、DCを移動及び/又は活性化することができる。このDCの移動又は活性化は、多くの異なる方法で起こり得る。例えばこのようなDC-ポエチンは、プレDC細胞の成熟樹状細胞への分化を増大することができ、これは免疫原性反応を増大し続けかつ自己免疫応答を増悪することができる。別の例として、DC-ポエチンは、対象における自己免疫応答に寄与する新たな成熟DCの実際の産生を増大することができ、もしくはDC-ポエチンは成熟DCの活性を増大することができる。

40

50

## 【0119】

ある限定的でないDC - ポイエチンは、Flt3Lであり、これはヒト及びマウスのモデルにおいて、*in vivo*において骨髄系及び形質細胞系の両方のDCを大量に移動することが示されている(Maraskovskyら、*Adv. Exp. Med. Biol.* 417:33-40 (1997); *J. Exp. Med.*、184(5):1953-62 (1996); *Blood*、96(3):878-84 (2000))。更に、本発明において示されたように、CD34+造血幹細胞のFlt3Lとの培養は、形質細胞系DCのみではなく、CD11c+骨髄系DCに加え単球も生じた。

## 【0120】

SLE患者(83種血液試料)に加え健常対照(35種血液試料)の血清Flt3Lレベルを、市販のELISA(R&D社)を用いて決定した。図17に示したように、SLE患者は、健常対象から採取した血清において測定された値に比べ有意に高い血清Flt3Lレベルを有し( $p < 0.002$ )、これは血清の $< 12.5 \sim 582 \text{ pg/mL}$ の範囲であった。SLE患者からの83種の血液試料及び健常患者からの35種の血液試料(健常対照)は、市販のELISAを用いて試験した。これらの血清試料中のFlt3Lレベルの差異は、パラメトリック解析及びノンパラメトリック解析の両方を用い、統計学的に有意であった。

## 【0121】

実施例12: Flt3L血清レベルは自己免疫疾患活動性に相関する

血清Flt3Lレベルは、SLE Disease Activity Index (SLEDAI)により測定した疾患活動性と相関することが決定した。図18に示したように、そこには有意な正の相関関係があり( $p = 0.02$ )、これはFlt3Lの高血清レベルを伴う個人は、高いSLE疾患活動性も示すことを指摘している。従って血清中のFlt3Lレベルの上昇の出現は、対象における自己免疫リスク又は活動型自己免疫疾患の指標である。

## 【0122】

実施例13: Flt3Lは単球のDCへの分化を許容する

健常ドナーの末梢血単核細胞(PBMC)から単離された単球は、CD14ビーズを使用する陽性選択により単離されるか、もしくは接着により濃厚化され、その後2日間完全培養培地(10%熱-失活したウシ胎児血清を補充した、RPMI1640)において、Flt3L(100 ng/mL)及びIL-3(10 ng/mL)及び/又はIFN- $\gamma$ (1000 U/mL)と共に培養されるかのいずれかである。対照培養は、GM-CSF及びIL-4により行った。図19Aは、Flt3L/IFN- $\gamma$ (1000 u/mL)と共に培養された細胞を示している。図19Bは、GM-CSF(100 ng/mL)/IL-4(5 ng/mL)と共に培養された細胞を示している。図19Cは、IFN- $\gamma$ (1000 u/mL)/IL-3(10 ng/mL)と共に培養された細胞を示している。図19Dは、Flt3L/IFN- $\gamma$ (1000 u/mL)/IL-3(10 ng/mL)と共に培養された細胞を示している。2日培養後、サイトスピン処理した単球をギムザ染色した。その結果Flt3L及びIFN- $\gamma$ と共に培養した単球は、形態学的(図19A-19D)、表現型(CD14低、DC-SIGN+、CD40+、HLA-DR+、CD11c+)、及び機能、すなわち樹状細胞機能の特徴である同種異系のCD4+ T細胞の増殖を誘導する能力(図20)により決定されたように、DCの特徴を示す細胞へ分化された。図20において、 $10^5$ 個の精製した同種異系のCD4+ T細胞は、漸増数の抗原提示細胞と共に(横軸)、5日間培養した。T細胞増殖は、Flt3Lを補充した培地での培養後のチミジン取込み(縦軸、 $\text{cpm} \times 10^3$ )により測定した。図21は、Flt3L及びIFN- $\gamma$ の活性のブロックにより変更され得るDCサブセットの出現及び分化のいくつかの経路をまとめ概略を示している。これらの治療的標的は、1) TNFによるかもしくはFlt3Lアンタゴニストによるか又はTNF及びFlt3Lアンタゴニストの両方の組合せのいずれかによりブロックすることができる、造血前駆細胞からpDCへの分化経路であり、その最終結果は、インターフェロン産生が、インターフェロ

ンを産生することができる細胞の分化の障害を通じて障害されること、2) TNFにより促進することができる、pDC成熟経路であり、その最終結果は、pDCは非-インターフェロン産生細胞となり、その結果インターフェロンレベルが低下すること、3) 単球から樹状細胞への分化経路であり、これはインターフェロンアンタゴニストによるか又はFlt3Lアンタゴニストによるか、又はインターフェロンアンタゴニスト及びFlt3Lアンタゴニストの組合せのいずれかによりブロックすることができ、この最終結果は、さもなければアポトーシス細胞を捕獲しかつ提示することができ、かつ自己反応性B細胞及び自己反応性T細胞の分化の誘導により、自己免疫疾患を起動するような樹状細胞の分化を障害することを含む。

【0123】

実施例14：SLE血清中のFlt3Lの中和はSLE血清が誘導した単球の樹状細胞への分化を阻害する

単球は、SLE患者から得た血清と共に培養した。Flt3Lに特異的に結合するモノクローナル抗体(抗-Flt3Lモノクローナル抗体)の有効量を、飽和濃度、すなわち濃度範囲が約1~10倍モル過剰となるよう、単球細胞培養物へ、単球分化に適した培養条件下で添加した。3日インキュベーションした後、モノクローナル抗体を受け取っていない同じ単球培養物よりも、より少ない数の単球が、DCへ分化した。結果として、培養物中のFlt3L活性を中和するこのFlt3Lに対するモノクローナル抗体は、SLE-誘導した単球のDCへの分化を阻害する。

【0124】

実施例15：Flt3Lアンタゴニスト及びインターフェロンアンタゴニストの組成物の、SLE血清中で増殖した単球への添加は、単球の抗原提示DCへの分化を阻害する

対象における自己免疫疾患を治療する方法は、対象において自己-抗体を産生する自己反応性T細胞及び自己反応性B細胞の刺激を引き起す抗原提示細胞の産生を低下又は阻害するために、本発明の治療的組成物を対象へ投与することにより、ここで例証されている。

【0125】

治療的組成物は、治療される患者の血清中において、各々、Flt3L及びIFN- $\gamma$ のレベルが約1~10倍と等しいような、(a)ある量の抗-Flt3Lモノクローナル抗体及び(b)ある量の抗-IFN- $\gamma$ モノクローナル抗体により調製される。Flt3Lに対するモノクローナル抗体の調製法は公知であり、例えばこのような方法のひとつは、米国特許第5,843,423号「造血細胞のflt3-リガンドによる刺激法」の実施例6において開示されている。IFN- $\gamma$ に対するモノクローナル抗体の調製法は公知であり、例えばこの方法は、米国特許第5,919,453号に開示されている。

【0126】

血清を自己免疫疾患の対象から入手し、かつこの治療的組成物の投与を確証するために、Flt3L及びIFN- $\gamma$ の十分なレベルが血清中に存在することを確認するために試験した。

【0127】

この組成物は、該組成物中のこれらのふたつの構成要素の血清レベルがFlt3L及び/又はIFN- $\gamma$ の約1~約10倍モル過剰の範囲であることを確実にするために、注射又は静脈内送達法により、毎日投与される。対象の状態の経過観察は、APCの生成レベルを決定するために、治療期間を通じて行った。対象血清中のDCの存在は、治療を通じて経過観察した。この治療は、自己免疫障害の症状が軽減した時点で停止し、かつ2回の連続する血液分析においてFlt3L及び/もしくはIFN- $\gamma$ レベルが増加傾向を示した時点並びに/又は自己免疫障害の症状が増悪した時点で、再開した。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、リンパ球系(形質細胞系)DC及び/又はそれらの産物、例えばI型インターフェロン、並びに骨髄系DCの分化の関係を示している、SLEにおける樹状細胞サブセット間の相互作用の概略図である。骨髄系DCの分化は、抗原提示のカスケードを開始し、これはSLE病理発生に寄与する自己反応性T細胞及びB細胞の分化につな

10

20

30

40

50

がる。

【図2】図2A - 2Eは、SLE患者血清と共に培養した場合には、クラスター化され、かつ樹状細胞形態を獲得しているが、自家(AS)血清と共に培養した場合にはそうではない、正常ドナーから精製された単球を示している写真図である。単球は、AS血清(図2C)又はSLE血清(図2A - 2B)と共に培養する。図2Dは、SLE血清により誘導されたベール状(veil ed)細胞のクラスターを描いている。図2Eにおいて、SLE血清と共に24時間培養したサイトスピン処理した単球のギムザ染色が、典型的成熟DCの形態を伴う細胞を明らかにしている("SLE-DC" = SLE血清が誘導したDC)。

【図3】図3は、成熟DCの表現型を獲得するSLE血清と共に培養した単球のフローサイトメトリ分析の結果を示す図である。各グラフは、各グラフの下に列記された細胞表面マーカに対して特異的である標識抗体の検出の増大を示している。SLE血清と共に培養した単球(下側パネル)は、CD14発現をダウンレギュレーションし、HLA-DR並びに共刺激因子分子、例えばCD86、CD80、及びCD40などの発現をアップレギュレーションし、かつ成熟DCのマーカであるCD83の発現を獲得したが、自家血清(上側パネル)と共に培養されたものはそうではなかった。横軸は、イソタイプ対照(点線)及び特異的抗体(実線)に関する蛍光強度を対数スケールで表わしている。縦軸は、相対細胞頻度を表わしている。 10

【図4】図4A - 4Eは、SLE血清捕獲可溶性抗原と共に培養した単球を示すフローサイトメトリ結果を図示している。濃厚化した単球は、SLE血清と共に培養する(図4D及び4E)(SLE1及びSLE2は、2名の異なるSLE患者の血清を意味する)か、又はAS血清(図4C)と共に培養し、かつそれらのエンドサイトーシス活性は、及び4(細線)及び37(太線)で、FITC-デキストラン(FITC-DX)取込みを用いて決定した。GM-CSF及びIFN-( "GM-IFN" )と共に培養した単球(図4B)に加え、GM-CSF及びIL-4( "GM/IL4" )と共に培養したもの(図4A)(これは*in vitro* DC培養の標準である)は、同等のレベルのFITC-DX取込みを示している。AS血清と共に培養した単球は、FITC-DXを取込まない。 20

【図5】図5は、SLE血清と共に培養した単球は、同種異系のナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を誘導するが、AS血清と共に培養したものは誘導しないことを示すヒストグラムである。GM/IFN、GM/IL4、SLE1、SLE2及びAS血清と共に培養した単球を洗浄し、かつ漸増用量(1000個細胞及び5000個細胞)で、 $1 \times 10^5$ 個のナイーブCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>同種異系のTリンパ球と共に5日間培養した。T細胞増殖は、チミジン取込みにより決定した(cpm  $\times 10^3$ 、縦軸)。 30

【図6】図6は、AS血清中において培養されたSLE-DC又はDCのいずれかにより誘導されたT細胞により産生されたT細胞サイトカインのレベルの図である。サイトカイン放出は、ELISAアッセイによりアッセイし、かつIL-10及びIFN-は、縦軸にpg  $\times 10^3$  / mLで示した。

【図7】図7A、7B及び7Cは、SLE-DCによる自家アポトーシス細胞の捕獲を描く写真である。一晚ギムザ染色したサイトスピン処理した単球を、SLE血清(図7A及び7B)及びAS血清(図7C)と共に培養する。矢印は、SLE血清と一緒に培養における細胞断片の捕獲を示す。 40

【図8】図8A及び8Bは、同種異系のアポトーシス細胞の捕獲及び自家CD4<sup>+</sup>T細胞に対するそれらの抗原の提示を示す図である。図8Aは、7AADレベルの増加により示されるSLE-DCは、DNAを含むアポトーシスボディを捕獲することを示しているフローサイトメトリ結果を描いている。負荷されたDCを、自家CD4<sup>+</sup>T細胞増殖の刺激因子として使用した(チミジン取込みにより測定、縦軸)(図8B)。

【図9】図9A - 9Bは、SLE-DC活性を誘導するIFN-に対するSLE疾患活動性の関係を示す図である。図9Aは、誘導活性とSLEDAIの間の相関関係を示している。図9Bは、誘導能と血清中のIFN-レベルの相関関係を示している。各グラフ 50

上の各点は、患者から採取した血清を示している。

【図10】図10は、SLE患者から得た血清中のIFN- $\gamma$ のブロックを示す図である。抗原提示細胞は、グラフ上に示されたような、イソタイプ対照又は抗体中和するIFN- $\gamma$ を添加又は非添加のSLE血清により作成される。これらの細胞は、洗浄し、かつ精製した同種異系のCD4<sup>+</sup>T細胞( $1 \times 10^5$ )と共に、5日間、指示した用量で、刺激細胞として培養した。T細胞増殖は、チミジン取込みにより決定した(cpm $\times 10^3$ 、縦軸)。

【図11】図11は、SLE患者が、IFN- $\gamma$ の高い血清レベルを有することを示している。血清試料は、45名のSLE患者及び28名の正常患者から採取した。

【図12】図12は、SLE患者からの末梢血単核細胞(PBMC)は、*in vitro*においてウイルスの引き金に反応し、IFN- $\gamma$ を分泌することを示す図である。総PBMCは、インフルエンザウイルス( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )を伴う又は伴わない96-ウェルプレートにおいて培養した。上清を、24時間培養後収集し、かつELISAによりIFN- $\gamma$ 放出についてアッセイした。"All-"は、ウイルスを伴わない対照培養物のレベルを示す。"+"は、ウイルスを伴う培養物を示す。"ND"は、正常ドナーを示す。

【図13】図13A及び13Bは、IFN- $\gamma$ が、*in vitro*において単球上でBAFF/BlyS(TNFファミリーのB細胞活性化因子)/BlyS(Bリンパ球刺激因子)の発現及びPBMC上でBCMA(B細胞成熟化抗原)の発現を誘導することを示す図である。図13Aは、示された条件(IFN- $\gamma$  U/mL)下で、72時間培養した単球におけるBAFF発現( $\text{ng}/\text{ng}$  18SリボソームRNA)を示している。NIは、同一ドナー由来の対照の培養されていない単球を意味する。図13Bは、未培養(NI)又は示された時間の1000 U/mL IFN- $\gamma$ と共に培養されたPBMCにおける相対BCMA発現( $\text{ng}/\text{ng}$  18S)を示している。相対RNA発現は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System(ABI社)を用い、リアルタイムPCRにより評価した。参照(18SリボソームRNA)に対する標的発現(BAFF又はBCMA)の比は、正規化された発現レベルを示す。

【図14】図14A-14Cは、形質細胞系DC(pDC)によるIFN- $\gamma$ 分泌のTNF調節を示す図である。図14Aは、内在性TNFの中和が、CD123<sup>+</sup>pDCにより持続型IFN- $\gamma$ 放出を生じることを示している。縦軸は、示された条件下で生じた培養上清のIFN- $\gamma$ レベル( $\text{ng}/\text{mL}$ )を示す。図14B-14Cは、TNFのpDCへの添加が、ウイルスが誘導したIFN- $\gamma$ 放出を阻害することを示している。図14Bは、縦軸上に、培養上清へ分泌されたIFN- $\gamma$ の阻害の割合(%)を示す。図14Cは、縦軸上に、培養上清のIFN- $\gamma$ レベル( $\text{ng}/\text{mL}$ )を示す。

【図15】図15は、TNFは、骨髄系DCを選択し、形質細胞系DCの分化をブロックすることを示しているフローサイトメトリー実験の図である。この図は、CD34<sup>+</sup>造血前駆細胞からのpDC産生のTNF阻害を描いている。CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>造血前駆細胞は、Flt3L( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ )、TPO( $30 \text{ ng}/\text{mL}$ )及び培養第一週のIL-6( $25 \text{ ng}/\text{mL}$ )又はTNF  $100 \text{ ng}/\text{mL}$ のいずれかの存在下で培養した。その後、これらの細胞は洗浄し、かつ更にFlt3Lのみ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ )で3週間培養した。pDC分化は、CD11cネガティブCD123ポジティブ染色により同定される、細胞表面マーカー発現のフローサイトメトリー分析により決定した。

【図16】図16は、インターフェロンアンタゴニストとして機能する外因性TNFにより阻害され得る形質細胞系DC個体発生の経路を示す概略図である。

【図17】図17は、SLE患者の血清中の増大したレベルのFlt3L( $\text{pg}/\text{mL}$ )を示す概略図である。

【図18】図18は、SLE患者の血清レベルのFlt3LとSLEDAIにより測定した疾患活動性の相関関係を示す図である。統計学的有意性は、線形回帰及びピアソン解析により決定した。

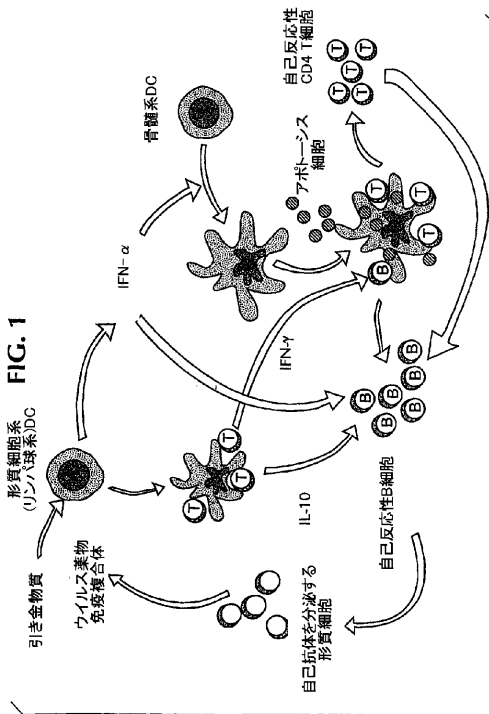
【図19】図19A-19Dは、Flt3Lを補充した培地で培養した単球の、DC形態を伴う細胞への分化を示す写真である。

【図20】図20は、Flt3L(100ng/mL)を補充した培地で培養した単球が、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞をプライミングすることができることを示す図である。

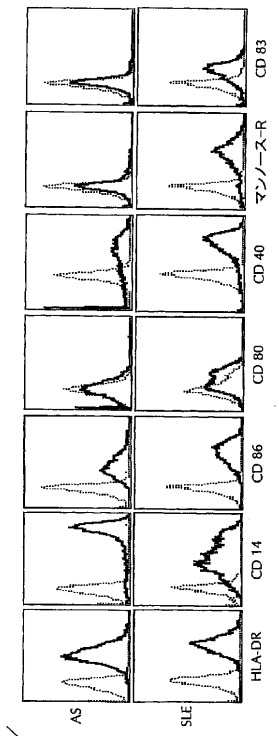
【図21】図21は、Flt3L及びIFN- $\gamma$ の活性のブロックにより変更することができるDCサブセットの発生及び分化におけるいくつかの経路を示す概略図である。

【図22】図22は、SLEにおけるサイトカインとDCの相互作用を示し、かつ本発明の治療的組成物のために意図されているサイトカイン及び/又は細胞標的を確定している図である。

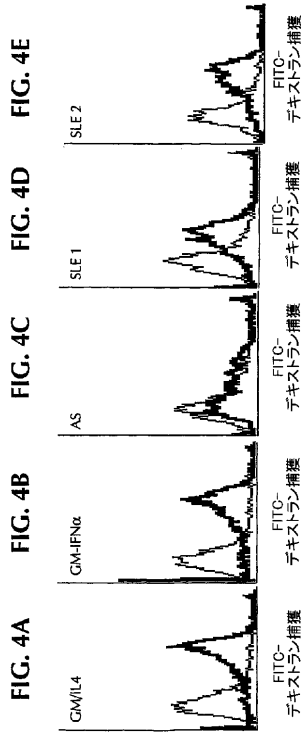
【図1】



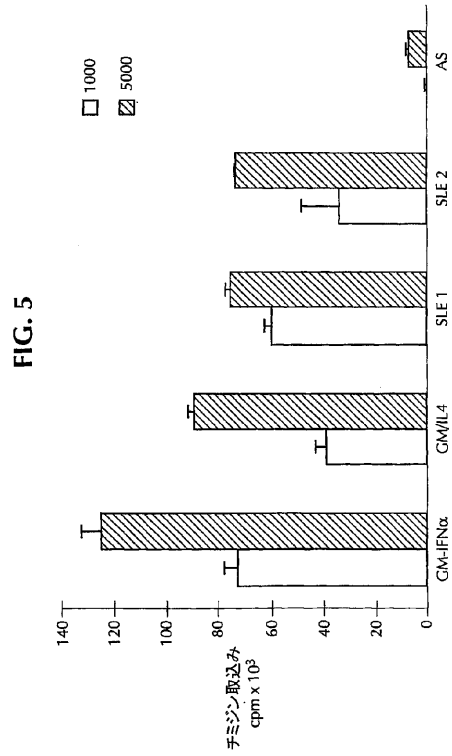
【図3】



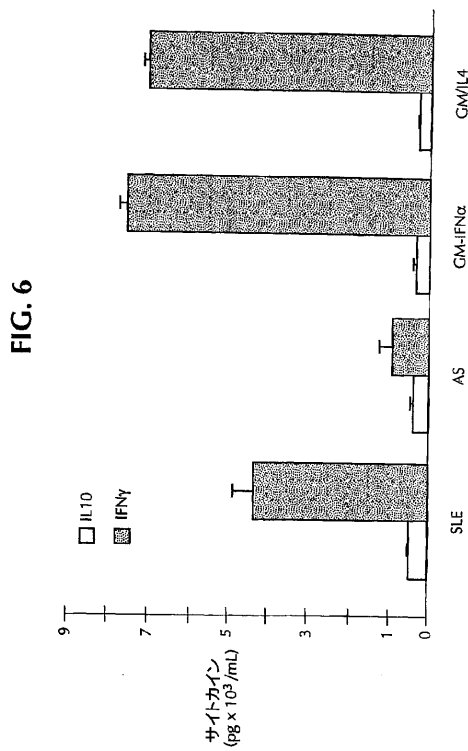
【 図 4 】



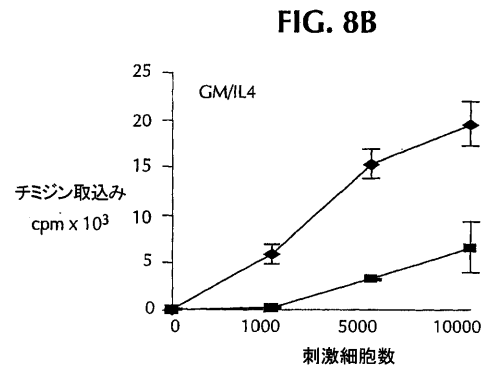
【 図 5 】



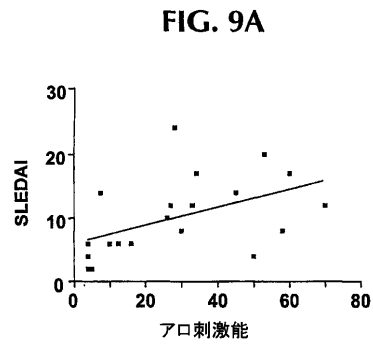
【 図 6 】



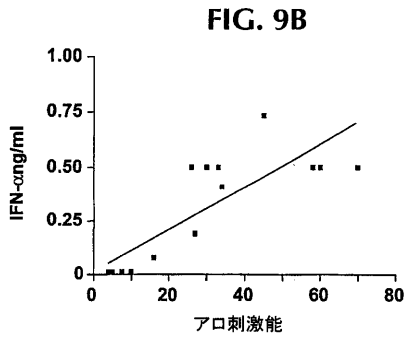
【 図 8 B 】



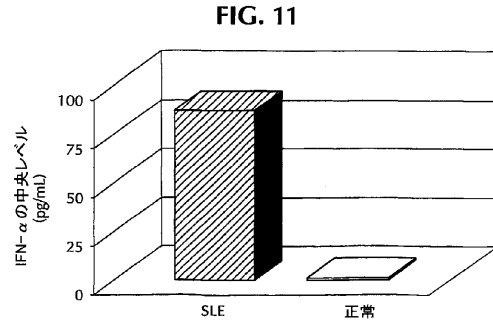
【 図 9 A 】



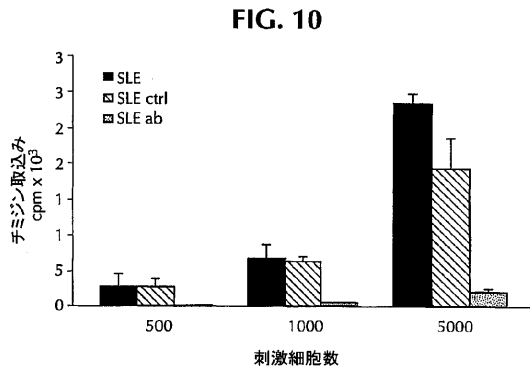
【 図 9 B 】



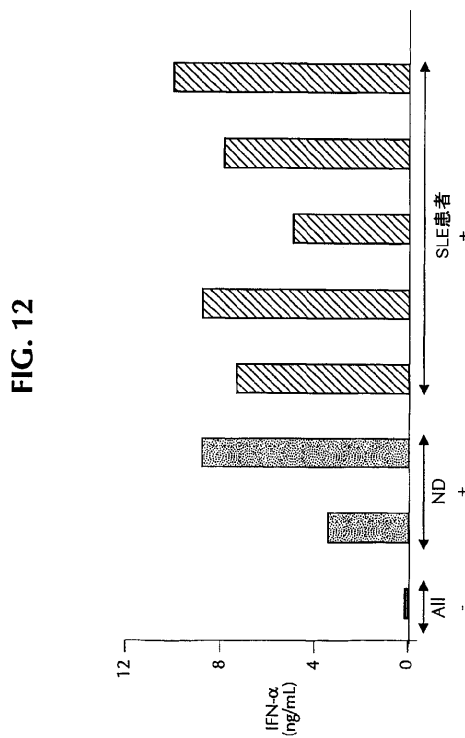
【 図 1 1 】



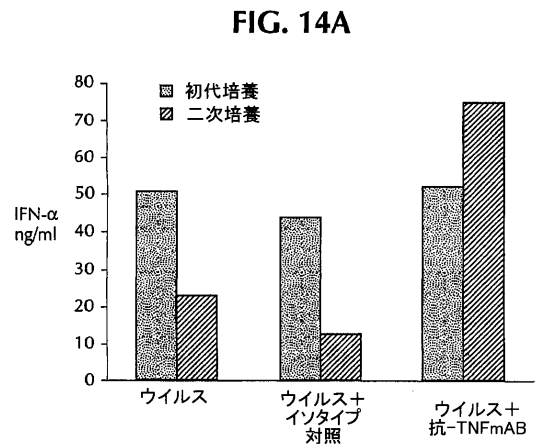
【 図 1 0 】



【 図 1 2 】

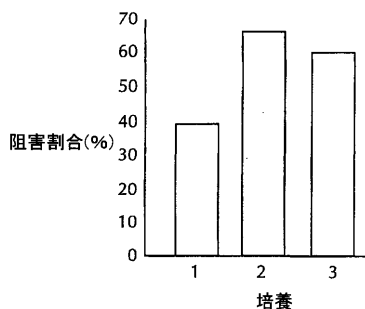


【 図 1 4 A 】



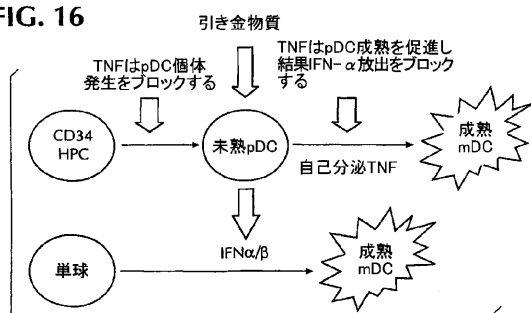
【 図 1 4 B 】

FIG. 14B



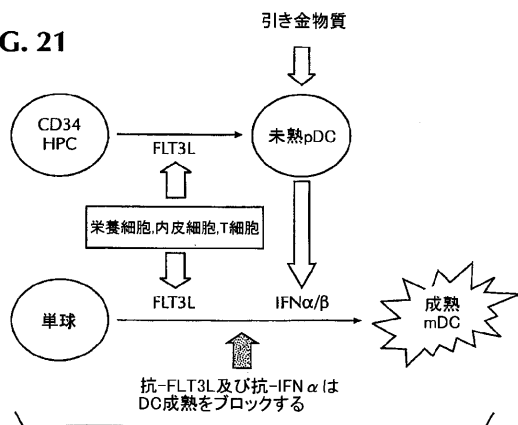
【 図 1 6 】

FIG. 16



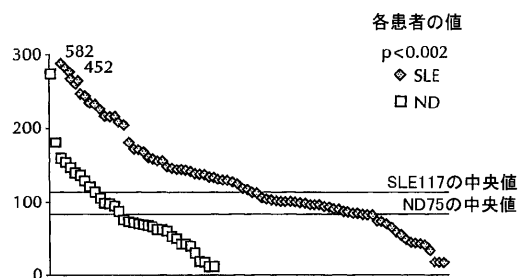
【 図 2 1 】

FIG. 21



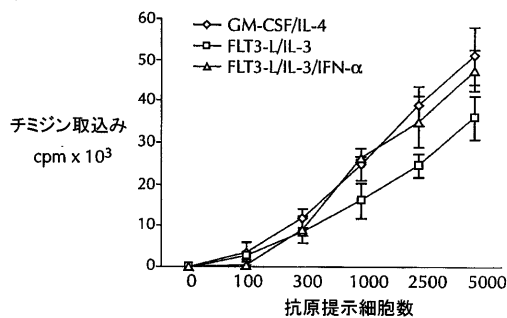
【 図 1 7 】

FIG. 17



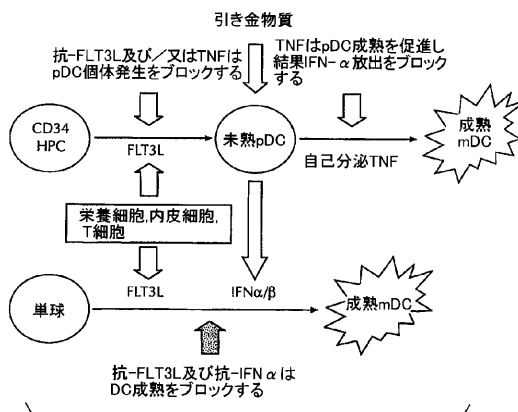
【 図 2 0 】

FIG. 20



【 図 2 2 】

FIG. 22



【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  
6 September 2002 (06.09.2002)

PCT

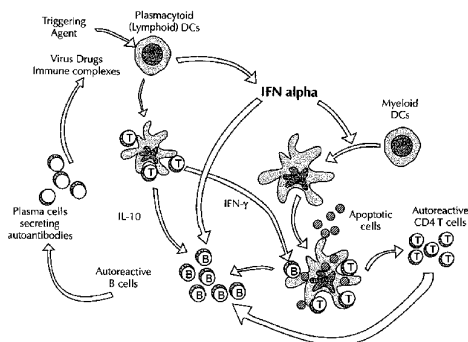
(10) International Publication Number  
WO 02/067760 A2

- (51) International Patent Classification: **A61B**
- (21) International Application Number: PCT/US02/00343
- (22) International Filing Date: 8 January 2002 (08.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/260,541 9 January 2001 (09.01.2001) US
- (71) Applicant: **BAYLOR RESEARCH INSTITUTE**  
[US/US], 3434 Live Oak, Dallas, TX 75204 (US).
- (72) Inventors: **BANCHEREAU, Jacques, E.**; 6730 Northaven, Dallas, TX 75230 (US). **PALUCKA, Anna, Karolina**; 101 North Brookside Drive, Apt #106, Dallas, TX 75214 (US). **BLANCO, Patrick**; 232 Chemin de Suzon Apt #1781, F-33400 Talence (FR).
- (74) Agents: **WILSON, M., Lisa et al.**; Hale and Dorr LLP, 300 Park Avenue, New York, NY 10022 (US).
- (81) Designated States (*national*): AF, AG, AI, 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, 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, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

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

(54) Title: METHODS FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES IN A SUBJECT AND IN VITRO DIAGNOSTIC ASSAYS



(57) Abstract: The invention provides a method for treating an autoimmune disease in a subject by administering an interferon antagonist and a ligand (IL3L) antagonist. The invention also provides compositions containing one or more interferon antagonists, and one or more IL3L antagonists, an *in vitro* assay for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease, and kits for use, *inter alia*, with the assay.

WO 02/067760 A2

WO 02/067760

PCT/US02/00343

**APPLICATION**

for

**UNITED STATES LETTERS PATENT**

5

on

**METHODS FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES IN A SUBJECT AND  
*IN VITRO* DIAGNOSTIC ASSAYS**

by

Jacques Banchereau

10

Anna Karolina Palucka

Patrick Blanco

HALE and DORR LLP  
15 300 Park Avenue  
New York, New York 10022  
Tel: 212-937-7200  
Fax: 212-937-7300

WO 02/067760

PCT/US02/00343

**METHODS FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES IN A SUBJECT AND  
IN VITRO DIAGNOSTIC ASSAYS**

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

5 This application claims the priority to U.S. Provisional Patent Application Serial  
No. 60/260,541, filed January 9, 2001, the entire contents of which are hereby  
incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

10 This invention relates to treating autoimmune diseases and diagnostic assays  
related to autoimmune diseases.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Autoimmune diseases are devastating and crippling diseases, and occur when a  
15 patient's own immune system turns against itself by attacking the patient's own body or  
tissues. One example of an autoimmune disease is systemic lupus erythematosus (SLE),  
which is characterized by multi-organ involvement and immunological abnormalities that  
include the presence of autoreactive T cells and B cells. Autoantibodies against the  
nucleosome appear to be a hallmark characteristic of SLE and suggest that inappropriate  
20 handling of dying (apoptotic) cells may represent a key pathogenic event in the  
development of SLE. SLE results from the dysregulation of both the humoral and the  
cellular limbs of the immune system indicating that the initial alteration may be at the level  
of cells that enroll and control the immune effectors, namely the dendritic cells (DCs).

Dendritic cells (DCs) are specialized antigen presenting cells which elicit T cell  
25 mediated immune responses (Steinman, R. M. (1991) *Ann. Rev. Immunology*, Vol. 9, pp.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

271-296 and Banchereau et al. (2000) *Ann. Rev. Immunol.* 18:767). DCs induce and sustain immune responses and have been shown to capture dying cells and present their antigens to CD4<sup>+</sup> T cells, which then activate other immune effectors including B cells. DC progenitors in the bone marrow give rise to circulating precursors that home to the tissue where they reside as immature cells with high phagocytic capacity. Upon tissue damage, DCs capture antigen (Ag) and subsequently migrate to the lymphoid organs where they select rare Ag-specific T cells, thereby initiating immune responses. DCs present antigen to CD4<sup>+</sup> T cells which in turn regulate the immune effectors including antigen-specific ones such as CD8<sup>+</sup> T cells and B cells as well as nonspecific ones such as macrophages, eosinophils and NK cells. DCs can also directly activate B cells and induce their differentiation into plasma cells *in vitro*.

Three subsets of DC precursors ("DCpre") circulate in the blood: (1) CD14<sup>+</sup> monocytes, (2) CD11c<sup>+</sup> myeloid DCpre and (3) CD11c<sup>-</sup> plasmacytoid (lymphoid) DCpre. Monocytes can differentiate into cells displaying features of immature DCs or macrophages (MΦ). The immature DCs become mature DCs upon treatment with CD40L and/or LPS or when cultured with a combination of cytokines including TNF, IL-1 and IL-6. CD11c<sup>+</sup> myeloid DCpre give rise to interstitial DC (intDC), Langerhans cells (LC) or MΦ depending on local cytokine environment.

CD11c<sup>-</sup>IL-3Rα<sup>+</sup> lymphoid DC precursors are a major source of interferon-alpha (IFN-α). High levels of IFN-α are often found in lupus serum (Kim et al., *Clin. Exp. Immunol.* 70:562-269, 1987). Furthermore, IFN-α treatment often induces the appearance of autoantibodies and eventually the development of autoimmune diseases including SLE (Ronblum et al., *J. Intern. Med.* 227:207-210, 1990). Anti-IFN-α antibody has been reported in SLE patients (Suit et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 1:133-135).

Plasmacytoid DCs have been reported to produce IFN-α which in turn affects differentiation of myeloid DCs and growth and activation of B cells. Spits et al. (*J Exp Med* 192(12):1775-84, 2000) and Blom et al. (*J Exp Med* 192(12):1785-96, 2000) report that CD11c<sup>-</sup> plasmacytoid DCs are of lymphoid origin in humans. Siegal et al. (*Science* 284:1835, 1999) report that lymphoid DCs (plasmacytoid DCs) produce large amounts of

WO 02/067760

PCT/US02/00343

IFN- $\alpha$  when exposed to inactivated herpes simplex virus. Cella et al., (*Nature Medicine* 5(8):868-70, 1999) report that lymphoid DCs (plasmacytoid DCs) produce large amounts of IFN- $\alpha$  in response to influenza virus as well as CD40 ligation.

The autoantibodies (autoAbs) in SLE can be characterized in three major categories: (1) anti-nuclear and anti-double stranded DNA antibodies; (2) autoAbs directed against the surface of endothelial cells and platelets (anti-phospholipids/ $\beta$ 2 glycoprotein); and (3) autoAbs directed against molecules on the surface of hematopoietic cells (see, e.g., review of Cabral and Alarcon-Segovia (1998) *Curr. Opin. Rheumatol.* 10:409). In addition to the direct damage caused by cellular and/or tissue antigen-antibody interactions, many of the disease's symptoms result from indirect damage through the deposition of immune complexes on tissues. This mechanism has been shown to be responsible for some forms of SLE nephritis, arthritis, and vasculitis (Lahita, R.G. 1999. *Systemic Lupus Erythematosus. Academic Press*; Kammer, G.M., and G.C. Tsokos. 1999. *Lupus, Humana Press*). Defects in immune complex clearance, including include Fc receptor ("FcR") and C3b-receptor ("C3b-R") dysfunction, as well as genetic defects in complement proteins and C-reactive protein (all of which are essential players in the removal of anti-DNA/nucleosome complexes) can contribute to the development of SLE (Lahita, R.G. 1999. *Academic Press*; Kammer, G.M., and G.C. Tsokos. 1999 *Humana Press*). B cells play a major role in SLE pathogenesis, as they are responsible for the production of autoantibodies and hypergammaglobulinemia.

Hooks et al. (*N. Engl. J. Med.* 301:5, 1979) describe the presence of circulating immune interferon in patients with autoimmune disease including SLE. Kim et al. disclosed that the levels of IFN- $\alpha$  correlated with the clinical activity index. Preble et al. (*J. Exp. Med.* 157:214, 1983) and von Wussow et al. (*Arthritis Rheum.* 32:914, 1989) disclose that high levels of 2-5A synthetase and MX protein, two proteins specifically induced by IFN- $\alpha$ , are found in the mononuclear cells of both serum IFN-positive and serum IFN-negative SLE patients. Vallin et al. (*J. Immunol.* 163:6306 1999) disclose that the IFN- $\alpha$  inducing factor acts on leukocytes with features of immature DCs. Batteux et

WO 02/067760

PCT/US02/00343

al. (*Eur. Cytokine Netw.* 10:509, 1999) disclose that the induction of IFN- $\alpha$  production by SLE serum is dependent on Fc $\gamma$ RII (CD32).

One complication of IFN- $\alpha$  therapy is the induction of autoimmune disorders (in about 4% to 19% of the cases), the most common being thyroid dysfunction (Ehrenstein et al., *Arthritis Rheum.* 36:279, 1993; Okanou et al., *J. Hepatol.* 25:283, 1996; Ronnblom et al., *Ann. Intern. Med.* 115:178, 1991; Kalkner et al., *Qjm.* 91:393, 1998). Indeed, Schilling et al. (*Cancer* 68:1536, 1991) disclose that IFN- $\alpha$  therapy can also induce SLE with a frequency of 0.15% to 0.7%. Every case is associated with the induction or marked increase in titers of antinuclear antibodies and anti-DNA antibodies.

Type I diabetes is another autoimmune disease in which IFN- $\alpha$  plays an important etiopathogenic role. Foulis et al. (*Lancet* 2:1423, 1987) and Huang et al. (*Diabetes* 44:658, 1995) disclose a strong correlation between the expression of IFN- $\alpha$  by the pancreatic islets and the development of autoimmune diabetes in humans. Furthermore, Chakrabarti et al. (*J. Immunol.* 157:522, 1996) disclose that expression of IFN- $\alpha$  by B cells within pancreas Langerhans islets causes diabetes in a transgenic mouse model. Additionally, Fabris et al. (*Lancet* 340:548, 1992) and Guerci et al. (*Lancet* 343:1167, 1994) disclose that IFN- $\alpha$  therapy can induce Type I diabetes in humans.

FMS-like tyrosine kinase 3 ("Flt3") is a member of the type III tyrosine kinase receptor family which also includes KIT (c-kit RTK), FMS (M-CSF RTK) and platelet-derived growth factor (PDGF) receptor. Similar to the ligands for the KIT and FMS receptors, stem cell factor and M-CSF, respectively, the Flt3 receptor is activated by a cognate molecule, termed Flt3-ligand ("Flt3L"). Flt3 is a variant form of a tyrosine kinase receptor that is related to the c-fms and c-kit receptors (Rosnet et al. *Oncogene*, 6,1641-1650, 1991). Flt3L is a hematopoietic cytokine that has been shown to facilitate the expansion of DCs and the generation of antitumor immune responses (see U.S. Patent No. 5,554,512, "Ligands for Flt3 Receptors"). Flt3L has been found to regulate the growth and differentiation of progenitor and stem cells (Blazar et al. (2001) *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 7:197-207 and see U.S. Patent No. 5,843,423). Flt3L treatment

WO 02/067760

PCT/US02/00343

of monocyte cell cultures was shown to result in a marked expansion in the absolute number of myeloid- and lymphoid-related DCs and a reduction in the proportion of donor splenic T cells (Blazar et al).

5 All of the disclosures of the publications which are referred to within this application (including U.S. Patents, published PCT applications, scientific references, books, manuals, etc.) are hereby incorporated by reference in their entireties into this application.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

10 The present invention is directed to methods for treating an autoimmune disease in a subject which comprises administering to the subject an effective amount of (a) at least one interferon antagonist that reduces activity of a type I interferon, and (b) at least one Flt3 ligand (Flt3L) antagonist that reduces activity of Flt3L, to thereby reduce differentiation of monocytes into dendritic cells in the subject and treat the autoimmune disease.

15 The invention is also directed to a therapeutic composition to inhibit monocyte differentiation into dendritic cells capable of antigen presentation which comprises (a) at least one interferon antagonist that reduces activity of a type I interferon, and (b) at least one Flt3 ligand (Flt3L) antagonist that reduces activity of Flt3L. Such compositions constitute therapeutic compositions for the treatment of autoimmune diseases including, but not limited to, SLE and other IFN- $\alpha$  mediated autoimmune diseases including but not limited to diabetes, arthritis, AIDS, psoriasis and thyroiditis.

20 The invention is also directed to an *in vitro* assay for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease which comprises (a) obtaining a serum sample from the subject; (b) quantifying IFN- $\alpha$  and Flt3 ligand (Flt3L) in the serum sample; and (c) comparing the quantity of IFN- $\alpha$  and Flt3L with the quantities of IFN- $\alpha$  and Flt3L in serum from subjects with an autoimmune disease, thereby determining the subject's risk for developing an autoimmune disease.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

The invention is also directed to a kit for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease or for monitoring the status of an autoimmune disease in a subject which comprises an amount of a composition which specifically binds to Flt3L and to IFN- $\alpha$  effective to detect Flt3L and IFN- $\alpha$  in a biological sample of a subject. The kit contains a composition comprising (a) a monoclonal antibody that binds Flt3L and (b) a monoclonal antibody that binds IFN- $\alpha$ . Further, the composition is detectable. The kit can include one or more reagents for detecting amounts of the composition bound to one or more samples.

#### 10 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

**Figure 1** is a schematic representation of interactions between dendritic cell subsets in SLE which shows the relationship between lymphoid (plasmacytoid) DCs and/or their products, *e.g.*, type I interferons, and the differentiation of myeloid DCs. The differentiation of myeloid DCs initiate the cascade of antigen presentation that leads to differentiation of autoreactive T cells and B cells contributing to SLE pathogenesis.

**Figures 2A-2E** are photographic illustrations showing purified monocytes from normal donors which cluster and acquire dendritic cell morphology when cultured with serum from patients with SLE but not when cultured with autologous (AS) serum. Monocytes are cultured with AS serum (Fig. 2C) or SLE serum (Figs. 2A-2B). Fig. 2D depicts a cluster of veiled cells induced by SLE sera. In Fig. 2E, Giemsa staining of cytospun monocytes cultured for 24 hours with SLE serum reveals cells with morphology typical of mature DCs. ("SLE-DCs" = SLE serum induced DCs).

**Figure 3** is a graphic illustration showing results from a flow cytometry analysis of monocytes cultured with SLE serum which acquire the phenotype of mature DCs. Each graph shows an increase in detection of a labeled antibody which is specific for the cell surface markers listed below each graph. Monocytes cultured with SLE serum (lower panel) but not those cultured with autologous serum (upper panel) down-regulate CD14 expression, up-regulate the expression of HLA-DR and co-stimulatory molecules such as CD86, CD80 and CD40 and acquire expression of CD83, a marker of mature DCs.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

Horizontal axis represents fluorescence intensity in a log scale for an isotype control (dotted lines) and a specific antibody (solid lines). Vertical axis represents relative cell frequency.

5 **Figures 4A-4E** are graphic illustrations of flow cytometry results showing that monocytes cultured with SLE serum capture soluble antigens. Enriched monocytes were cultured with SLE serum (Figs. 4D and 4E) (SLE 1 and SLE2 denote serum from two different patients with SLE) or with AS serum (Fig. 4C) and their endocytic activity was determined using FITC-dextran (FITC-DX) uptake at 4°C (thin-line) and 37°C (thick-line). Monocytes cultured with GM-CSF and IFN- $\alpha$  ("GM-IFN $\alpha$ ") (Fig. 4B) as well as those cultured with GM-CSF and IL-4 ("GM/IL4") (Fig. 4A) (which is a standard for *in vitro* DC cultures) exhibit comparable levels of FITC-DX uptake. Monocytes cultured with AS serum do not take up FITC-DX.

15 **Figure 5** is a histogram showing that monocytes cultured with SLE serum, but not those cultured with AS serum induce proliferation of allogeneic naïve CD4+ T cells. Monocytes cultured with GM/IFN $\alpha$ , GM/IL4, SLE 1, SLE 2, and AS serum were washed and cultured at graded doses (1000 cells and 5000 cells) with  $1 \times 10^5$  naïve CD4+CD45RA+ allogeneic T lymphocytes for 5 days. T cell proliferation was determined by thymidine incorporation (cpm  $\times 10^3$ , vertical axis).

20 **Figure 6** is a graphic illustration of the level of T cell cytokines produced by T cells induced by either SLE-DCs or DCs cultured in AS serum. Cytokine release was assayed by an ELISA assay and IL-10 and IFN- $\gamma$  are shown in pg  $\times 10^3$ /mL on the vertical axis.

25 **Figures 7A, 7B and 7C** are photographic illustrations which depict capture of autologous apoptotic cells by SLE-DCs. Giemsa stained cytopins of overnight monocyte cultures with SLE serum (Figs. 7A and 7B) and AS serum (Fig. 7C). Arrows indicate the capture of cell fragments in cultures with SLE serum.

**Figures 8A and 8B** are graphic illustrations showing the capture of allogeneic apoptotic cells and presentation of their antigens to autologous CD4+ T cells. Figure 8A depicts flow cytometry results showing SLE-DCs capture DNA containing apoptotic

WO 02/067760

PCT/US02/00343

bodies as indicated by an increase in 7AAD levels. Loaded DCs are used as stimulators of autologous CD4+ T cell proliferation (measured by thymidine incorporation, vertical axis) (Figure 8B).

5 **Figures 9A-9B** are graphic illustrations showing the relation of SLE disease activity to the IFN- $\alpha$  inducing activity of SLE-DCs. Fig. 9A shows the correlation between inducing activity and SLEDAI. Fig. 9B shows the correlation between inducing capacity and IFN- $\alpha$  levels in serum. Each point on each graph represents serum taken from a patient.

10 **Figure 10** is a graphic illustration showing the blocking of IFN- $\alpha$  in serum obtained from SLE patients. Antigen presenting cells are generated with SLE serum without or with adding an isotype control or antibody neutralizing IFN- $\alpha$  as indicated on the graph. The cells are washed and cultured as stimulatory cells, at indicated doses, with purified allogeneic CD4+ T cells ( $1 \times 10^5$ ) for 5 days. T cell proliferation was determined by thymidine incorporation (cpm  $\times 10^3$ , vertical axis).

15 **Figure 11** shows that patients with SLE have high serum levels of IFN- $\alpha$ . Serum samples were taken from 45 patients with SLE and 28 normal patients.

**Figure 12** is a graphic illustration showing that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with SLE secrete IFN- $\alpha$  *in vitro* in response to viral triggering. Total PBMCs were cultured in 96-well plates with or without influenza virus (10  $\mu$ g/mL). 20 Supernatants were harvested after culturing for 24 hours and assayed for IFN- $\alpha$  release by ELISA. "All -" represents levels in control cultures without virus. "+" denotes cultures with virus. "ND" denotes normal donor.

**Figures 13A and 13B** is a graphic illustration showing that IFN- $\alpha$  induces *in vitro* BAFF/Blys (B cell activating factor of the TNF family) /Blys (B lymphocyte stimulator) expression on monocytes and BCMA (B cell maturation antigen) expression on PBMCs. 25 Figure 13A shows relative BAFF expression (ng/ng 18S ribosomal RNA) in monocytes cultured for 72 hours under indicated conditions (IFN- $\alpha$  U/mL). NI denotes control uncultured monocytes from the same donor. Figure 13B shows relative BCMA expression (ng/ng18S) in PBMC, uncultured (NI) or cultured with 1000 U/mL IFN- $\alpha$  for

WO 02/067760

PCT/US02/00343

indicated number of hours. Relative RNA expression was assessed by real time PCR using the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (ABI). The ratio of the target expression (BAFF or BCMA) against a reference (18S ribosomal RNA) gives normalized expression levels.

5 **Figures 14A-14C** are graphic illustrations showing TNF regulation of IFN- $\alpha$  secretion by plasmacytoid DCs (pDCs). Fig. 14A shows that neutralization of endogenous TNF results in sustained IFN- $\alpha$  release by CD123+ pDC. The vertical axis shows levels of IFN- $\alpha$  in ng/mL of culture supernatant generated under the indicated conditions. Figs. 14B-14C show that adding TNF to pDCs inhibits virus-induced IFN- $\alpha$  release. Fig. 14B shows on the vertical axis the percentage of inhibition of IFN- $\alpha$  secreted into the culture supernatant. Fig. 14C shows on the vertical axis levels of IFN- $\alpha$  in ng/mL of culture supernatant.

15 **Figure 15** is a graphic illustration of a flow cytometry experiment which shows that TNF blocks plasmacytoid DCs' differentiation in favor of myeloid DCs. The figure depicts TNF inhibition of the generation of pDC from CD34+ hematopoietic progenitor cells. CD34+CD45RA- hematopoietic progenitors were cultured in the presence of Flt3L (100 ng/mL), TPO (30 ng/mL) and either IL-6 (25 ng/mL) or TNF 100 ng/mL in the first week of culture. Thereafter, the cells were washed and cultured for additional 3 weeks with Flt3L only (100 ng/mL). pDC differentiation was determined by flow cytometry analysis of cell surface marker expression with pDC being identified by CD11c negative CD123 positive staining.

20 **Figure 16** is a schematic illustration showing pathways in plasmacytoid DC ontogeny that can be inhibited by exogenous TNF which functions as an interferon antagonist.

25 **Figure 17** is a graphic illustration showing increased levels of Flt3L (in pg/mL) in serum of patients with SLE.

**Figure 18** is a graphic illustration showing correlation of serum levels of Flt3L in SLE patients and disease activity as measured by the SLEDAI. Statistical significance was determined by linear regression and Pearson analysis.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

Figures 19A-19D are photographic illustrations that show monocytes cultured with media supplemented with Flt3L differentiate into cells with DC morphology.

Figure 20 is a graphic illustration showing that monocytes cultured with media supplemented with Flt3L (100 ng/mL) are able to prime naive CD4+ T cells.

5 Figure 21 is a schematic illustration which shows several pathways in the development and differentiation of subsets of DC which can be altered by blocking the activity of Flt3L and IFN- $\alpha$ .

Figure 22 is a schematic illustration showing the interplay between cytokines and DCs in SLE and identifying cytokines and/or cellular targets which are intended for  
10 therapeutic compositions of the invention herein.

#### DETAILED DESCRIPTION

The present invention is directed to methods for treating an autoimmune disease in a subject which comprises administering to the subject an effective amount of (a) one or  
15 more interferon antagonists that reduce activity of a type I interferon, and (b) one or more Flt3 ligand (Flt3L) antagonists that reduce activity of a Flt3L, to thereby reduce differentiation of monocytes into dendritic cells in the subject and treat the autoimmune disease. Additionally, the present invention provides a composition useful for inhibiting monocyte differentiation into dendritic cells (DCs) which are capable of antigen  
20 presentation, which comprises: (a) at least one interferon antagonist that reduces activity of interferon, and (b) at least one Flt3 ligand antagonist that reduces activity of a Flt3 ligand. For example, one component of the composition can be an antagonist that reduces or inhibits the binding or interaction between the type I interferon (*e.g.*, IFN- $\alpha$ ) and its receptor. This composition also includes an antagonist that reduces or inhibits binding or  
25 interaction between a Flt3L and its receptor.

As used herein, "SLE-DCs" refers to dendritic cells which are obtained by culturing monocytes with serum obtained from a patient with SLE ("SLE serum").

As used herein, an "interferon antagonist" encompasses an antibody, an antigen-binding fragment of an antibody, a polypeptide, a peptidomimetic, a nucleic acid encoding

WO 02/067760

PCT/US02/00343

a polypeptide, an organic molecule or any combination thereof which is capable of reducing the activity or function of a type I interferon in a cell within a subject or a cell *in vitro*.

As used herein, "polypeptide" encompasses peptides and proteins of any length, without regard to function.

As used herein, a "type I interferon" includes IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , and IFN- $\tau$ . Oritani et al. ((2001) *Cytokine Growth Factor Rev.* 12(4):337-48) provide a description of other examples of a type I interferon.

Interferon antagonists interfere with the interaction between a type I interferon (such as IFN- $\alpha$ ) and its receptor which results in a reduction in the generation of antigen-presenting cells by reducing differentiation of monocytes into DCs which become antigen presenting cells. The reduction in generation of antigen-presenting cells can be achieved by one or more different mechanisms, but the exact mechanism by which this occurs is not crucial to the invention. For example, TNF and/or agonistic anti-TNF receptor antibodies can reduce type I interferon secretion by accelerating the differentiation of pDCs into type I IFN non-producing cells.

There are numerous assays which can be performed to identify whether a compound is an interferon antagonist useful in the present invention. These assays are known to those of skill in the art. One assay is a dendritic cell differentiation assay where a compound to be tested is added to a culture of monocytes under conditions suitable for monocyte differentiation into DCs. The conditions include the addition of either SLE serum or interferon so that the monocytes are induced to differentiate into DCs. Thus, if the compound causes an inhibition of interferon and/or SLE serum driven monocyte differentiation into DCs as compared to differentiation of monocytes in cultures which do not have the compound added, then the compound is an interferon antagonist.

Another assay to identify compounds which are interferon antagonists is a binding assay wherein inhibition of binding of labeled interferon to a receptor on a cell is measured. If a compound is able to inhibit the binding of interferon to its receptor or to cells having interferon receptors, the compound is an interferon antagonist.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

In addition, an assay to determine whether a compound is an interferon antagonist is an assay to measure inhibition of interferon produced by cells in response to triggers that normally induce interferon production and/or secretion, for instance viruses. Thus, if in the presence of the compound and the trigger (*e.g.*, a virus), a cell which would normally produce interferon does not produce interferon, or produces interferon at a reduced level, then the compound is an interferon inhibitor.

Another assay to determine whether a compound is an interferon antagonist is a tumor cell survival assay. Interferon has anti-tumor activity by direct growth inhibition and/or induction of tumor cell death. The examples of such tumor cells susceptible to interferon include melanoma cell lines. This tumor cell survival assay measures the survival of otherwise susceptible melanoma cells which are cultured in the presence of interferon and an interferon antagonist. Therefore, if the tumor cells are surviving in the culture containing the compound to be tested as compared to an identical culture which does not have the compound to be tested, then the compound is an interferon antagonist.

Another assay to identify whether a compound is an interferon antagonist is an assay to quantify expression (at the protein and/or RNA level) of interferon-inducible proteins including MXA protein, and interferon regulatory factors, as examples. Therefore, a compound to be tested is added to the culture and protein and RNA levels of the specified interferon-inducible proteins are measured. If the addition of the compound decreases the levels of the protein and/or mRNA expression, then the compound is an interferon antagonist.

Another assay to determine whether a compound is an interferon antagonist is an *in vitro* protective assay. Normally, adding interferon to a cell culture protects the cells from cytolytic activity of a virus which is introduced into the cell culture, thus increasing cell survival in the culture. Thus, adding an interferon antagonist abolishes protection and cell survival will not be increased. Therefore, if inhibition of antiviral activity of interferon is measured, then the compound is an interferon antagonist. The inhibition measurement is based on the determination of death of cells susceptible to virus.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

An example of an interferon antagonist includes, but is not limited to, a monoclonal antibody that specifically binds IFN- $\alpha$ . Another example of an interferon antagonist is a soluble IFN- $\alpha$  receptor. The soluble receptor is useful to bind to circulating type I interferon and thus prohibit it from binding with its natural receptor and causing progression of monocyte differentiation into DCs. In another embodiment of the invention, the interferon antagonist can be an organic molecule which binds to the IFN- $\alpha$  receptor, but does not cause down-stream effects of such binding, *i.e.*, a non-functional receptor ligand mimic. Such an organic molecule can specifically bind to the IFN- $\alpha$  binding pocket of the receptor without causing receptor activation, so as to displace any IFN- $\alpha$  which could so bind and thereby render the receptor ineffectual. In a further embodiment of the invention, the interferon antagonist includes a peptide which comprises the complementarity determining region (CDR) of the monoclonal antibody which specifically binds interferon or Flt3L or both. In yet another embodiment of the invention, the interferon antagonist is a fusion peptide.

Interferon antagonists useful in the present invention can reduce the activity of the type I interferon by many different mechanisms and the invention is not dependent on any particular mechanism. An interferon antagonist of the present invention includes but is not limited to, a modified IFN- $\alpha$  which has reduced or no activity *in vivo*. With regard to disrupting the generation of antigen-presenting cells by type I interferon, the interferon antagonist can affect the activity of type I interferon at many different junctions in the signaling pathway of interferon. As some examples, the antagonist can block activity of the interferon protein itself; block activity of the type I interferon receptor; inhibit binding of the interferon to the receptor; block type I interferon signaling and /or transduction pathways; block type I interferon release from cells which normally produce it; block generation of cells which normally make type I interferon; and block secretion of type I interferon from cells which normally secrete it. The inhibition of the differentiation or generation of cells which normally produce interferon can result from administration of TNF and/or agonistic anti-TNF receptor(s) antibodies and/or molecules providing TNF-like signaling to cells. These types of compounds are examples of interferon antagonists

WO 02/067760

PCT/US02/00343

provided by the present invention. In addition, inactivation of type I interferon co-factors needed for the differentiation and growth of antigen presenting cells is another possible mechanism of an interferon antagonist of the invention.

As used herein, an "Flt3L antagonist" encompasses an antibody, an antigen-binding  
5 fragment of an antibody, a polypeptide, a peptidomimetic, a nucleic acid encoding a polypeptide, an organic molecule or any combination thereof which is capable of reducing the activity of Flt3L. For example, the Flt3L antagonist can interfere with the interaction  
10 between Flt3 ligand ("Flt3L") and its receptor so as to inhibit differentiation of progenitor cells into dendritic cells. The reduction in generation of antigen-presenting cells can be achieved by one or more different mechanisms. For example, Flt3L can contribute to  
15 unabated DC activation that can in turn drive auto-antigen presentation in SLE, therefore, Flt3L is a target for therapeutic intervention. Flt3L likely plays a role in the development or the sustainment of the SLE autoimmune disease making an antagonist of Flt3L function useful for the treatment of autoimmune diseases.

In one embodiment, an assay to identify a therapeutically effective amount of an  
15 interferon antagonist is to determine the amount of interferon antagonist necessary to reduce interferon receptor binding *in vitro* to serum taken from a subject to be treated. In this example, the concentration necessary to reduce binding by 50% *in vitro* will be effective therapeutically *in vivo*. A similar assay for Flt3L can be carried out to determine  
20 the effective amount of Flt3L antagonist for a particular subject or patient.

There are numerous assays which can be performed to identify whether a  
compound is a Flt3L antagonist useful in the present invention. One assay is a dendritic  
cell differentiation assay where a compound to be tested is added to a culture of  
monocytes under conditions suitable for monocyte differentiation into DCs. The  
25 conditions include the addition of Flt3L to the monocyte culture so that the monocytes are induced to differentiate into DCs. Thus, if the compound causes at least a 50% inhibition of monocyte differentiation into DC as compared to cultures of monocytes which do not have the compound added, the compound is a Flt3L antagonist.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

Another assay to determine whether a compound is a Flt3L antagonist is an assay to determine inhibition of binding of labeled Flt3L to its receptor. In this assay, a detectable label is attached to Flt3L and the labeled Flt3L is permitted to bind to its receptor in the presence and in the absence of the compound. If the presence of the compound causes a decrease in the binding of the Flt3L to the receptor, then the compound is a Flt3L antagonist.

Another assay useful to determine whether a compound is a Flt3L antagonist is an *in vitro* proliferation assay. Human hematopoietic progenitor cells are cultured with Flt3L in order to induce their differentiation and/or proliferation. The compound to be tested is added to some cultures and others are compound-free. A comparison is made between the cultures with the compound and those without to determine the amount of proliferation and differentiation. If there is inhibition of Flt3L driven proliferation and/or differentiation of human hematopoietic progenitor cells, then the compound is a Flt3L antagonist.

Another assay useful to determine whether a compound is a Flt3L antagonist is an *in vitro* proliferation assay. Human factor-dependent B cell lines are cultured with and without the compound added to the culture. An example of such a cell line is a cell line engineered to express Flt3. If the cultures with the compound added show at least 50% inhibition of Flt3L driven proliferation of human factor-dependent B cell lines, then the compound is a Flt3L antagonist.

Another assay useful to determine whether a compound to be tested is a Flt3L antagonist is an *in vivo* assay. Mice are administered Flt3L and their hematopoietic cells, including dendritic cells are expanded *in vivo*. These mice are either administered the compound to be tested, or not and the levels of hematopoietic cells in the mice are measured. Thus, inhibition of Flt3L-mediated expansion of hematopoietic cells, including dendritic cells, *in vivo* in mice indicates that the compound is a Flt3L antagonist.

One example of a Flt3L antagonist is a monoclonal antibody which specifically binds Flt3L. Another example of a Flt3L antagonist is a soluble Flt3L receptor. The soluble receptor is useful to bind circulating Flt3L to prohibit Flt3L from binding with its

WO 02/067760

PCT/US02/00343

natural receptor and causing progression of monocyte differentiation into DCs. In one embodiment of the invention, the Flt3L antagonist can be an organic molecule which binds to the Flt3L receptor, but does not cause down-stream effects of such binding, *i.e.*, a receptor ligand mimic. Such an organic molecule can specifically bind to the Flt3L binding pocket of the receptor to displace any Flt3L which would otherwise so bind. The Flt3L antagonist of the invention also includes a polypeptide which comprises the complementarity determining region (CDR) of the above-mentioned monoclonal antibody, or fusion peptides therewith.

The term "human monoclonal antibody" (HuMAb) as used herein, means HuMAbs obtainable from human B cells (*e.g.*, whether the antibody is prepared by culturing the immortalized and/or activated human B cells or recombinantly from human B cell cDNAs encoding such a HuMAb and whether or not the antibody is bound to a molecule which can alter its biological activity, *e.g.*, a receptor or ligand, an enzyme, a toxin, a carrier, etc.) and antibodies that are made by recombining the variable portions of a HuMAb of the present invention of one isotype (*e.g.*, an IgG<sub>4</sub>) with the constant region of a human antibody of another isotype (*e.g.*, a human IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA, IgD, IgM or IgE). Recombinant methods for making these HuMAbs are known in the art (see U.S. Patent No. 5,959,085).

The use of a combination of an interferon antagonist and a Flt3L antagonist may achieve the advantage of using much less of each molecule to reduce generation of DCs. Such synergy is advantageous in allowing reduction of the therapeutically effective amounts of each antagonist in the methods and compositions of the invention.

In one embodiment of the invention, either the interferon antagonist or the Flt3L antagonist or both can be a polypeptide. The polypeptide may be a peptidomimetic, a synthetic polypeptide, a derivative of a natural polypeptide, a modified polypeptide, a labeled polypeptide, or a polypeptide which includes non-natural peptides. The polypeptide may be wholly or partially a non-natural polypeptide which has chirality not found in nature, *i.e.* D- amino acids or L-amino acids. The use of a non-natural linkage in

WO 02/067760

PCT/US02/00343

such a peptide can prolong half-life and protect the peptide from degradation by naturally occurring enzymes.

In another embodiment of the invention, the autoimmune disease is selected from the group consisting of: acquired immune deficiency syndrome (AIDS), ankylosing  
5 spondylitis, arthritis, aplastic anemia, Behcet's disease, diabetes, graft-versus-host disease, Graves' disease, hemolytic anemia, hypogammaglobulinemia, hyper IgE syndrome, idiopathic thrombocytopenia purpura (ITP), multiple sclerosis (MS), Myasthenia gravis, psoriasis, lupus and any combination thereof.

The diabetes can be, but is not limited to, diabetes mellitus, Type I diabetes, Type  
10 II diabetes, juvenile on-set diabetes or any combination thereof. The arthritis can be, but is not limited to, rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis or any combination thereof. The lupus can be systemic lupus erythematosus (SLE) or drug-induced lupus.

In one embodiment of the invention, the subject is a mammal. The mammal can be  
15 a human or a primate. The subject can be a human patient, or an animal which exhibits symptoms of a human immune disease and is therefore an animal model of a human disease, such as a murine transgenic disease model or a primate disease model or a model of human disease established in a SCID mouse reconstituted with the human immune system. The mammal can be, but is not limited to, a human, a primate, a rat, a dog, a cat,  
20 a swine. In another aspect of the invention, the subject is a murine subject, a bovine subject, a primate subject, an equine subject, a swine subject, or a canine subject. The subject, in another aspect of the invention, suffers from SLE.

In one embodiment of the invention, the interferon antagonist comprises an anti-  
IFN- $\alpha$  antibody or an antigen-binding fragment thereof. In another embodiment of the  
25 invention, the interferon antagonist is TNF. In yet another embodiment of the invention, the Flt3L antagonist comprises an anti-Flt3L antibody or an antigen-binding fragment thereof.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

In an embodiment of the invention, the antibody which can be an element of the composition comprises a monoclonal antibody, a chimeric antibody, an anti-idiotypic antibody, a humanized antibody, a primatized antibody and any combination thereof.

5 In another embodiment of the invention, the interferon antagonist and the Flt3L antagonist are part of one molecule. In one embodiment of the invention, the effective amount of the interferon antagonist is in a range of about 1 to about 10 fold molar excess over the amount of interferon in the subject's serum. In another aspect of the invention, the effective amount of the Flt3L antagonist is in a range of about 1 to about 10 fold molar excess over the amount of Flt3L in the subject's serum.

10 The method of the invention includes administering a composition to a subject wherein the composition inhibits induction by IFN- $\alpha$  of myeloid DC maturation into DCs which have antigen-presenting activities. The administration of the composition can be intravenous, via a subdural injection, oral, topical, cutaneous, subcutaneous, parenteral or by aerosol. The administration of the composition of the invention to a subject  
15 encompasses intralesional, intraperitoneal, intramuscular or intravenous injection; infusion; liposome-mediated delivery; or topical, nasal, oral, ocular or otic delivery. In a further embodiment, the administration includes intrabronchial administration, anal or intrathecal administration. The composition of the invention may be delivered hourly, daily, weekly, monthly, yearly (e.g. in a time release form) or as a one time delivery. The delivery may  
20 be continuous delivery for a period of time, e.g. intravenous delivery. The preferred route and timing of delivery can be readily determined by those of skill in the art.

In one embodiment of the invention, the interferon antagonist reduces binding of a type I interferon with its receptor. In another embodiment, the interferon antagonist interferes with signal transduction following interferon binding to receptor on cells in the  
25 subject. In another embodiment, the interferon antagonist reduces production of interferon by cells in the subject. In another embodiment, the interferon antagonist reduces interferon secretion by cells in the subject. In yet another embodiment, the interferon antagonist reduces bioavailability of interferon in the subject. In a further embodiment, the interferon antagonist is TNF.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

In another embodiment of the invention, the composition further comprises a carrier. In another embodiment of the invention, the carrier comprises an aqueous carrier, a liposome, or a lipid carrier.

The compounds which comprise the composition of the present invention can be a  
5 peptidomimetic compound(s) which can be at least partially unnatural. The  
peptidomimetic compound can be a small molecule mimic of a portion of the amino acid  
sequence of Flt3L or of Flt3L receptor or a type I interferon or a type I interferon  
receptor. The compound can have increased stability, efficacy, potency and bioavailability  
by virtue of the mimic. Further, the compound can have decreased toxicity. The  
10 peptidomimetic compound can have enhanced mucosal intestinal permeability. The  
compound may be synthetically prepared. The compound of the present invention can  
include L-,D- or unnatural amino acids,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -disubstituted amino acids, N-alkyl amino  
acids, lactic acid (an isoelectronic analog of alanine). The peptide backbone of the  
compound may have at least one bond replaced with PSI-[CH=CH]. The compound can  
15 further include trifluorotyrosine, p-Cl-phenylalanine, p-Br-phenylalanine, poly-L-  
propargylglycine, poly-D,L-allyl glycine, or poly-L-allyl glycine.

One embodiment of the present invention is a peptidomimetic compound wherein  
the compound has a bond, a peptide backbone or an amino acid component replaced with  
a suitable mimic. Examples of unnatural amino acids which may be suitable amino acid  
20 mimics include  $\beta$ -alanine, L- $\alpha$ -amino butyric acid, L- $\gamma$ -amino butyric acid, L- $\alpha$ -amino  
isobutyric acid, L- $\epsilon$ -amino caproic acid, 7-amino heptanoic acid, L-aspartic acid, L-  
glutamic acid, cysteine (acetamidomethyl), N- $\epsilon$ -Boc-N- $\alpha$ -CBZ-L-lysine, N- $\epsilon$ -Boc-N- $\alpha$ -  
Fmoc-L-lysine, L-methionine sulfone, L-norleucine, L-norvaline, N- $\alpha$ -Boc-N- $\delta$ -CBZ-L-  
ornithine, N- $\delta$ -Boc-N- $\alpha$ -CBZ-L-ornithine, Boc-p-nitro-L-phenylalanine, Boc-  
25 hydroxyproline, Boc-L-thioprolin.

In one embodiment, the compound is a peptide wherein the free amino groups  
have been inactivated by derivitization. For example, the peptide can be an aryl derivative,  
an alkyl derivative or an anhydride derivative. The peptide can be acetylated. The peptide  
is derivitized so as to neutralize its net charge.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

One embodiment of the composition of the invention is a ribozyme which is capable of cleaving mRNA coding for either the type I interferon or the Flt3L. See Cech, et al., U.S. Patent No. 4,987,071; Altman et al., U.S. Patent No. 5, 168,053; Haseloff et al, U.S. Patent No. 5,254,678 published European application No. Hampel et al., EP 5 360,257. The therapeutic composition of the invention, in one embodiment, is a ribozyme that is recombinant and that has been engineered to cleave type I interferon mRNA and/or Flt3L mRNA. In another aspect of this invention, the composition can comprise a recombinant nucleic acid which is a ribozyme capable of cleaving both the mRNA coding for IFN- $\alpha$  and the mRNA coding for Flt3L. In addition, the invention provides for an antisense nucleic acid which is capable of binding to the mRNA coding for either the Flt3L or the type I interferon and inhibiting translation of such mRNA into protein.

The invention provides that dendritic cells are key factors in the etiopathogenesis of SLE and other autoimmune diseases, and as such, dendritic cells and/or their products are key targets for therapy of SLE and other autoimmune diseases. As an example of an autoimmune disease, SLE is a disease wherein lymphoid DCs release large amounts of cytokines, including IFN- $\alpha$ , which subsequently activate myeloid DCs to trigger and sustain autoimmune reactions. This interaction between DC subsets provides an explanation for the (1) profound B cell alterations with a broad spectrum of autoantibodies, mainly against nuclear antigens, (2) autoreactive CD4+ T cells and (3) high levels of type I interferon found in serum from patients with SLE. These observations support the significant involvement of dendritic cells in the etiopathogenesis of SLE and other autoimmune diseases.

Figure 1 illustrates the consequences of uncontrolled IFN- $\alpha$  release and its role in SLE pathogenesis as disclosed herein. The SLE initiating injury is an element that triggers plasmacytoid (lymphoid) DCs to secrete IFN- $\alpha$  in an uncontrolled manner. The triggering elements include viruses, bacteria, fungi and their products such as CpG DNA as well as drugs. The uncontrolled IFN- $\alpha$  release originates with a permanent plasmacytoid (lymphoid) DC activator such as chronic viral infection, or with an immune complex that is not cleared properly from the circulation, *e.g.* through FeR polymorphism or absence of

WO 02/067760

PCT/US02/00343

complement components). The plasmacytoid DCs differentiate into mature DCs able to present the triggering element to T cells. The released IFN- $\alpha$  (possibly with other cytokines) induces the activation of circulating precursors of myeloid DCs, including monocytes, that capture apoptotic cells present in increased amounts in SLE blood. The myeloid DCs process the apoptotic cells and present their antigens to autoreactive T cells and/or to B cells. The autoreactive T cells, together with the DCs loaded with apoptotic cells now further activate the autoreactive B cells. These differentiate into plasma cells with help from the DCs. IFN- $\alpha$  also directly contributes to the generation of autoreactive B cells because it can turn on a partial germinal center phenotype (induction of CD38) characteristic of the circulating blood B cells in SLE.

Using monocytes, the most abundant precursors of myeloid DCs, from blood of healthy donors, a method has been developed for inducing immunogenic DC using serum from patients with SLE. Such DCs are active antigen presenting cells that can capture apoptotic cells and present their antigens to autologous CD4+ T cells, thus driving their activation and proliferation. Such sequence of events explain the pathogenic events in SLE. Formation of such DCs can be prevented by blocking type I interferon in the lupus serum and that it can be reproduced by culturing DC precursors with type I interferon. The products of plasmacytoid (lymphoid) DCs induce differentiation of myeloid DCs, thus supporting antigen presentation, and, consequently driving the pathogenic process.

In one embodiment of the invention, the therapeutic composition of the invention includes two elements (1) a Flt3L antagonist and (2) an interferon antagonist. In another embodiment of the invention, these elements can be fused together into one compound or molecule such as a fusion protein which comprises an antagonistic or competitive peptide against each Flt3L and IFN- $\alpha$  or another type I interferon. That is, the fusion peptide can include a portion which is a peptide that is a competitive inhibitor of the activity of Flt3L and a peptide that is a competitive inhibitor of the activity of IFN- $\alpha$ . In another aspect of the invention, the composition can include monoclonal antibodies against each Flt3L and IFN- $\alpha$ , antigen-binding fragments of each antibody (such as a CDR fragment), or a fusion protein which comprises active (antigen-binding) fragments of the antibodies. In another

WO 02/067760

PCT/US02/00343

aspect of the invention, the composition can be comprised of a small organic molecule which is capable of interfering with the interaction between the Flt3L and its receptor and a which is capable of interfering with the activity of IFN- $\alpha$ . In one aspect of the invention, the composition can include the complementarity determining regions (CDRs) of

5 monoclonal antibodies which specifically bind to Flt3L and IFN- $\alpha$ .

Polypeptides useful as antagonists of a type I interferon such as IFN- $\alpha$  or Flt3L can be polypeptides which are derived from the binding site of the respective receptor. In addition, non-functional IFN- $\alpha$  or Flt3L (polypeptides which compete for receptor binding, but which do not trigger a response in the receptor-bearing cell) can be

10 synthesized. One example of such a non-functional peptide is a peptide with full capacity to bind to the receptor, but without any capacity to activate the receptor bearing cell. There can be substitutions or additions or deletions to the normally occurring amino acid sequence of the polypeptides. Conservative amino acid substitutions can include: valine substituted for alanine; lysine for arginine; glutamine for asparagine; glutamate for

15 aspartate; serine for cysteine; asparagine for glutamine, aspartate for glutamate; proline for glycine; arginine for histidine; leucine for isoleucine; arginine for lysine, leucine for methionine, leucine for phenylalanine; glycine for proline, threonine for serine; serine for threonine; tyrosine for tryptophan; phenylalanine for tyrosine and leucine for valine.

The invention provides a novel method for treating autoimmune disease,

20 comprising blocking the ability of type I interferon to promote the generation of antigen-presenting cells. Further, the invention also provides an *in vitro* diagnostic assay for assessing a patient's relative risk of developing an autoimmune disease and/or monitoring a patient's disease progress. The invention provides for use of (a) an interferon antagonist that reduces activity of a type I interferon (such as reducing the binding between a type I

25 interferon and its receptor), and (b) a Flt3 ligand (Flt3L) antagonist that reduces activity of Flt3L (such as reducing the binding between a Flt3L and its receptor) in the preparation of a composition useful for treating an autoimmune disease in a subject.

In one embodiment of the invention, the at least one interferon antagonist and the at least one Flt3L antagonist are administered at separate times to the subject. In another

WO 02/067760

PCT/US02/00343

embodiment, they are administered simultaneously. For example, one antagonist can be administered in the morning and one in the evening. The timing or frequency of administration of the antagonists do not have to be equivalent.

As shown herein, type I interferon or type I interferon-containing serum is a  
5 necessary factor for the generation of antigen presenting cells, including but not limited to DCs. Such antigen presenting cells are shown in the present invention to drive proliferation of autologous CD4+ T cells by presenting antigens from captured apoptotic cells. In the present invention, this process of differentiation, antigen capture and antigen  
10 presentation are reduced by blocking the activity of type I interferon. This method of treatment can be used to treat autoimmune diseases by inhibiting disease progression (therapeutic application) as well as disease development in patients with an appropriate genetic background and high risk of disease development (preventive application).

Blocking of type I interferon protein and /or Flt3L includes but is not limited to using antibody (antibodies) that neutralize their ability to generate antigen-presenting cells.  
15 Blocking of type I interferon receptor or Flt3L receptor includes but is not limited to using antibodies, peptides or chemicals specifically interrupting the interaction between the ligand and its receptor(s) that leads to the generation of antigen-presenting cells. Methods for delivering the antagonists which are inhibitory (*i.e.*, the composition of the present invention) useful in the invention include but are not limited to proteins and vectors  
20 encoding the proteins.

In one embodiment of the invention, nucleic acids encoding peptides which block function of a type I interferon and/or a Flt3L are administered to a subject. For example, virus based vectors (an example of a gene transfer vectors) can be used for delivery of these nucleic acids into the subject so that translation of the peptides occurs *in vivo*. The  
25 gene transfer vector may be any construct which is able to replicate within a host cell and includes, but is not limited to, plasmids, DNA viruses, retroviruses, as well as isolated nucleotide molecules. Retrovirus or adenovirus based vectors can be used, for example. Adenoviruses have attracted increasing attention as expression vectors, especially for human gene therapy (Berkner, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:39-66 (1992)). Such

WO 02/067760

PCT/US02/00343

vectors contain all or a part of a viral genome, such as long term repeats ("LTRs"), promoters (e.g., CMV promoters, SV40 promoter, RSV promoter), enhancers, and so forth. In any case, the vector may comprise elements of more than one virus. Examples of adenoviruses which can be employed in the present invention are well-known in the art and include more than 40 different human adenoviruses, e.g., Ad12 (subgenus A), Ad3 and Ad7 (Subgenus B), Ad2 and Ad5 (Subgenus C), Ad8 (Subgenus D), Ad4 (Subgenus E), Ad40 (Subgenus F) (Wigand et al, In: Adenovirus DNA, Doerfler, Ed., Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 408-441 (1986)). Methods for producing adenovirus vectors are well-known in the art (Berkner et al, *Nucleic Acids Res.*, 11:6003-6020 (1983); van Doren et al, *Mol. Cell. Biol.*, 4:1653-1656 (1984); Ghosh-Choudhury et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147:964-973 (1987); McGrory et al, *Virology*, 163:614-617 (1988); and Gluzman et al, In: Eukaryotic Viral Vectors, Ed. Gluzman, Y. pages 187-192, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). The resulting vectors are introduced (e.g., by transfection or by transformation, or by infection, or by injection, etc.) into a host cell, which may be *in vivo* in the subject or *in vitro*. Liposome-mediated transfer of the gene transfer vector may also be carried out in the present invention.

Other examples of virus vectors that may be used for gene transfer into cells to carry out the present method of treating an autoimmune disease in a subject include, but are not limited to, retroviruses such as Moloney murine leukemia virus (MoMuLV); papovaviruses such as JC, SV40, polyoma, adenoviruses; Epstein-Barr Virus (EBV); papilloma viruses, e.g. bovine papilloma virus type I (BPV); vaccinia and poliovirus; lentiviral vectors, and other human and animal virus.

Blocking of type I interferon and FLT3L signaling and/or transduction pathways useful in the invention includes, but is not limited to, using chemical agents specifically targeting relevant signaling and/or transduction pathways.

Blocking of type I interferon release and/or production useful in the present invention includes, but is not limited to, (1) blocking type I interferon synthesis by cells using specific chemical agents; (2) targeting the cells producing type I interferon so as to reduce their ability to produce type I interferon, and (3) targeting the receptors necessary

WO 02/067760

PCT/US02/00343

to signal type I interferon production and / or release by cells so as to reduce or inhibit that production or release. In one aspect of the invention, these cells are plasmacytoid dendritic cells. In another aspect of the invention, the cells producing type I interferon which are targeted by the composition of the present invention include, but are not limited to, fibroblasts, endothelial cells and plasmacytoid dendritic cells at various stages of differentiation (e.g., bone marrow progenitors and blood precursors). Targeting a cell by a composition to reduce its function as set out above includes but is not limited to delivery of chemical agents specifically blocking differentiation of plasmacytoid dendritic cells from hematopoietic progenitors wherever such differentiation could take place.

Targeting a receptor needed to signal type I interferon production and/or release by a composition of the invention includes, but is not limited to, using a composition to block the function of mannose receptor and/or CD32 on cells.

In one aspect, the invention provides for an *in vitro* diagnostic assay which is useful for monitoring the status of an autoimmune disease in a subject or for identifying whether a subject is at risk for developing an autoimmune disease. The diagnostic assay includes the steps of (1) obtaining an amount of serum from the subject to be tested; (2) determining the level of Flt3L and the level of IFN- $\alpha$  in the subject's serum sample using any known method (e.g., using an ELISA with antibodies specific for Flt3L and for IFN- $\alpha$ ); (3) comparing the level of Flt3L and the level of IFN- $\alpha$  measured in the subject's serum with the level of each factor determined to exist in a serum sample taken from an age-matched and gender-matched normal, healthy subject; (4) identifying whether the levels measured from the subject to be tested are higher or lower than those of the healthy subject thereby monitoring the status of the autoimmune disease in the subject or assessing the risk of the subject for developing an autoimmune disease.

The invention is also directed to an *in vitro* assay for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease which comprises (a) obtaining a serum sample from the subject; (b) quantifying IFN- $\alpha$  and Flt3 ligand (Flt3L) in the serum sample; and (c) comparing the quantity of IFN- $\alpha$  and Flt3L measured in step (b) with the quantities of IFN- $\alpha$  and Flt3L measured in serum taken from a healthy subject and serum taken from a

WO 02/067760

PCT/US02/00343

subject with an autoimmune disease, thereby determining the subject's risk for developing an autoimmune disease. A high risk of developing an autoimmune disease is indicated by quantities in step (b) *supra* which are within a 30% range of the quantities measured for the subject with an autoimmune disease. This risk increases when quantities are 20%. In  
5 another aspect of the invention, the subjects can be age-matched.

The invention is also directed to a kit for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease or for monitoring the status of an autoimmune disease in a subject which comprises a composition which specifically binds to Flt3L and to IFN- $\alpha$  in a biological sample from a subject, and wherein the composition is detectable. The  
10 detectable marker includes but is not limited to a fluorescent marker, a radioactive marker, an enzymatic marker, a colorimetric marker, a chemiluminescent marker or any combination thereof.

In one embodiment of the invention, the biological sample is a blood sample or a serum sample. In another embodiment of the invention, the composition comprises a  
15 mixture of (a) a monoclonal antibody that binds Flt3L and (b) a monoclonal antibody that binds IFN- $\alpha$ . In a further aspect of the invention, the kit further comprises one or more reagents for detecting and comparing amounts of the composition bound to one or more samples. In another embodiment of the invention, the kit further comprises components for correlating the quantity of composition bound to the biological sample to a relative risk  
20 of developing an autoimmune disease or a relative status of an autoimmune disease. In another embodiment of the invention, the composition is labeled with a detectable marker. The detectable marker can be, but is not limited to, a fluorescent marker, a radioactive marker, an enzymatic marker, a colorimetric marker, a chemiluminescent marker and any combination thereof. The kit can also include components for standardization or  
25 normalization among samples to insure that the diagnostic assays are comparing relatively equivalent numbers of cells or volumes of serum.

The invention provides for an *in vitro* assay for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease which comprises: (a) obtaining a serum sample from the subject; (b) quantifying IFN- $\alpha$  and Flt3 ligand (Flt3L) in the serum sample; and (c)

WO 02/067760

PCT/US02/00343

comparing the quantity of IFN- $\alpha$  and Flt3L with the quantities of IFN- $\alpha$  and Flt3L in serum from subjects with an autoimmune disease, thereby determining the subject's risk for developing an autoimmune disease.

In addition, the invention also provides for an *in vitro* assay for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease which comprises: (a) obtaining a serum sample from the subject; (b) admixing the serum with monocytes *in vitro* under conditions suitable for monocyte differentiation; (c) measuring the ability of the subject's serum to induce differentiation of monocytes into dendritic cells which are capable of presenting antigen; and (d) comparing the ability measured in step (c) with (i) the ability of serum taken from a healthy subject and with (ii) the ability of serum taken from a subject suffering from an autoimmune disease, thereby determining the subject's risk for developing an autoimmune disease.

In another aspect, the present invention is an *in vitro* diagnostic assay by which a patient's risk of developing autoimmune disease can be determined and monitored. This diagnostic assay measures the ability of patient's serum to induce monocyte differentiation into dendritic cells *in vitro* in order to assess the risk that patient has for developing an autoimmune disease. In this regard, if the patient's serum induces differentiation of monocytes to dendritic cells more effectively than the known normal standard (which can be determined by using serum from several age-matched, gender-matched, healthy individuals), the assay is predictive of a disease flare in patients with autoimmune disease and /or indicative of the necessity for detailed diagnostic evaluation whether the patient is at risk of developing an autoimmune disease. In addition, the diagnostic assay is useful to monitor a patient's disease condition, if the patient has already been diagnosed with an autoimmune disease, the patient can utilize the diagnostic assay of the present invention at home, or at other convenient locations, in order to monitor the progress or improvement of the autoimmune disease and adjust his/her treatment regimen accordingly.

The effective amount of the composition will depend upon the actual composition which is used. The actual effective amount is based upon the size of the compound, the biodegradability of the compound, the bioactivity of the compound and the bioavailability

WO 02/067760

PCT/US02/00343

of the compound. If the compound does not degrade quickly, is bioavailable and highly active, a smaller amount is required to be effective. The effective amount can be determined by one of skill in the art; it will also be dependent upon the form of the compound, the size of the compound and the bioactivity of the compound. One of skill in the art could routinely perform empirical activity tests for a compound to determine the bioactivity in bioassays and thus determine the effective amount.

This invention provides for pharmaceutical compositions including therapeutically effective amounts of polypeptide compositions and compounds, together with suitable diluents, preservatives, solubilizers, emulsifiers, adjuvants and/or carriers. Such compositions may be liquids or lyophilized or otherwise dried formulations and include diluents of various buffer content (e.g., Tris-HCl, acetate, phosphate), pH and ionic strength, additives such as albumin or gelatin to prevent adsorption to surfaces, detergents (e.g., TWEEN™ 20, TWEEN™ 80, Pluronic F68, bile acid salts), solubilizing agents (e.g., glycerol, polyethylene glycerol), anti-oxidants (e.g., ascorbic acid, sodium metabisulfite), preservatives (e.g., Thimerosal, benzyl alcohol, parabens), bulking substances or tonicity modifiers (e.g., lactose, mannitol), covalent attachment of polymers such as polyethylene glycol to the compound, complexation with metal ions, or incorporation of the compound into or onto particulate preparations of polymeric compounds such as polylactic acid, polyglycolic acid, hydrogels, etc. or onto liposomes, micro emulsions, micelles, unilamellar or multi lamellar vesicles, erythrocyte ghosts, or spheroplasts. Such compositions will influence the physical state, solubility, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the compound or composition. The choice of compositions will depend on the physical and chemical properties of the composition.

Controlled or sustained release compositions include formulation in lipophilic depots (e.g., fatty acids, waxes, oils).

Also comprehended by the invention are particulate compositions coated with polymers (e.g., poloxamers or poloxamines) and the therapeutic composition coupled to antibodies directed against tissue-specific receptors, ligands or antigens or coupled to

WO 02/067760

PCT/US02/00343

ligands of tissue-specific receptors or any other tissue-or cell-targeting peptide. Other embodiments of the therapeutic compositions of the invention incorporate particulate forms protective coatings, protease inhibitors or permeation enhancers for various routes of administration, including parenteral, pulmonary, nasal and oral.

5 When administered, compounds are often cleared rapidly from the circulation and may therefore elicit relatively short-lived pharmacological activity. Consequently, frequent injections of relatively large doses of bioactive compounds may be required to sustain therapeutic efficacy. Compounds modified by the covalent attachment of water-soluble polymers such as polyethylene glycol (PEG), copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol, carboxymethyl cellulose, dextran, polyvinyl alcohol, 10 polyvinylpyrrolidone or polyproline are known to exhibit substantially longer half-lives in blood following intravenous injection than do the corresponding unmodified compounds. Such modifications may also increase the compound's solubility in aqueous solution, eliminate aggregation, enhance the physical and chemical stability of the compound, and 15 greatly reduce the immunogenicity and reactivity of the compound. As a result, the desired *in vivo* biological activity may be achieved by the administration of such polymer-compound adducts less frequently or in lower doses than with the unmodified compound.

Attachment of polyethylene glycol (PEG) to compounds is particularly useful because PEG has very low toxicity in mammals (Carpenter et al., 1971). For example, a 20 PEG adduct of adenosine deaminase was approved in the United States for use in humans for the treatment of severe combined immunodeficiency syndrome. A second advantage afforded by the conjugation of PEG is that of effectively reducing the immunogenicity and antigenicity of heterologous compounds. For example, a PEG adduct of a human peptide might be useful for the treatment of disease in other mammalian species without the risk of 25 triggering a severe immune response. The polypeptide or composition of the present invention may be delivered in a microencapsulation device so as to reduce or prevent an host immune response against the polypeptide or against cells which may produce the polypeptide. The polypeptide or composition of the present invention may also be delivered microencapsulated in a membrane, such as a liposome.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

As an example, polymers such as PEG may be conveniently attached to one or more reactive amino acid residues in a peptide of the therapeutic composition such as the alpha-amino group of the amino terminal amino acid, the epsilon amino groups of lysine side chains, the sulfhydryl groups of cysteine side chains, the carboxyl groups of aspartyl and glutamyl side chains, the alpha-carboxyl group of the carboxy-terminal amino acid, tyrosine side chains, or to activated derivatives of glycosyl chains attached to certain asparagine, serine or threonine residues.

Numerous activated forms of PEG suitable for direct reaction with proteins have been described. Useful PEG reagents for reaction with protein amino groups include active esters of carboxylic acid or carbonate derivatives, particularly those in which the leaving groups are N-hydroxysuccinimide, p-nitrophenol, imidazole or 1-hydroxy-2-nitrobenzene-4-sulfonate. PEG derivatives containing maleimido or haloacetyl groups are useful reagents for the modification of protein free sulfhydryl groups. Likewise, PEG reagents containing amino hydrazine or hydrazide groups are useful for reaction with aldehydes generated by periodate oxidation of carbohydrate groups in proteins.

In one preferred embodiment the pharmaceutical carrier may be a liquid and the pharmaceutical composition would be in the form of a solution. In another equally preferred embodiment, the pharmaceutically acceptable carrier is a solid and the composition is in the form of a powder or tablet. In a further embodiment, the pharmaceutical carrier is a gel and the composition is in the form of a suppository or cream. In a further embodiment the active ingredient may be formulated as a part of a pharmaceutically acceptable transdermal patch.

A solid carrier can include one or more substances which may also act as flavoring agents, lubricants, solubilizers, suspending agents, fillers, glidants, compression aids, binders or tablet-disintegrating agents; it can also be an encapsulating material. In powders, the carrier is a finely divided solid which is in admixture with the finely divided active ingredient. In tablets, the active ingredient is mixed with a carrier having the necessary compression properties in suitable proportions and compacted in the shape and size desired. The powders and tablets preferably contain up to 99% of the active

WO 02/067760

PCT/US02/00343

ingredient. Suitable solid carriers include, for example, calcium phosphate, magnesium stearate, talc, sugars, lactose, dextrin, starch, gelatin, cellulose, polyvinylpyrrolidone, low melting waxes and ion exchange resins.

Liquid carriers are used in preparing solutions, suspensions, emulsions, syrups, 5 elixirs and pressurized compositions. The active ingredient can be dissolved or suspended in a pharmaceutically acceptable liquid carrier such as water, an organic solvent, a mixture of both or pharmaceutically acceptable oils or fats. The liquid carrier can contain other suitable pharmaceutical additives such as solubilizers, emulsifiers, buffers, preservatives, sweeteners, flavoring agents, suspending agents, thickening agents, colors, viscosity 10 regulators, stabilizers or osmo-regulators. Suitable examples of liquid carriers for oral and parenteral administration include water (partially containing additives as above, e.g. cellulose derivatives, preferably sodium carboxymethyl cellulose solution), alcohols (including monohydric alcohols and polyhydric alcohols, e.g. glycols) and their derivatives, and oils (e.g. fractionated coconut oil and arachis oil). For parenteral administration, the 15 carrier can also be an oily ester such as ethyl oleate and isopropyl myristate. Sterile liquid carriers are useful in sterile liquid form compositions for parenteral administration. The liquid carrier for pressurized compositions can be halogenated hydrocarbon or other pharmaceutically acceptable propellant.

Liquid pharmaceutical compositions which are sterile solutions or suspensions can 20 be utilized by for example, intramuscular, intrathecal, epidural, intraperitoneal or subcutaneous injection. Sterile solutions can also be administered intravenously. The active ingredient may be prepared as a sterile solid composition which may be dissolved or suspended at the time of administration using sterile water, saline, or other appropriate sterile injectable medium. Carriers are intended to include necessary and inert binders, 25 suspending agents, lubricants, flavorants, sweeteners, preservatives, dyes, and coatings.

The active ingredient of the therapeutic composition of the present invention (*i.e.*, the Flt3L antagonist and the interferon antagonist) can be administered orally in the form of a sterile solution or suspension containing other solutes or suspending agents, for example, enough saline or glucose to make the solution isotonic, bile salts, acacia, gelatin,

WO 02/067760

PCT/US02/00343

sorbitan monooleate, polysorbate 80 (oleate esters of sorbitol and its anhydrides copolymerized with ethylene oxide) and the like.

The active ingredient can also be administered orally either in liquid or solid composition form. Compositions suitable for oral administration include solid forms, such as pills, capsules, granules, tablets, and powders, and liquid forms, such as solutions, syrups, elixirs, and suspensions. Forms useful for parenteral administration include sterile solutions, emulsions, and suspensions.

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology, microbiology, recombinant DNA technology, and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained in the literature: See, *e.g.*, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989); *DNA Cloning*, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. K. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL press, 1986); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); the series, *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); and *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

As used herein, the word "or" means any one member of a particular list and also includes any combination of members of that list.

As used herein, the singular forms "a," "an" and "the" include plural references unless the content clearly dictates otherwise.

The invention will be further described with reference to the following examples; however, it is to be understood that the invention is not limited to such examples. Rather, in view of the present disclosure which describes the current best mode for practicing the invention, many modifications and variations would present themselves to those of skill in the art without departing from the scope and spirit of this invention. All changes, modifications, and variations coming within the meaning and range of equivalency of the claims are to be considered within their scope.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

**Example 1: SLE sera induces monocytes to differentiate into cells with properties like dendritic cells**

Normal monocytes were exposed to SLE sera *in vitro*: within 12-24 hours, clustering of monocytes was noted; and within 24-48 hours, clustered cells displayed fine cytoplasmic projections reminiscent of DC cultures (Figs. 2A and 2B). Only SLE serum induced monocytes to cluster with 12-24 hours and acquire veiled cell morphology (Figs. 2A-2B compared to AS in Fig. 2C).

*SLE serum*: After informed consent, blood was obtained from the patient who satisfied diagnostic criteria of American College of Rheumatology (ACR) for SLE. Whole blood was collected into tubes containing EDTA or heparin, and was separated immediately by centrifugation at 100xg at 4°C. The plasma was harvested, treated with thrombin (Jones Pharma Incorporated, MO) and stored at -80°C until used. Disease activity was assessed by using the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score (Lahita, R.G. 1999. Systemic Lupus Erythematosus. *Academic Press* 3rd edition) determined on the same day that the blood specimen was obtained.

*Cell culture and phenotypic analysis*: Monocytes were isolated from blood mononuclear cells, after Ficoll-Paque™ gradient, by depletion of T-cells, B-cells and NK cells using purified anti-CD3, anti-CD19, anti-CD56 and anti-glycophorin A antibodies followed by immunomagnetic depletion (Dynabeads). Enriched CD14<sup>+</sup> monocytes were cultured in 6 well plates (1x10<sup>6</sup>/well) for 3 days in the presence of GM-CSF at 100 ng/mL and IFN- $\alpha$  at 1000IU/mL; or GM-CSF at 100 ng/mL and IL-4 at 20 ng/mL; or lupus serum; or autologous serum. On Day 3, cells were harvested and stained with anti-CD14-PE antibody, anti-CD83-PE antibody, anti-HLA-DR-PrCP (peridnine chlorophyll protein) antibody, anti-mannose-receptor-PE antibody, anti-CD80 PE (phycoerythrin) antibody, anti-CD86-PE antibody, anti-CD40 PE antibody, anti-CD16-PE antibody, anti-CD32 PE antibody, anti-CD64-PE antibody and anti-CD1a-FITC antibody.

Enriched CD14<sup>+</sup> monocytes from normal donor were cultured (1x10<sup>6</sup>/well) with 20% lupus serum or autologous serum. Monocytes were cultured with SLE-DCs and on

WO 02/067760

PCT/US02/00343

Day 3, cells were harvested and evaluated by flow cytometry for expression of certain cell surface molecules. Flow cytometry analysis demonstrated down-regulation of CD14, increased expression of MHC class II, costimulatory molecules: CD40, CD86 and CD80, CD83 as well as mannose-receptor, CD32 and CD36 (Fig. 3). Induction of monocyte differentiation to cells with the morphology and phenotype of DCs, rather than macrophages (MΦ), was restricted to those DCs grown in SLE serum. Indeed, neither autologous nor allogeneic serum induce such phenotype (Fig. 2C).

Monoclonal antibodies (mAbs) to the following antigens were utilized: CD14, HLA-DR (Becton Dickinson); CD86, CD40, HLA-ABC, CD1a (Dako, Carpinteria, CA); CD80, CD83 (Beckman Coulter/Immunotech, New York).

Since SLE serum-induced cells displayed antigen capture receptors and since the ability to capture antigens is an important property of DCs, it was determined whether the cells differentiated in culture could capture soluble antigens. To this end, SLE serum cultured monocytes were incubated with FITC-Dextran. As shown in Figs. 4A-4E, SLE serum-induced cells were as efficient as GM-CSF/IL-4 induced DCs in the uptake of FITC-Dextran.

The endocytic activity of the cells differentiated in culture was determined by incubating the cells with 100 µg/mL FITC-Dextran for 1 hour at 37°C. As a control, some cells were incubated with FITC-Dextran on ice. The cells were washed with cold PBS/FCS and analyzed by flow cytometry.

Thus, morphology, phenotype and antigen capture indicated that SLE serum directs monocytes to differentiate into cells capable of capturing antigens, *i.e.*, expressing antigen capture molecules such as CD14, mannose receptor and CD36 (characteristic of immature DCs and MΦ), and expressing molecules important for antigen presentation including HLA-DR, co-stimulatory molecules and CD83, a marker of mature DCs.

It was next determined whether monocytes cultured with SLE serum were able to induce proliferation of naïve CD4+ T cells, a property unique to DCs among all antigen presenting cells. As shown in Fig. 5, monocytes cultured with autologous serum induced a limited proliferation of allogeneic CD4+ T lymphocytes whereas monocytes cultured

WO 02/067760

PCT/US02/00343

with SLE serum induced a strong T cell proliferation similar to that of GM-CSF/IL-4 DCs, which is a standard characteristic of DCs *in vitro*. Fig. 6 illustrates the level of T cell cytokines produced by T cells induced by either SLE-DCs or DCs cultured in AS serum. SLE-DCs induced T cells to produce IFN- $\gamma$  and not IL-10 (except at negligible levels), thus demonstrating a type I polarization (Th1). Monocytes cultured with either SLE serum, AS serum, GM-CSF/IFN- $\alpha$  or GM-CSF/IL-4 were washed and plated with allogeneic CD4+ T cells. Supernatants were harvested 5 days after culture, and overnight restimulation with PHA. Cytokine release was assayed by an ELISA assay and IL-10 and IFN- $\gamma$  are shown in pg x 10<sup>3</sup>/mL on the vertical axis. Thus, the activated CD4+ T lymphocytes secreted high levels of interferon- $\gamma$ , low levels of IL-10 and no IL-4 consistent with type I polarization.

*T-cell proliferation and cytokine assay:* DCs were cultured with 1x10<sup>5</sup> freshly isolated CD4<sup>+</sup> allogeneic T cells at graded doses for 5 days in cRPMI plus 10% human AB serum or with naïve CD4+CD45RA+ allogeneic T lymphocytes. To assay autologous T cell proliferation, GM-CSF/IFN- $\alpha$  or GM-CSF/IL4 or lupus-cells were pulsed with DNA-bodies for 4 hours and cultured with 1x10<sup>5</sup> autologous T cells at graded doses. Cells were pulsed for the last 16 hours with 0.5  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]thymidine per well (New England Nuclear, Boston, MA). For cytokine analysis, supernatants were harvested 5 days after culture, and the cells were restimulated with PHA in fresh medium for 24 hours. Release of cytokines was assayed by ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN).

**Example 2: SLE-DCs present antigens  
from captured apoptotic cells**

The non-normal and inappropriate processing of apoptotic cells by the immune system is considered as one of the pathogenic events in SLE. Thus, it was next determined whether SLE-DCs can present antigens from captured apoptotic cells. To this end, SLE-DCs were shown to be able to capture apoptotic cell fragments in culture (Figs. 7A-7B).

WO 02/067760

PCT/US02/00343

SLE-DCs could also capture DNA containing apoptotic bodies derived from melanoma cells. Figs. 8A and 8B show the capture of allogeneic apoptotic cells and presentation of their antigens to autologous CD4+ T cells. SLE-DCs captured DNA containing apoptotic bodies (Fig. 8A) and presented their antigens to autologous CD4+ T cells as indicated by the induction of CD4+ T cell proliferation (Fig. 8B). HLA-DR<sup>+</sup> monocytes induced by AS serum, SLE serum and GM-CSF/IL-4 captured 7AAD labeled DNA-bodies (melanoma cell line killed by gamma-irradiation (150 Gy)). To allow capture of apoptotic bodies, antigen presenting cells are admixed with killed cells and incubated for 1 hour at 37°C. Thereafter, these loaded SLE-DCs were sorted by flow cytometry and cultured with autologous CD4+ T cells. T cell proliferation is determined after 5 days.

These loaded SLE-DCs were then cultured with autologous CD4+ T cells. As shown in Fig. 8B, loaded SLE-DCs were able to induce proliferation of autologous CD4+ T cells. Thus, SLE sera induced monocytes to differentiate into functional DCs which are able to capture and present antigens processed from apoptotic cells.

15

**Example 3: Only IFN- $\alpha$  containing active SLE sera induce monocytes to become SLE-DCs**

Experiments were performed to determine whether all SLE sera were able to direct monocyte differentiation into DCs. Monocytes were cultured with 19 different SLE sera to be tested for their ability to stimulate a mixed leukocyte response or mixed lymphocyte reaction (MLR). As shown in Table 1, monocytes cultured with autologous serum were only able to induce very low T cell proliferation (negative control), and monocytes cultured with GM-CSF/IL-4 to produce DCs elicited a 100% MLR (positive control), the mean proliferation was 7.5% ( $\pm 6.4\%$ , n=5). When monocytes cultured with SLE sera were evaluated in the same way, considering 20% proliferation as a cut-off point (mean +2SD of autologous serum cultured monocytes) 11 of the 19 sera induced monocytes to become allostimulatory DCs with mean proliferation of 41%  $\pm$  15%. As sera from patients with dermatomyositis were unable to reproduce this skewing and since the patients with dermatomyositis were treated with the same steroid regimen as SLE patients,

WO 02/067760

PCT/US02/00343

it was concluded that the effects of SLE sera were independent of the steroids. Furthermore, sera from two newly diagnosed untreated patients efficiently differentiated monocytes into SLE-DCs. Importantly, of those 11 sera that induced SLE-DCs, 7 sera that were tested for the IFN- $\alpha$  levels contained more than 190 pg/mL IFN- $\alpha$ , while most of other sera unable to induce SLE-DCs contained less IFN- $\alpha$  than could be detected in the assay (12pg/mL) (Table 1). Furthermore, the DCs inducing capacity of SLE sera was related to the disease activity. In Figs. 9A-9B, a graph shows the relation of SLE disease activity to the inducing activity of SLE-DCs. Monocytes were cultured with 11 different SLE sera taken from either patients with active lupus (SLE Disease Activity Index (SLEDAI) > 6) or inactive lupus (SLEDAI < 6), and the generated cells were tested for their ability to induce T cell proliferation. As controls, monocytes were cultured with GM-CSF and IL-4. The vertical axis shows the percent of induced allostimulatory capacity. Therefore, the ability of SLE sera to skew monocyte differentiation toward DCs was disease-specific and correlated with the levels of IFN- $\alpha$ .

Table 1: IFN- $\alpha$  containing SLE sera induce monocytes to acquire the capacity to stimulate mixed lymphocyte reaction.

SERUM	MLR	IFN- $\alpha$ level pg/ml	SLEDAI
SLE1	53%	ND	20
SLE 2	58%	> 500	8
SLE 3	27%	192	12
SLE 4	28%	ND	24
SLE 5	33%	>500	12
SLE 6	5%	<12.5	2
SLE 7	45%	733	14

WO 02/067760

PCT/US02/00343

SLE 8	34%	410	17
SLE 9	26%	>500	10
SLE 10	4%	<12.5	6
SLE 11	12.5%	25	6
SLE 12	70%	>500	12
SLE 13	4%	<12.5	4
SLE 14	50%	ND	4
SLE 15	10%	<12.5	6
SLE 16	16%	78	6
SLE 17	30%	>500	8
SLE 18	60%	>500	17
SLE 19	7.5%	<12.5	14
SLE 20	4%	<12.5	2
AS (n=8)	7%	<12.5	
Juvenile arthritis (n=2)	3%	<12.5	
Dermatomyositis (n=3)*	4%	<12.5	
GM/IL4	100%		

Monocytes were cultured with different SLE sera (Table 1, column 1) and the generated cells were tested for their ability to induce allogeneic T cell proliferation (Mixed lymphocyte reaction (column 2, Table 1, MLR)). As controls, monocytes were cultured with GM-CSF and IL-4 and used as a 100% standard. The allostimulatory activity of monocytes cultured with SLE serum is expressed as a percentage of T cell proliferation as

WO 02/067760

PCT/US02/00343

compared to GM-CSF and IL-4 and related to levels of IFN- $\alpha$  in the serum (column 3, Table 1) and to disease activity (SLEDAI, column 4, Table 1). SLEDAI consists of 9 groups of clinical and laboratory criteria which include assessment of organ systems: CNS, vascular, renal, musculoskeletal, serosal, dermal, immunologic and hematologic. ND denotes not done, AS denotes autologous serum from healthy donors, SLE denotes serum from patients with SLE.

**Example 4: The ability of SLE sera to induce SLE-DCs is abolished by blocking IFN- $\alpha$**

10 The ability of the DCs to skew the differentiation of monocytes toward the generation of antigen-presenting cells was related to the level of IFN- $\alpha$  in SLE serum. The phenotype of SLE-DCs was reminiscent of that induced by GM-CSF and IFN- $\alpha$  and therefore, SLE sera were pre-incubated with an anti-IFN- $\alpha$  neutralizing antibody. The cells cultured with such sera were tested for their ability to induce the differentiation of  
15 monocytes into DCs as measured by their ability to induce MLR. The ability of SLE sera to induce functional DCs was inhibited by neutralization of IFN- $\alpha$ , but not by the isotype control (as shown in Fig. 10) nor other blocking antibodies to IL-4, CD40-L and IL-10, which indicates that IFN- $\alpha$  is necessary for the induction of SLE-DCs. Fig. 10 illustrates the blocking of IFN- $\alpha$  in monocyte cell cultures serum obtained from SLE patients. The  
20 addition of an interferon blocking antibody resulted in a much decreased ability to induce the proliferation of allogeneic CD4+ T cells. The results show that DCs inducing activity of SLE serum is dependent on IFN- $\alpha$  and is abolished by blocking IFN- $\alpha$  in SLE serum used to culture monocytes. Purified monocytes were cultured with SLE serum, or serum pre-incubated for 30 min at saturating concentration of IFN- $\alpha$  blocking Ab (SLE ab)  
25 (Biosource) or with the corresponding concentration of isotype control (SLE ctrl). After three days, the cells were assessed for their ability to induce the proliferation of allogeneic CD4+ T-cells.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

**Example 5: Patients with SLE have high serum levels of IFN- $\alpha$ .**

Serum levels of IFN- $\alpha$  in pediatric SLE patients was determined. As shown in Fig. 11, serum taken from SLE patients had much higher levels of IFN- $\alpha$  than serum obtained from healthy subjects (controls). Serum was obtained from patients with SLE. The serum was assayed for IFN- $\alpha$  using an ELISA kit (BioSource, according to manufacturer's recommendations) which is based on the international reference standard for human interferon (approved by National Institutes of Health). The colorimetric reaction was developed using HRP and TNE. Absorbances at 450 nm were determined with a microplate reader. The assay's extended range protocol was used which allowed determination of serum levels in the range from 10 to 5000 pg/mL.

**Example 6: PBMC SLE patients can secrete IFN- $\alpha$  in response to viral triggering.**

When exposed to influenza virus, PBMCs from SLE patients released high levels of IFN- $\alpha$  when compared to the level of IFN- $\alpha$  released from PBMCs from healthy adults which were exposed to influenza virus (see Fig. 12).

**Example 7: IFN- $\alpha$  induces BAFF/Blys expression on monocytes and BCMA expression on PBMC**

A novel member of the TNF family, designated BAFF/Blys-L (for B-cell activating factor belonging to the TNF family), is found on DCs and T-cells and binds to two receptors on B-cells, namely, BCMA and TACI, and induces their proliferation and immunoglobulin secretion. Therefore, it was determined whether IFN- $\alpha$  would regulate the expression of both molecules (*i.e.*, BCMA and TACI) on the respective cell types. As shown in Figs. 13A-13B, IFN- $\alpha$ , but not other factors, induces high levels of BAFF/Blys in monocytes as determined by real-time PCR. Furthermore, IFN- $\alpha$  induces BCMA expression on normal PBMCs.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

**Example 8: Screening Patient Serum for Induction of Monocyte Differentiation *In Vitro* Diagnostic Assay**

5 Serum from a patient is screened for its ability to induce monocyte differentiation to dendritic cells which differentiation can then be blocked by neutralizing type I interferon.

10 Following the procedures outlined in detail in Example 1, patient serum was obtained. Following the procedures outlined in Example 1, an aliquot of patient serum is added to an aliquot of purified monocytes from normal patients. After about three days, the degree of differentiation of the monocytes to dendritic cells is assessed by any means known in the art. Exemplary assay methods include direct morphological analysis, phenotypic analysis by flow cytometry, antigen capture measurable by FITC-Dextran uptake, and induction of allogeneic naïve CD4+ T cells measurable by thymidine incorporation. This *in vitro* diagnostic assay includes a known set of standards in order to 15 classify the results obtained with the sample of serum obtained from the patient. Briefly, serum from a normal patient, *i.e.*, a patient known not to be suffering from an autoimmune disease is run through the assay and the results obtained are used as the standard indicative of low risk for developing an autoimmune disease. Similarly, serum from a patient known to have an autoimmune disease, such as SLE, is taken and used in the assay and the results 20 obtained are used as the standard indicative of high risk for developing an autoimmune disease. Patient serum which supports a high degree of monocyte differentiation to dendritic cells that can be blocked by type I interferon, is considered to place the patient at high risk for developing an autoimmune disease. The "high degree" of monocyte differentiation is determined by comparing the amount of monocyte differentiation in the 25 assay using the patient's serum with the standards previously established for high risk, low risk and any other middle risk values. Each level of risk for developing an autoimmune disease is associated with a level of monocyte differentiation observed in the assay. If the patient serum does not support a high degree of monocyte differentiation to dendritic cells that can be blocked by type I interferon, then the patient's level of risk for developing an

WO 02/067760

PCT/US02/00343

autoimmune disease is little or no risk. For a patient diagnosed with an autoimmune disease, periodic evaluation of the patient's serum in this assay provides a method to monitor for a disease flare or progression.

5                   **Example 9: TNF inhibits type I interferon secretion by pDCs**

Kadowaki et al. (*J. Exp. Med.* 2000, 192:1785-96) disclose that autocrine IFN- $\alpha$  supports pDCs survival while the autocrine TNF- $\alpha$  induces their maturation into mature pDCs, which are unable to produce IFN- $\alpha$ . Thus, studies were performed to determine whether or not adding neutralizing TNF antibodies to cultures of normal pDCs sustained their IFN- $\alpha$  production in response to viral triggering.

10                   For these studies, pDCs were isolated from cultures of CD34+ hematopoietic progenitors by flow cytometry sorting of CD11c negative and CD123 positive cells. The isolated pDCs were cultured at a concentration of 50,000 cells per well /200  $\mu$ L with purified influenza virus (5  $\mu$ L) and either a control antibody or a neutralizing anti-TNF antibody (primary culture). After 24 hours of primary culture, the plates were centrifuged, supernatants were harvested, and the cells were re-cultured in fresh medium with the fresh dose (5  $\mu$ L) of flu virus (secondary culture). After additional 24 hours of secondary culture, the supernatants were harvested and evaluated for the presence of IFN- $\alpha$  levels.

15                   Figs. 14A-14C show TNF regulation of IFN- $\alpha$  secretion by plasmacytoid DCs (pDCs). Purified DCs generated *in vitro* by culturing CD34+ hematopoietic progenitor cells with Flt3L (100 ng/mL) and thrombopoietin (TPO) (30 ng/mL), are cultured at a concentration of 50,000 cells per well with purified influenza virus (5  $\mu$ L) with either a control antibody (5  $\mu$ g/mL) or with neutralizing anti-TNF antibody (5  $\mu$ g/mL) or with exogenous TNF (100 ng/mL) (primary culture). After 24 hours of culture, the plates were centrifuged, supernatants were harvested and the cells were re-cultured in fresh medium with the fresh dose of influenza virus (secondary culture). After an additional 24 hours of culture, the supernatants were harvested for the evaluation of IFN- $\alpha$  levels. As shown in Fig. 14A, adding neutralizing anti-TNF antibody resulted in a 3-fold increased release of

WO 02/067760

PCT/US02/00343

IFN- $\alpha$  in secondary cultures. Conversely, adding TNF resulted in up to 70% inhibition of IFN- $\alpha$  release in primary cultures of pDCs (see Fig. 14B). As illustrated in Fig. 14C, the concentration of IFN- $\alpha$  in the primary culture supernatants was decreased from 100 ng/mL to 40 ng/mL.

5 This study provides the non-limiting theory summarized in Fig. 16 of how immature pDCs can be blocked from secreting IFN- $\alpha$  by incubation in TNF (or an agonistic anti-TNF receptor binding agent). The pDCs incubated with TNF are thus promoted to become mature pDCs, which do not secrete IFN- $\alpha$ .

#### 10 **Example 10: TNF inhibits pDC ontogeny**

Studies were next performed to determine whether the effect of TNF on pDC is restricted to their maturation/IFN- $\alpha$  production or whether TNF, a major pro-inflammatory cytokine involved in the regulation of myeloid dendritic cells differentiation, also affects differentiation of pDCs from hematopoietic progenitors. For these studies, 15 CD34+CD45RA- hematopoietic progenitors were sorted to over 90% purity by flow cytometry and subsequently cultured in the presence of Flt3L (100 ng/mL, R&D), thrombopoietin (TPO, 30 ng/mL, R&D), and either interleukin-6 (IL-6, 25 ng/mL, R&D), or tumor necrosis factor (TNF, 100 ng/mL, R&D), in the first week of culture at a density of between  $2/5 \times 10^5$  to  $5 \times 10^5$ /well. Thereafter, the cells were washed and cultured for 20 about an additional 3 weeks with Flt3L (100 ng/mL) only.

Fig. 15 shows results of a flow cytometry experiment which shows that TNF blocks plasmacytoid DCs' differentiation in favor of myeloid DCs. pDC differentiation was determined by flow cytometry analysis of cell surface marker expression with pDC being identified by CD11c negative CD123 positive staining. Thus, adding TNF in the 25 first week resulted in a complete inhibition of progenitor cell differentiation into CD123+CD11c- pDCs and skewed differentiation towards CD123-DC11c+ myeloid DCs. Thus, TNF and/or agonistic anti-TNF receptor antibodies, both of which stimulate the

WO 02/067760

PCT/US02/00343

TNF receptor on the progenitor cells, block the pDCs' differentiation and redirect progenitor cells towards myeloid DCs differentiation.

This study provides the non-limiting theory shown on Fig. 16 of how IFN- $\alpha$  production and secretion can be blocked by exposing progenitor cells to TNF (or an agonistic anti-TNF receptor binding agent). Such exposure leads to the inhibition of the development of pDCs that can make interferon and therefore blocks interferon production and secretion.

**Example 11: The level of Flt3L is increased in serum from subjects suffering from SLE**

As described in the above examples, unabated DC induction is believed to drive the devastating autoimmune response in SLE and, as described herein, may be controlled by targeting IFN- $\alpha$  and Flt3L together. However, other cytokines, which are termed herein as "DC-poietins", can mobilize and/or activate DCs to differentiate into antigen presenting cells *in vivo*. This mobilization or activation of DCs can occur in many different ways. For example, such DC-poietins can increase differentiation of preDC cells into mature dendritic cells which can go on to increase an immunogenic response and worsen the autoimmune responses. As another example, the DC-poietins can increase the actual generation of newly matured DCs which contribute to the autoimmune responses in the subject, or the DC-poietins can increase the activity of mature DCs.

One non-limiting DC-poietin is the Flt3L, which has been shown to mobilize large numbers of DCs, both myeloid and plasmacytoid, *in vivo* in human and mouse models (Maraskovsky et al (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* 417:33-40; (1996) *J. Exp. Med.* 184(5):1953-62; (2000) *Blood* 96(3):878-84). Furthermore, as shown in the present invention, culturing CD34+ hematopoietic stem cells with Flt3L yields not only plasmacytoid DCs but also CD11c+ myeloid DCs as well as monocytes.

Serum levels of Flt3L in patients with SLE (83 blood samples) as well as in healthy controls (35 blood samples) was determined using commercially available ELISA (R&D). As shown in Fig. 17, SLE patients have significantly higher serum levels of Flt3L

WO 02/067760

PCT/US02/00343

( $p < 0.002$ ) ranging from  $< 12.5$  to  $582$  pg/mL of serum, than that measured in serum taken from healthy subjects. 83 blood samples from SLE patients and 35 blood samples from healthy patients (healthy controls) were tested using a commercially available ELISA. The differences in levels of Flt3L in the serum samples are statistically significant using both  
5 parametric and non-parametric analysis.

**Example 12: Serum levels of Flt3L correlate with autoimmune disease activity**

It was determined that serum levels of Flt3L correlate with disease activity as measured by the SLE Disease Activity Index (SLEDAI). As shown in Fig.18, there was a  
10 significant positive correlation ( $p = 0.02$ ), indicating that those individuals with high serum levels of Flt3L also had displayed high SLE disease activity. Therefore, the occurrence of elevated levels of Flt3L in the serum is an indicator of autoimmune risk or active autoimmune disease in a subject.

**Example 13: Flt3L permits monocyte differentiation into DCs**

Monocytes isolated from healthy donors' peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were either isolated by positive selection using CD14 beads or enriched by adherence and subsequently cultured for 2 days in a complete culture medium (RPMI1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum) with Flt3L (100 ng/mL) and IL-  
20 3 (10 ng/mL) and/or IFN- $\alpha$  (1000 U/mL). Control cultures were carried out with GM-CSF and IL-4. Fig. 19A shows cells cultured with Flt3L/IFN- $\alpha$  (1000 u/mL). Fig. 19B shows cells cultured with GM-CSF(100 ng/mL)/IL-4 (5 ng/mL). Fig. 19C shows cells cultured with IFN $\alpha$  (1000 u/mL)/IL-3 (10 ng/mL). Fig. 19D shows cells cultured with Flt3L/ IFN- $\alpha$  (1000 u/mL)/IL-3 (10 ng/mL). After 2 days of culture, cytospun monocytes  
25 were stained with Giemsa. Thus, monocytes cultured with Flt3L and IFN- $\alpha$  differentiate into cells displaying features of DCs as determined by morphology (Figs. 19A-19D), phenotype (CD14 low, DC-SIGN+, CD40+, HLA-DR+, CD11c+) and function, *i.e.*, the capacity to induce proliferation of allogeneic CD4+ T cells which is a hallmark of dendritic

WO 02/067760

PCT/US02/00343

cell function (Fig. 20). In Fig. 20,  $10^5$  purified allogeneic CD4+ T cells were cultured for 5 days with graded numbers of antigen presenting cells (horizontal axis). T cell proliferation was measured by thymidine incorporation (vertical axis,  $\text{cpm} \times 10^3$ ) following culture with media supplemented with Flt3L. Fig. 21 shows a diagram summarizing several pathways in the development and differentiation of subsets of DC which can be altered by blocking the activity of Flt3L and IFN- $\alpha$ . These therapeutic targets include 1) differentiation pathway from hematopoietic progenitor cells into pDC, which can be blocked either by TNF or by Flt3L antagonist or by a combination of both TNF and Flt3L antagonist with the end result being inhibited interferon production through the inhibition of the differentiation of cells that can make interferon, 2) pDCs maturation pathway, which can be accelerated by TNF with the end result being that pDCs become non-interferon producing cells thus decreasing levels of interferon, 3) differentiation pathway from monocytes to dendritic cells, which can be blocked by an interferon antagonist or by a Flt3L antagonist or by a combination of interferon antagonist and a Flt3L antagonist, with the end result being inhibited differentiation of dendritic cells that are otherwise able to capture and present apoptotic cells and drive autoimmune disease by inducing the differentiation of autoreactive B cells and autoreactive T cells.

**Example 14: Neutralizing Flt3L in SLE serum Inhibits SLE serum-induced Monocyte Differentiation into Dendritic Cells**

Monocytes are cultured with serum obtained from a patient with SLE. An effective amount of a monoclonal antibody which specifically binds Flt3L (anti-Flt3L monoclonal antibody) is added, at the saturating concentration, *i.e.*, a concentration ranging between about 1-10 fold molar excess, to the monocyte cell culture under suitable culture conditions for monocyte differentiation. After three days of incubation, a lower number of monocytes had differentiated into DCs than in an identical monocyte culture which had not received the monoclonal antibody. Therefore, the monoclonal antibody to Flt3L which neutralizes the activity of Flt3L in the culture inhibits SLE-induced monocyte differentiation into DCs.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

**Example 15: Addition of a composition of a Flt3L antagonist and an interferon antagonist to monocytes grown in SLE serum inhibits monocyte differentiation into antigen presenting DCs**

5 A method for treating an autoimmune disease in a subject is exemplified herein whereby a therapeutic composition of the invention is administered to the subject in order to reduce or inhibit the generation of antigen presenting cells which cause the stimulation of autoreactive T cells and of autoreactive B cells which produce auto-antibodies in the subject.

10 A therapeutic composition is prepared with an amount of (a) an anti-Flt3L monoclonal antibody and (b) an amount of an anti-IFN- $\alpha$  monoclonal antibody which is equal to about 1-10 fold the level of Flt3L and IFN- $\alpha$ , respectively, in the serum of the patient to be treated. Methods for preparing monoclonal antibodies to Flt3L are known, for example one such method is in Example 6 of U.S. Patent No. 5,843,423, "Methods of  
15 Stimulating hematopoietic cells with flt3-ligand." Methods for preparing monoclonal antibodies to IFN- $\alpha$  are known and, for example, some such methods are set out in U.S. Patent No. 5,919,453.

Serum can be obtained from the subject with the autoimmune disease and tested to insure that sufficient levels of Flt3L and IFN- $\alpha$  are present in the serum to warrant the  
20 administration of the therapeutic composition.

The composition is administered daily via an injection or via an intravenous delivery method to insure a serum level of the two elements of the composition is within a range from about 1 to about 10 fold molar excess of Flt3L and/or IFN- $\alpha$ . Monitoring of the subject's condition can be carried out throughout the treatment period so as to  
25 determine the level of generation of APCs. Existence of DCs in the subject's serum is monitored throughout the treatment. The treatment is terminated when the symptoms of the autoimmune disorder subside and it is undertaken again when the levels of Flt3L and/or IFN- $\alpha$  show an increasing trend over two consecutive blood analyses and/or when the symptoms of the autoimmune disorder worsen.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

What is claimed is:

1. A method for treating an autoimmune disease in a subject which comprises administering to the subject an effective amount of (a) at least one interferon antagonist that reduces activity of a type I interferon, and (b) at least one Flt3 ligand (Flt3L) antagonist that reduces activity of a Flt3L to thereby treat the autoimmune disease.
2. The method of claim 1, wherein the autoimmune disease is selected from the group consisting of acquired immune deficiency syndrome (AIDS), ankylosing spondylitis, arthritis, aplastic anemia, Behcet's disease, diabetes, graft-versus-host disease, Graves' disease, hemolytic anemia, hypogammaglobulinemia, hyper IgE syndrome, idiopathic thrombocytopenia purpura (ITP), multiple sclerosis (MS), Myasthenia gravis, psoriasis, lupus and any combination thereof.
3. The method of claim 2, wherein the lupus is systemic lupus erythematosus (SLE) or drug-induced lupus.
4. The method of claim 2, wherein the diabetes is diabetes mellitus, Type I diabetes, Type II diabetes, juvenile on-set diabetes or any combination thereof.
5. The method of claim 2, wherein the arthritis is rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis or any combination thereof.
6. The method of claim 1, wherein the autoimmune disease is SLE.
7. The method of claim 1, wherein the subject is a mammal.
8. The method of claim 7, wherein the mammal is a human, a primate, a rat, a dog, a cat or a mouse.
9. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist is selected from the group consisting of an antibody, an antigen-binding fragment of an antibody, a polypeptide, a peptidomimetic, a nucleic acid encoding a peptide, an organic molecule and any combination thereof.
10. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist comprises soluble receptor for IFN- $\alpha$ .

WO 02/067760

PCT/US02/00343

11. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist comprises a anti-IFN- $\alpha$  antibody or an antigen-binding fragment thereof.
12. The method of claim 1, wherein the Flt3L antagonist is selected from the group consisting of an antibody, an antigen-binding fragment of an antibody, a polypeptide, a peptidomimetic, a nucleic acid encoding a polypeptide, an organic molecule and any combination thereof.
13. The method of claim 1, wherein the Flt3L antagonist comprises a soluble Flt3 receptor.
14. The method of claim 1, wherein the Flt3L antagonist comprises a anti-Flt3L antibody or an antigen-binding fragment thereof.
15. The method of any one of claims 9, 11, 12 or 14, wherein the antibody comprises a monoclonal antibody, a chimeric antibody, an anti-idiotypic antibody, a humanized antibody, a primatized antibody and any combination thereof.
16. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist and the Flt3L antagonist are part of one molecule.
17. The method of claim 1, wherein the effective amount of the interferon antagonist comprises from about 1 to about 10 fold molar excess of interferon.
18. The method of claim 1, wherein the effective amount of the Flt3L antagonist comprises from about 1 to about 10 molar excess of Flt3L.
19. The method of claim 1, wherein the administration of the composition is by intralesional, intraperitoneal, intramuscular or intravenous injection; infusion; liposome-mediated delivery; or topical, nasal, oral, ocular or otic delivery.
20. The method of claim 1, wherein the type I interferon is an interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) or an IFN- $\beta$ .
21. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist reduces binding of a type I interferon with its receptor.
22. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist reduces interferon-dependent signal transduction.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

23. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist reduces interferon serum levels.
24. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist reduces interferon secretion from cells as measured by an interferon receptor binding assay.
- 5 25. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist reduces bioavailability of interferon in serum as measured by an interferon receptor binding assay.
26. The method of claim 1, wherein the interferon antagonist reduces development of cells which produce type I interferon in the subject as measured by a monocyte differentiation assay.
- 10 27. The method of claim 1 or 11, wherein the interferon antagonist is TNF.
28. A therapeutic composition to inhibit monocyte differentiation into dendritic cells capable of antigen presentation which comprises:
- (a) at least one interferon antagonist that reduces activity of a type I interferon, and
- 15 (b) at least one Flt3 ligand (Flt3L) antagonist that reduces activity of Flt3L.
29. The composition of claim 28, wherein the type I interferon is an interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) or an IFN- $\beta$ .
30. The composition of claim 28, wherein the composition further comprises a carrier.
- 20 31. The composition of claim 28, wherein the interferon antagonist is selected from the group consisting of an antibody, an antigen-binding fragment of an antibody, a polypeptide, a peptidomimetic, a nucleic acid encoding a polypeptide, an organic molecule and any combination thereof.
32. The composition of claim 28, wherein the interferon antagonist comprises a
- 25 soluble receptor for IFN- $\alpha$ .
33. The composition of claim 28, wherein the interferon antagonist comprises an anti-IFN- $\alpha$  antibody or an antigen-binding fragment thereof.
34. The composition of claim 28, wherein the interferon antagonist is TNF.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

35. The composition of claim 28, wherein the Flt3L antagonist is selected from the group consisting of an antibody, an antigen-binding fragment of an antibody, a peptide, a peptidomimetic, a nucleic acid encoding a peptide, an organic molecule and any combination thereof.
- 5 36. The composition of claim 28, wherein the Flt3L antagonist comprises a soluble Flt3 receptor.
37. The composition of claim 28, wherein the Flt3L antagonist comprises an anti-Flt3L antibody or an antigen-binding fragment thereof.
- 10 38. The composition of any one of claims 31, 33, 35 and 37, wherein the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, an anti-idiotypic antibody, a humanized antibody, or a primatized antibody.
39. The composition of claim 28, wherein the interferon antagonist and the Flt3L antagonist are part of one molecule.
- 15 40. The composition of claim 28, wherein the composition comprises two or more interferon antagonists and a Flt3L antagonist.
41. The composition of claim 40, wherein one interferon antagonist is TNF.
42. The composition of claim 40, wherein the composition comprises an anti-IFN- $\alpha$  antibody, an anti-Flt3L antibody and TNF.
- 20 43. An *in vitro* assay for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease which comprises:
- (a) obtaining a serum sample from the subject;
  - (b) quantifying IFN- $\alpha$  and Flt3 ligand (Flt3L) in the serum sample; and
  - (c) comparing the quantity of IFN- $\alpha$  and Flt3L with the quantities of IFN- $\alpha$  and Flt3L in serum from subjects with an autoimmune disease, thereby determining the
- 25 subject's risk for developing an autoimmune disease.
44. The method of claim 43, wherein a risk of developing an autoimmune disease occurs when the quantities of IFN- $\alpha$  and Flt3L are within about a 30% range of those quantities for subjects with an autoimmune disease.

WO 02/067760

PCT/US02/00343

45. The method of claim 44, wherein said risk increases when said range is about 20%.
46. The method of claim 43, wherein said comparison is made for age-matched subjects.
- 5 47. A kit for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease or for monitoring the status of an autoimmune disease in a subject which comprises a composition which specifically binds to Flt3L and to IFN- $\alpha$  in an amount effective to detect Flt3L and IFN- $\alpha$  in a biological sample of a subject.
- 10 48. The kit of claim 47, wherein the biological sample is a blood sample or a serum sample.
49. The kit of claim 47, wherein the composition comprises a monoclonal antibody that binds Flt3L and a monoclonal antibody that binds IFN- $\alpha$ .
50. The kit of claim 47, wherein the kit further comprises one or more reagents for detecting amounts of the composition bound to one or more samples.
- 15 51. The kit of claim 47, wherein the composition is labeled with a detectable marker.
52. The kit of claim 51, wherein the detectable marker is selected from the group consisting of a fluorescent marker, a radioactive marker, an enzymatic marker, a colorimetric marker, a chemiluminescent marker and any combination thereof.
- 20

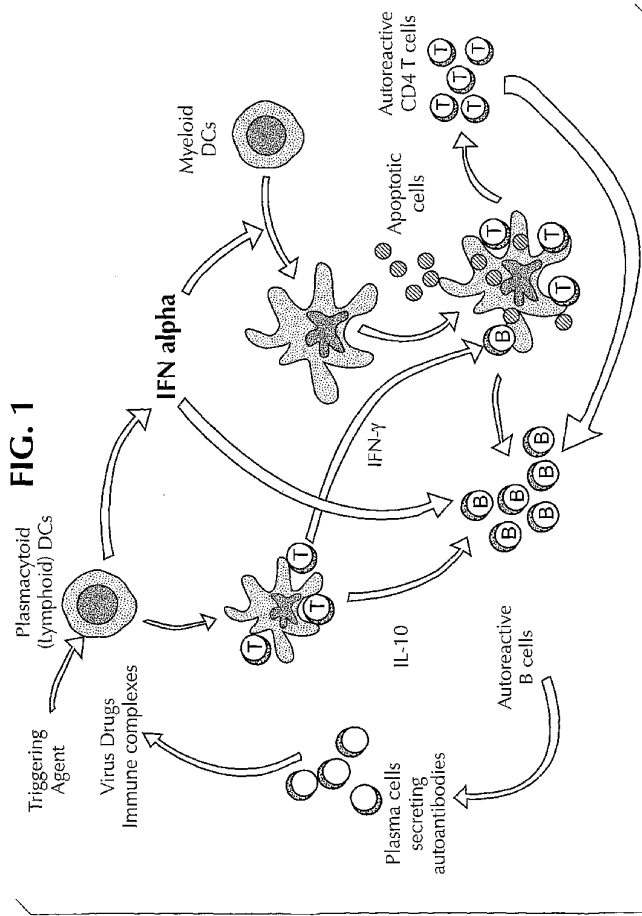


FIG. 2C

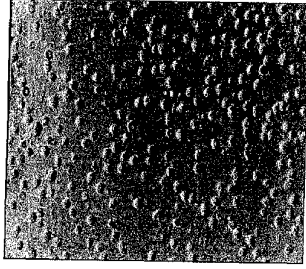


FIG. 2B

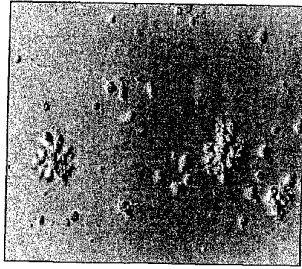


FIG. 2A

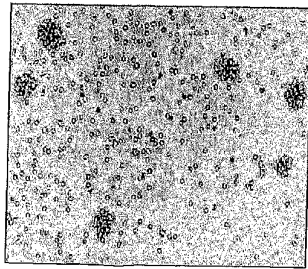


FIG. 2E

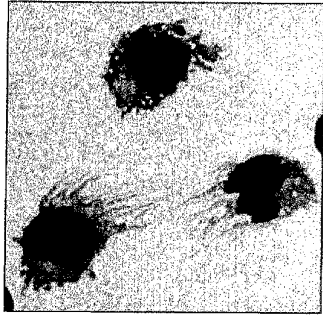


FIG. 2D

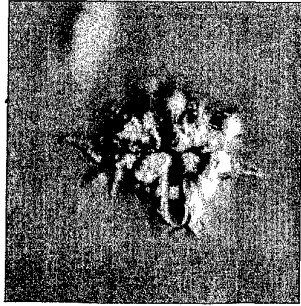
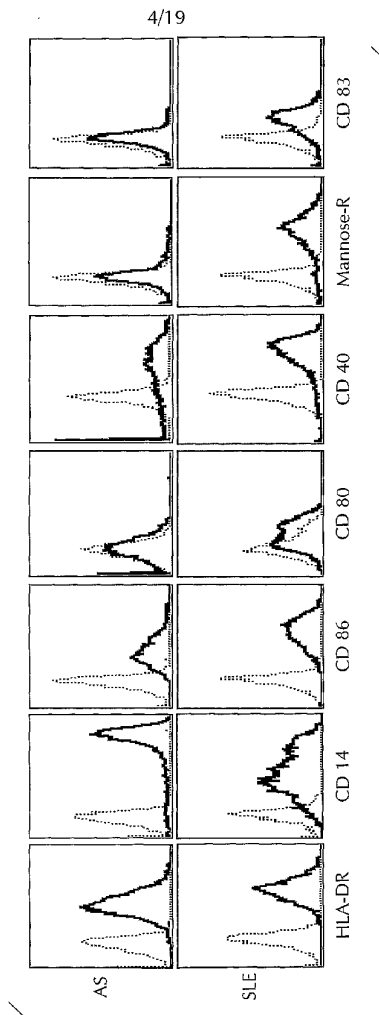
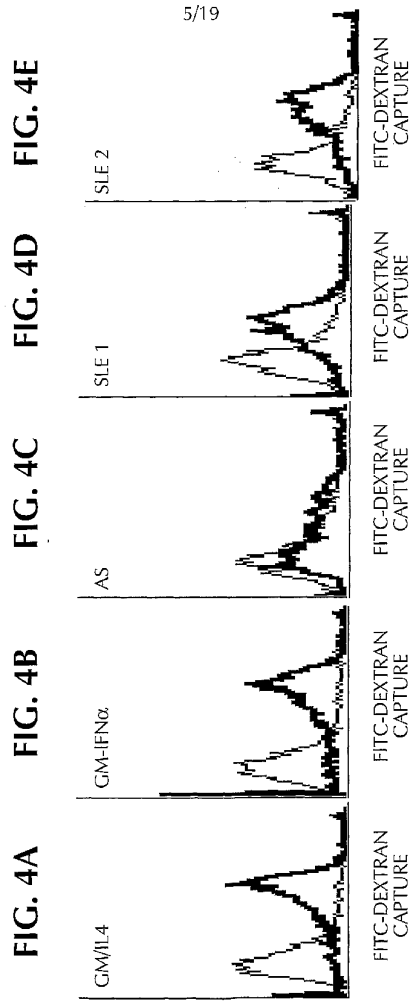


FIG. 3





6/19

FIG. 5

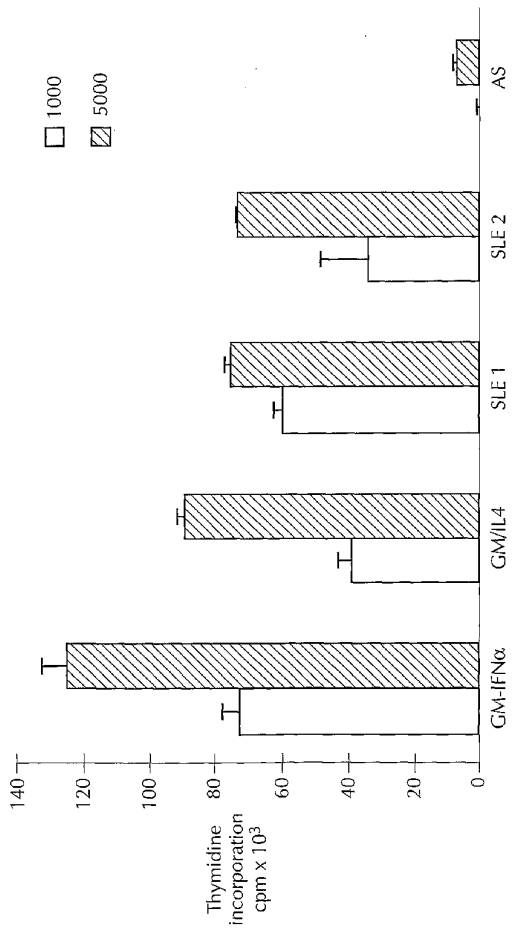


FIG. 6

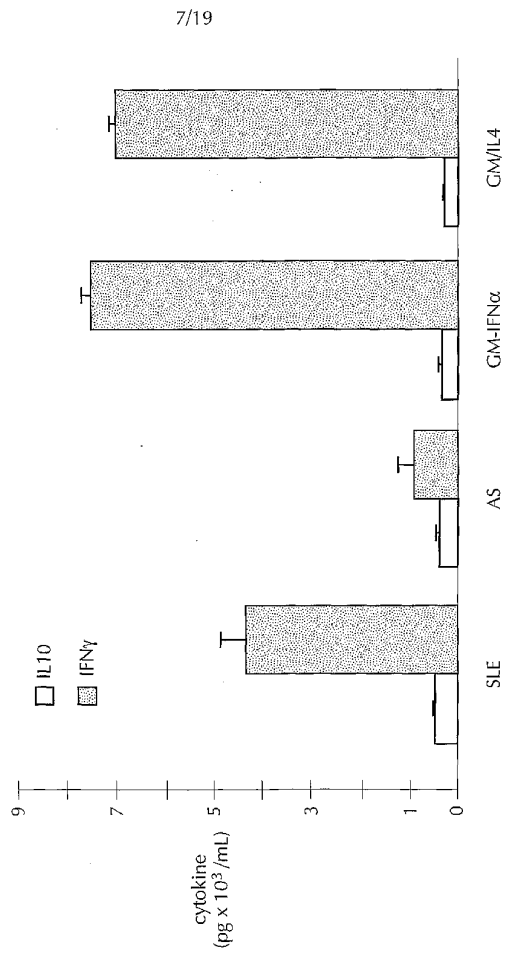


FIG. 7C

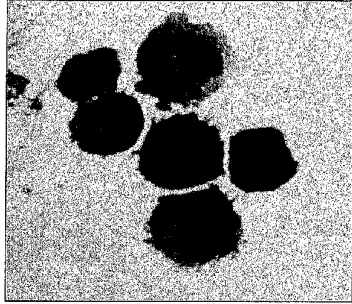


FIG. 7B

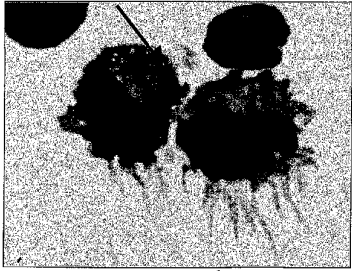
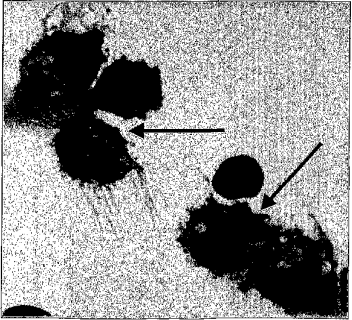


FIG. 7A



WO 02/067760

PCT/US02/00343

FIG. 8A

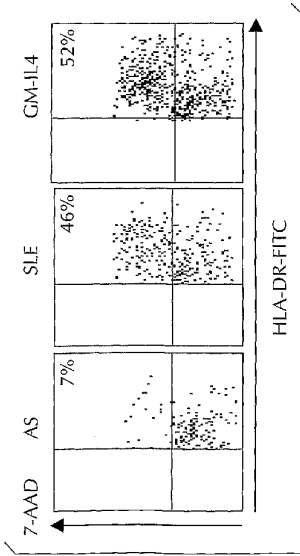
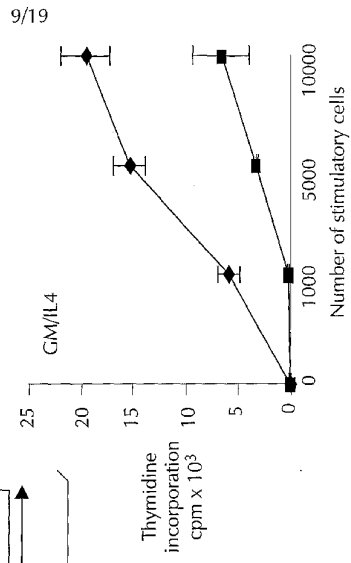


FIG. 8B



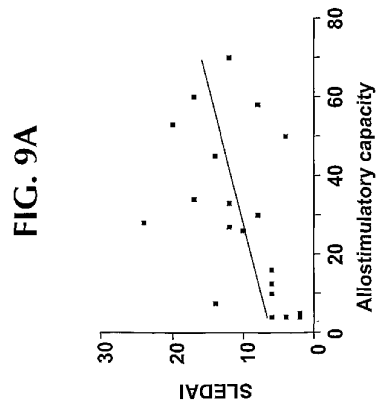
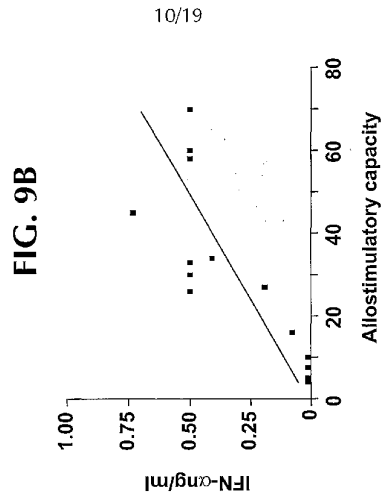
Thymidine incorporation  
cpm x 10<sup>3</sup>

GM/IL4

Number of stimulatory cells

WO 02/067760

PCT/US02/00343



WO 02/067760

PCT/US02/00343

11/19

FIG. 10

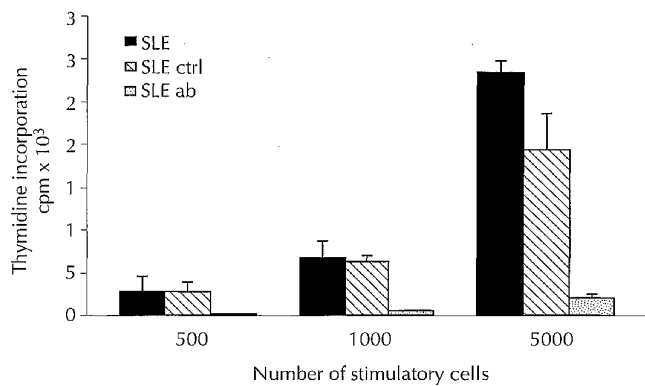
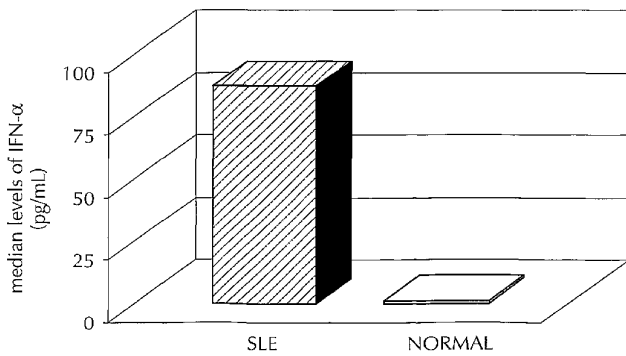


FIG. 11



12/19

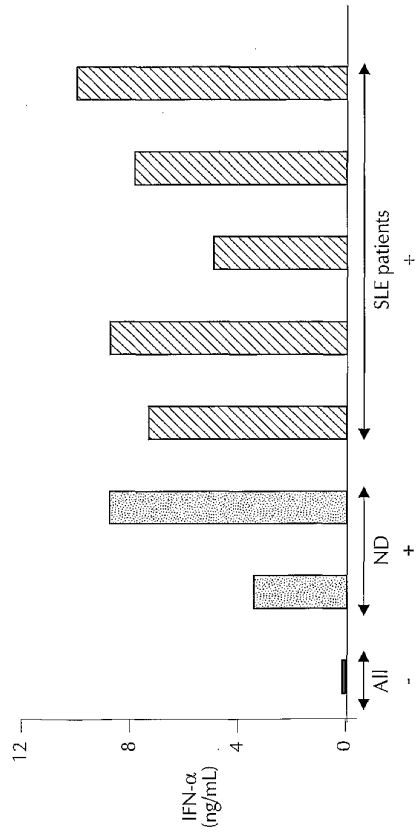


FIG. 12

WO 02/067760

PCT/US02/00343

FIG. 13B

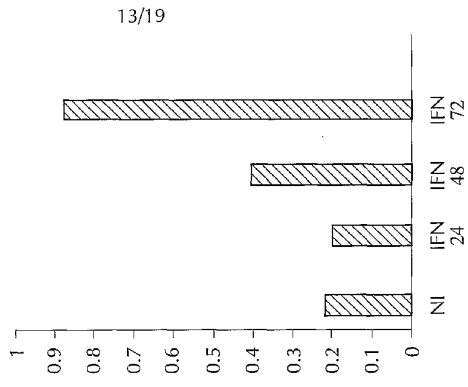
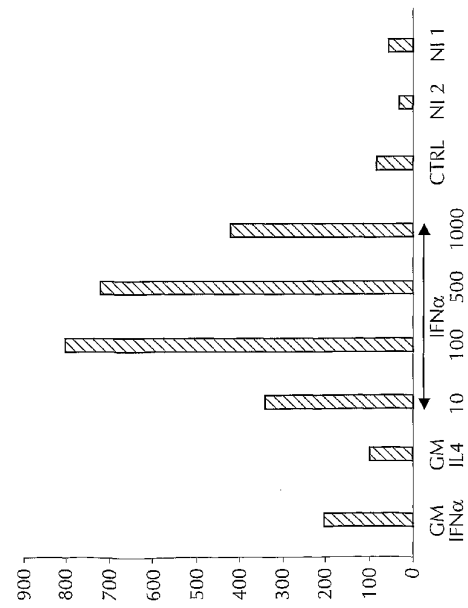


FIG. 13A



WO 02/067760

PCT/US02/00343

FIG. 14B

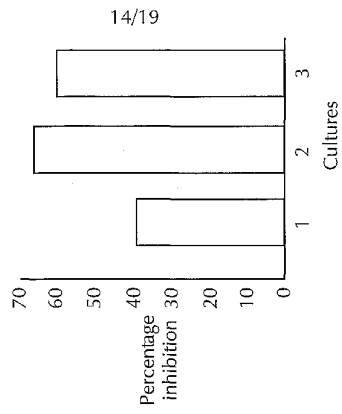
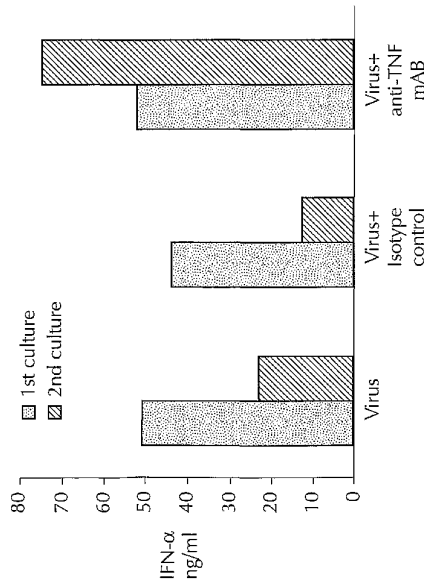


FIG. 14A



WO 02/067760

PCT/US02/00343

FIG. 14C

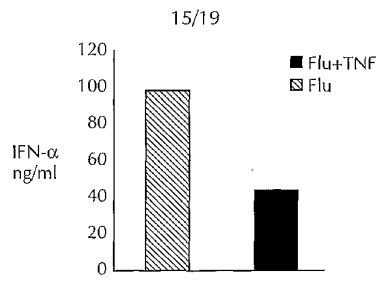


FIG. 15

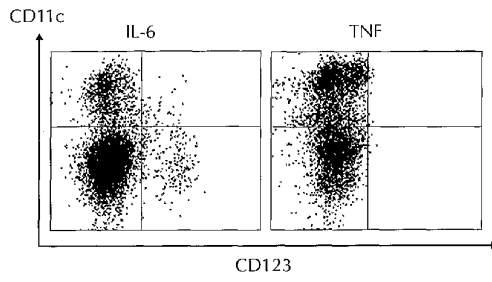
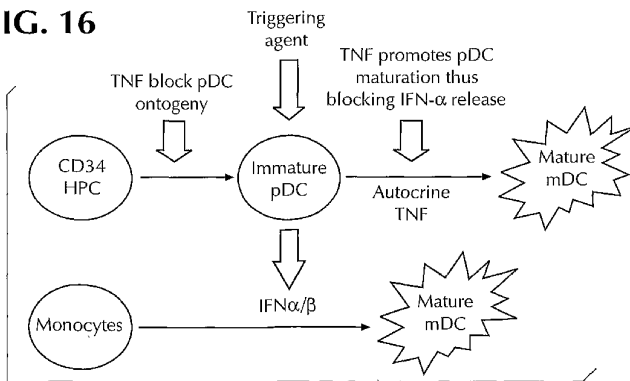
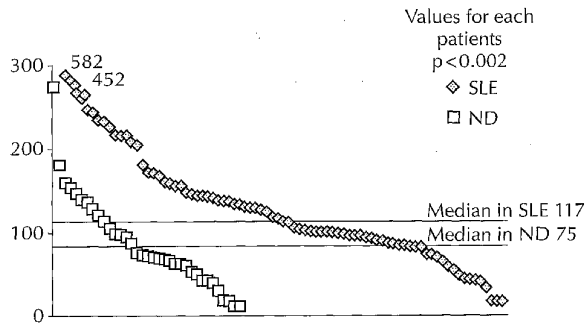


FIG. 16

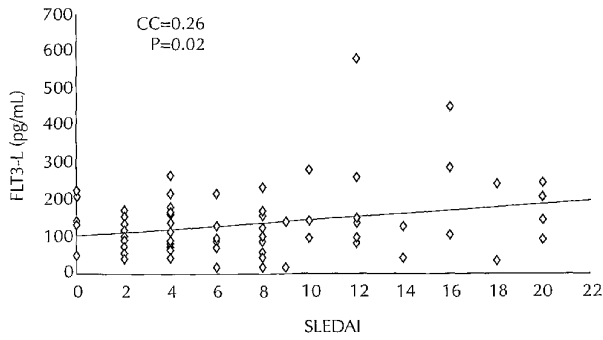


16/19

**FIG. 17**



**FIG. 18**

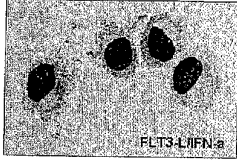


WO 02/067760

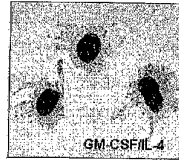
PCT/US02/00343

17/19

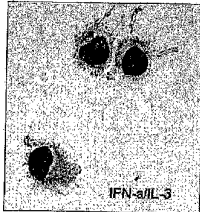
**FIG. 19A**



**FIG. 19B**



**FIG. 19C**



**FIG. 19D**

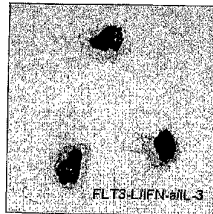


FIG. 20

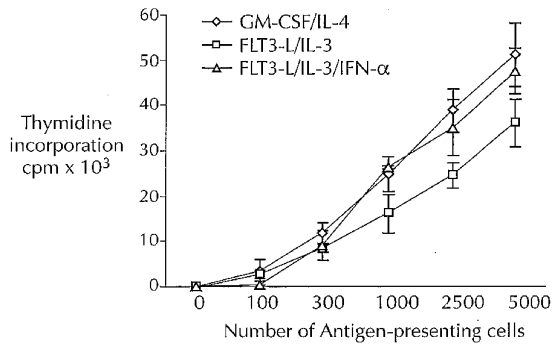


FIG. 21

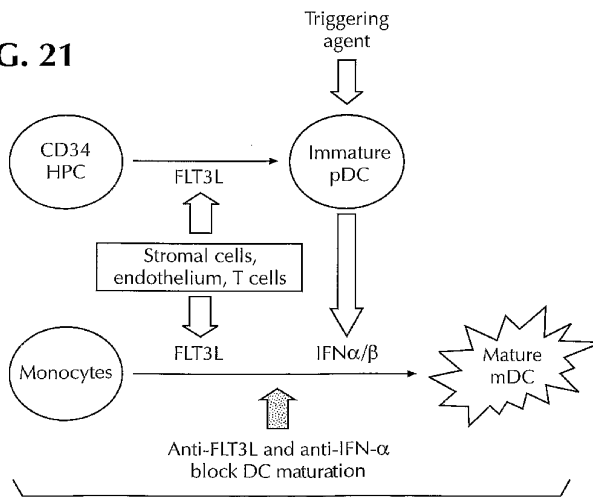
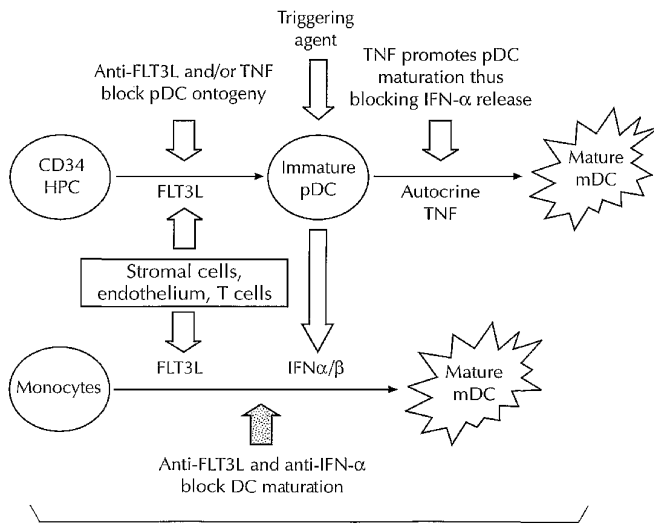


FIG. 22



## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
6 September 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/067760 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 39/38, 39/00, 38/19, 38/21, 38/40, 39/42
- (21) International Application Number: PCT/US02/00343
- (22) International Filing Date: 8 January 2002 (08.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/260,541 9 January 2001 (09.01.2001) US
- (71) Applicant: BAYLOR RESEARCH INSTITUTE [US/US]; 3434 Live Oak, Dallas, TX 75204 (US).
- (72) Inventors: BANCHEREAU, Jacques, F.; 6730 Northaven, Dallas, TX 75230 (US); PALUCKA, Anna, Karolina; 101 North Brookside Drive, Apt #106, Dallas, TX 75214 (US); BLANCO, Patrick; 232 Chemin de Suzon Apt #1781, F-33400 Talence (FR).
- (74) Agents: WILSON, M., Lisa et al.; Hale and Dorr LLP, 300 Park Avenue, New York, NY 10022 (US).
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PE, 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
- (88) Date of publication of the international search report: 13 March 2003
- 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 02/067760 A3

(54) Title: METHODS FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES IN A SUBJECT AND IN VITRO DIAGNOSTIC ASSAYS

(57) Abstract: The invention provides a method for treating an autoimmune disease in a subject by administering an interferon antagonist and a Flt3 ligand (Flt3L) antagonist. The invention also provides compositions containing one or more interferon antagonists, and one or more Flt3L antagonists, an *in vitro* assay for determining a subject's risk for developing an autoimmune disease, and kits for use, *inter alia*, with the assay.

## 【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/00343												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>														
IPC(7) : A61K 39/38, 39/00, 38/19, 38/21, 38/40, 39/42 US CL : 424/184.1, 141.1, 85.6, 85.7, 133.1, 131.1, 136.1; 514/44; 435/7.92 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/184.1, 141.1, 85.6, 85.7, 133.1, 131.1, 136.1; 514/44; 435/7.92														
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) AFS STN MELINE, EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, CAPLUS														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>														
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	US 5,888,511 A (SKURKOVICH et al) 20 March 1999 (20.03.1999). See entire document, column 4, lines 38-43, column 5, line 32-38, column 15, lines 41-44, column 17, line 7-25, column 20, lines 28-44, column 25, line 3, claims, in particular.	1-9, 11-13, 15, 17, 19-26, 28-31, 33, 38, 42-52												
Y	US 5,889,151 A (MOGENSEN et al) 30 March 1999 (30.3.1999). See entire document, especially Claims 1-9 of '151 patent.	10 and 21												
Y	EP 0627487 A2 (IMMUNEX CORPORATION) 07 December 1994 (07.12.94). See entire document, especially page 13, line Example 3, pages 17-19, in particular.	1, 13-15, 18, 28, 35-38 and 42												
Y	HUANG X et al. Islet Expression of Interferon-Alpha Precedes Diabetes in Both the BB Rat and Streptozotocin-Treated Mice. Immunity. September 1994, Vol. 1, No. 6, pages 469-78, especially page 473.	1-9, 11-13, 15, 17, 19-27, 28-31, 33-34, 38, 44-52												
Y	SOOS et al. Oral Feeding of Interferon Tau Can Prevent the Acute and Chronic Relapsing Forms of Experimental Allergic Encephalomyelitis. J Neuroimmunology. May 1997, Vol. 75, No. 1-2, pages 43-50, especially Abstract, pages 45-46.	1-9, 11-13, 15, 17, 19-26, 28-31, 33, 38, 42-52												
Y	US 5,919,452 A (LE et al) 06 July 1999 (06.07.1999). See entire document, especially columns 13, lines 37-26, column 21-22.	15 and 39												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*T* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.</td> </tr> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*B* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	*T* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.	*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*B* earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)	*Z* document member of the same patent family	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	*T* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.													
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
*B* earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)	*Z* document member of the same patent family													
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 27 May 2002 (27.05.2002)		Date of mailing of the international search report 04 DEC 2002												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris for</i> Phuong Huynh Telephone No. (703) 308-0196												

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	G 0 1 N 21/76	
G 0 1 N 21/76	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/53	P
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/564	
G 0 1 N 33/564	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/58	Z
G 0 1 N 33/58	A 6 1 K 37/02	
// C 0 7 K 16/40	A 6 1 K 37/66	G
	C 0 7 K 16/40	

(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, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74) 代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74) 代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74) 代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72) 発明者 バンチェロー ジャックス エフ

アメリカ合衆国 テキサス州 7 5 2 3 0 ダラス ノーセイヴン 6 7 3 0

(72) 発明者 パルッカ アンナ キャロライナ

アメリカ合衆国 テキサス州 7 5 2 1 4 ダラス ノース ブルックサイド ドライヴ 1 0 1  
 アpartment # 1 0 6

(72) 発明者 ブランコ パトリック

フランス エフ - 3 3 4 0 0 タレンス シュマン ド スゾン 2 3 2 アパルトマン # 1 7  
 8 エフ

F ターム(参考) 2G045 BB10 BB14 BB20 BB24 BB46 BB50 CB01 DA77 FA29 FB03

GC10

2G054 AB04 BB08 CA21 CE02 EA01 EA03 EA04

4C084 AA20 MA24 MA52 MA55 MA56 MA58 MA59 MA66 NA14 ZA011

ZA361 ZA891 ZA941 ZA961 ZB081 ZB151 ZC351 ZC551  
4C085 AA14 AA15 AA16 CC03 DD62  
4H045 AA11 DA16 DA76 DA86 EA22 EA27 EA50 FA71

专利名称(译)	治疗受试者的自身免疫疾病和体外诊断试验		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004519475A</a>	公开(公告)日	2004-07-02
申请号	JP2002567137	申请日	2002-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	贝勒研究协会		
申请(专利权)人(译)	贝勒研究所		
[标]发明人	バンチェロージャックスエフ パルッカアンナキャロライナ ブランコパトリック		
发明人	バンチェロー ジャックス エフ パルッカ アンナ キャロライナ ブランコ パトリック		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/17 A61K38/19 A61K38/21 A61K39/395 A61K45/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P37/06 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/40 G01N21/76 G01N21/78 G01N33/564 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/179 A61K38/1793 A61K38/191 A61K2039/505 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/249 C07K2317/73 G01N33/564 G01N33/6863 G01N33/6866 G01N2800/24		
FI分类号	A61K45/06 A61K39/395.F A61K39/395.U A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P31/18 A61P37/06 G01N21/76 G01N21/78.C G01N33/53.P G01N33/564 G01N33/577.B G01N33/58.Z A61K37/02 A61K37/66.G C07K16/40		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA77 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/GC10 2G054/AB04 2G054/BB08 2G054/CA21 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/EA04 4C084/AA20 4C084/MA24 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA361 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZB081 4C084/ZB151 4C084/ZC351 4C084/ZC551 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/CC03 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/DA16 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA27 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	中村稔 小川伸男 西岛隆义		
优先权	60/260541 2001-01-09 US		
其他公开文献	JP4394350B2 JP2004519475A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了通过给予干扰素拮抗剂和Flt3配体 ( Flt3L ) 拮抗剂来治疗受试者的自身免疫疾病的方法。本发明涉及含有一种或多种干扰素拮抗剂和一种或多种Flt3L拮抗剂的组合物, 用于确定发生自身免疫疾病的受试风险的体外试验, 特别是用于该试验。还提供了一套

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/385	2 G 0 5 4
A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 39/385	U 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 7/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 114 頁) 最終頁に*		

(21) 出願番号	特願2002-567137 (P2002-567137)	(71) 出願人	503247975
(86) (22) 出願日	平成14年1月8日 (2002.1.8)		ベイラー リサーチ インスティテュー
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月9日 (2003.7.9)		アメリカ合衆国 テキサス州 7520
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/000343		ダラス リヴ オーク 3434
(87) 国際公開番号	W02002/067760	(74) 代理人	100059959
(87) 国際公開日	平成14年9月6日 (2002.9.6)		弁理士 中村 稔
(31) 優先権主張番号	60/260,541	(74) 代理人	100067013
(32) 優先日	平成13年1月9日 (2001.1.9)		弁理士 大塚 文昭
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一
		(74) 代理人	100074228
			弁理士 今城 俊夫
最終頁に続く			

(43) (発明の名称) 対象は本特許自己存続期間の満了時及びその前の特許権消滅時